

Psychiatrické centrum Praha
Laboratoř biochemie a patofyziologie mozku

RNDr. Věra Valešová

ÚLOHA GLUTAMÁTERGNÍHO SYSTÉMU
V PATOFYZIOLOGII SCHIZOFRENIE



Autoreferát doktorandské disertační práce
Postgraduální doktorský studijní program v oboru Fyziologie a
patofyziologie člověka

Praha 2005

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného postgraduálního doktorského studia biomedicíny, oborová rada Fyziologie a patofyziologie člověka. Experimentální část práce vznikla v laboratoři Biochemie a patofyziologie mozku Psychiatrického centra Praha.

Autor: RNDr. Věra Valešová
Psychiatrické centrum Praha
Ústavní 91, 181 03 Praha 8-Bohnice

Školitel: Doc. MUDr. František Šťastný CSc.
Psychiatrické centrum Praha
Ústavní 91, 181 03 Praha 8-Bohnice

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertace se koná dne..... před komisí pro obhajoby disertačních prací, oborová rada Fyziologie a patofyziologie člověka, v seminární místnosti Fyziologického ústavu 1.LF UK na Albertově 5, Praha 2.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat Psychiatrickému centru Praha a Centru Neuropsychiatrických studií (LN00B122 MŠMT ČR) za finanční podporu pro tuto práci.

Děkuji mému školiteli doc. MUDr. Františkovi Šťastnému, CSc. za odborné vedení během postgraduálního studia. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci Ing. Zdeně Křištofikové a RNDr. Haně Tejkalové, PhD. z Psychiatrického centra Praha.

Děkuji prof. Vladimíru J. Balcarovi, PhD. za spolupráci a možnost navštívit jeho laboratoř na The University of Sydney a za pomoc se psaním odborných článků a abstraktů.

Děkuji za odbornou spolupráci prof. MUDr. Milošovi Langmeierovi, DrSc. z Fyziologického ústavu 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, RNDr. Václavovi Lisému z Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky, doc. RNDr. Anně Yamamotové CSc. a MUDr. Marii Pometlové CSc. z Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy.

Dále bych chtěla poděkovat technickým asistentkám Bohdaně Budínové, Kateřině Horníkové za pomoc při experimentech a paní Haně Švagerové za ošetřování laboratorních zvířat.

OBSAH

Souhrn	5
Summary	6
1. Úvod do problematiky	8
1.1. Schizofrenie	9
1.2. Změny v glutamatergním systému schizofrenie	9
1.3. Animální modely schizofrenie	9
1.4. Animální model schizofrenie: neonatální poškození mozku N-acetyl-L-asprartyl-L-glutamátem	10
2. Cíl dizertační práce	11
3. Metodika	12
3.1. Zvířata a podání látek	12
3.2. Histologické techniky	12
3.3. Vazebné studie	13
3.4. Studium chování	15
3.5. Statistika	16
4. Výsledky	16
4.1. Charakteristika neurovývojového modelu schizofrenie založeného na neonatální lézi NAAG	17
4.1.1. Mozkové poškození po neonatální icv infuzi NAAG	17
4.1.2. Vliv NAAG na neurotransmitterové systémy u dospělých potkanů	18
4.1.3. Vliv NAAG na chování potkana	19
4.1.4. Vliv inhibitoru dopaminového transporteru (GBR 12909) na chování a PPI potkana po neonatální infuzi NAAG	20
4.1.5. Vliv dizocilpinu (MK-801) na chování a PPI dospělého potkana po neonatální infuzi NAAG	21
4.2. Porovnání dvou neurovývojových modelů schizofrenie založených na neonatálních lézích NAAG a kyselinou chinolinovou (QUIN)	22
4.2.1. Porovnání mozkového poškození po icv infuzi NAAG a QUIN	22
4.2.2. Porovnání účinku NAAG a QUIN na neurotransmitterové systémy u dospělých potkanů	23
4.2.3. Porovnání účinku NAAG a QUIN na chování potkana	24
4.2.4. Vliv GBR 12909 na chování dospělých potkanů v otevřeném poli po neonatálním podáními NAAG a QUIN	26
5. Diskuze	27
5.1. Poškození, jeho kvantitativní hodnocení a charakter buněčné smrti po neonatální infuzi NAAG v průběhu ontogeneze potkana	27
5.2. Vliv neonatálního podání NAAG na neurotransmitterové systémy dospělého potkana	28
5.3. Vliv neonatálního podání NAAG na chování potkana	28
5.4. Vliv neonatální icv infuze NAAG na chování a PPI dospělého potkana po akutní aplikaci inhibitoru dopaminového transportéru (GBR 12909)	29
5.5. Vliv akutního podání dizocilpinu (MK-801) na chování a PPI dospělého potkana po neonatální lézi NAAG	30
5.6. Porovnání mozkového poškození a charakteristiky buněčného poškození po NAAG a QUIN	31
5.7. Porovnání vlivu NAAG a QUIN na neurotransmitterové systémy v mozku dospělého potkana	32
5.8. Porovnání účinku NAAG a QUIN na chování potkanů	32
5.9. Vliv GBR 12909 na chování dospělého potkana v otevřeném poli po podání NAAG a QUIN	33
6. Závěr	34
7. Seznam literatury	35
8. Seznam publikací autora	38

SOUHRN

Předmětem práce bylo vypracovat neurovývojový model schizofrenie. Neurovývojový model schizofrenie je založen na předpokladu, že experimentální poškození vyvíjejícího se mozku změní celkové chování jedince v dospělosti, které je charakterizováno jako schizofrenii-podobné. Poškození v časném postnatálním období potkana (12. postnatální den) bylo navozeno intracerebroventrikulární (icv) infuzí N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG). Histomorfologické rozložení poškození, včetně kvantitativní analýzy, jsme zhodnotili 24 a 96 hodin po podání NAAG. Chování potkanů jsme pozorovali v časně adolescenci a dospělosti potkana. NAAG je neuropetid, který je přítomen v mozku savců ve velkém množství. Tento dipeptid aktivuje metabotropní glutamátové receptory (mGluR II), ale také NMDA receptory.

Neonatální icv infuze NAAG poškodila především neurony gyrus dentatus 24 hodin po infuzi. Poškozené neurony jsme prokázali barvením dle Nissla, barvením Fluoro Jade B v kombinaci s Hoechst 33342 a technikou TUNEL.

Neonatální léze změnila některé projevy chování potkana v časně dospělosti v testu otevřeného pole (zvýšení čištění). Potkani po podání NAAG vykazovali zvýšenou reakci po podání GBR 12909 (inhibitor dopaminového transportéru) v testu otevřeného pole (snížení imobility a čištění). Naopak tyto potkani byli méně citliví na podání antagonisty NMDA receptorů (MK-801) v testu otevřeného pole (imobilita) a v testu prepulzní inhibice úlekové reakce. Změna chování v časně dospělosti potkana po neonatálním podání NAAG koreluje se sníženou specifickou vazbou [³H]glutamátu v entorhinální kůře a také se sníženou vazbou [³⁵S]TBPS v hipokampu dospělého potkana.

Následně byl model založený na neonatálním podání NAAG porovnán s neurovývojovým modelem založeným na neonatálním poškození mozku kyselinou chinolinovou (QUIN). Po podání QUIN jsme pozorovali rozsáhlejší poškození hipokampu i korových oblastí ve srovnání s NAAG. Neonatální infuze QUIN snížila specifickou vazbu [³H]glutamátu ve striatu, hipokampu a entorhinální kůře a také snížila aktivitu vysokoafinitního transportéru pro cholin (HACU) v levém hipokampu dospělého potkana. Je možné, že poškození cholinergního systému má za následek pozorované zhoršení referenční paměti v Morrisově vodním bludišti. Tyto změny nebyly pozorovány u potkanů po podání NAAG. Dále, potkani po podání QUIN si méně hráli 22. postnatální den a také měli zkrácenou dobu imobility v testu otevřeného pole v časně dospělosti potkana. Potkani po podání QUIN ve srovnání s NAAG byli citlivější na podání GBR 12909 v lokomoční a explorační aktivitě v testu otevřeného pole.

Závěrem lze říci, že časně postnatální podání NAAG i QUIN potkanům může sloužit jako neurovývojový model schizofrenii-podobného chování a vykazuje částečně konstruktivní a fenomenologickou validitu.

SUMMARY

The aim of the study was to create a new animal model of schizophrenia based on a neurodevelopmental hypothesis. The central idea of the project has been that a transient insult at early postnatal age will reveal itself in the form of delayed distinct behavioral changes that can be related to schizophrenia. The experimental design used intracerebroventricular (icv) infusion of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG) to rats at postnatal day 12, followed by combination of histology and quantitative morphology in brain tissue obtained within 24 and 96 hours of the NAAG administration and used to investigate possible neurodegeneration. Finally, a battery of behavioural tests was performed several weeks later (late adolescence/early adulthood). NAAG is the most abundant neuropeptide and interacts with the active site of metabotropic glutamate receptors (mGluR II), however, it is also an agonist at NMDA receptors.

Neonatal icv infusion of NAAG resulted in detectable damaged neurones in gyrus dentatus. The damage appeared greater at 24 hours, as compared to 96 hours, after the infusion. The presence of damaged neurons was easily demonstrated by Nissl stain, Fluoro Jade B staining combined with Hoechst 33342 and by TUNEL technique.

Neonatal administration of NAAG resulted in the appearance of specific, potentially abnormal, behavioural traits in young adult rats as indicated by open field. Thus, there was an increased spontaneous grooming and a decrease in immobility and grooming after administration of GBR 12909 (inhibitor of dopamine transporter). The lesioned rats were, however, less susceptible to the effects of the NMDA antagonist MK-801, both in the open field behaviour (immobility) and in the tests of prepulse inhibition of acoustic startle response. Interestingly, the early postnatal administration of NAAG resulted in reduced specific binding of [^3H]glutamate in entorhinal cortex and in the reduced specific binding of [^{35}S]TBPS in hippocampus of adult rats.

The neonatal NAAG model of schizophrenia was compared with another known neurodevelopmental animal model of schizophrenia based on neonatally-induced lesions using quinolinic acid (QUIN). Following QUIN infusion, the damage to hippocampus and cortex was greater than that caused by NAAG. Early postnatal QUIN dramatically reduced specific binding of [^3H]glutamate in striatum, hippocampus and entorhinal cortex and in addition, decreased high-affinity uptake of [^3H]choline, particularly in the left hippocampus. All these changes have been observed in postnatally lesioned rats allowed to reach early adulthood. It is possible that QUIN-induced changes in the cholinergic system may have been linked to the memory deficit as detected in the QUIN-lesioned rats using Morris water maze. No similar changes have been, however, detected in NAAG-infused rats. Furthermore, the QUIN-lesioned rats, unlike those infused with NAAG, showed a deficit in play behavior on postnatal day 22 and a decrease in

immobility in young adult rats. In addition, when compared to NAAG-infused rats, the QUIN-lesioned animals showed higher locomotory and exploratory activity following a challenge with GBR 12909.

It is concluded that the early postnatal administration of both substances NAAG and QUIN to rats represents a potentially useful neurodevelopmental model of schizophrenia-like behaviour and shows constructive and face validity.

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1. Schizofrenie

Schizofrenie je závažné psychiatrické onemocnění. Toto onemocnění ovlivňuje lidské myšlení, citění a jednání. Snižuje kvalitu života a zvyšuje mortalitu. Pro schizofrenii je typická mnohotvárnost psychopatologie, průběhu i odpovědi na léčbu. Projevy této duševní poruchy jsou nejednotné. Schizofrenie je přesto definována pomocí syndromů, které jsou shrnuty v diagnostických manuálech DSM IV a ICD 10. Nejčastější rozdělení symptomů u schizofrenie je na pozitivní a negativní symptomy. Pozitivní symptomy zhoršují běžné funkce mozku (halucinace, bludy, stereotypic) a negativní symptomy svědčí pro ztrátu normální funkce mozku (anhedonie, sociální a citové stažení). Mezi symptomy schizofrenie se řadí i kognitivní deficit, který zahrnuje problémy s orientovanou pozorností, vizuálním a verbálním vybavováním, pracovní paměť a exekutivními funkcemi. U některých pacientů se schizofrenii se vyskytuje kognitivní deficit v celém průběhu onemocnění (Heaton et al., 1994). Podobně jako symptomatologie je proměnlivý i průběh onemocnění. Typicky začíná onemocnění schizofrenii v adolescenci a v časně dospělosti. Průměrný věk prvních známek duševního onemocnění je 24 let u mužů a 27 let u žen. Etiologie schizofrenie není doposud známa. Zatím se předpokládá multifaktoriální etiologie a vliv mnohočetných patogenetických vlivů. Jsou přijímány dvě hlavní teorie vzniku schizofrenie: neurodegenerativní a naopak neurovývojová hypotéza vzniku schizofrenie.

Neurovývojová hypotéza schizofrenie předpokládá, že porucha v pre- nebo perinatálním vývoji mozku povede k manifestaci onemocnění v časně dospělosti. Předpokládá se, že již v průběhu vývoje dítěte, dlouho před začátkem onemocnění, je prokazatelný deficit v pozornosti a výskyt motorických poruch u dětí s rizikem pro schizofrenii (Erlmeyer-Kimling, 2000). Pro neurovývojovou hypotézu dále svědčí nedostatek neuropatologických důkazů poškození nervové tkáně, perinatální poškození vývoje mozku a pozdní nástup onemocnění (Keshavan, 1999). Jako rizikové faktory se uvádějí porodní komplikace, virová infekce matky v druhém trimestru těhotenství, podvýživa matky a inkompatibilita Rh faktoru. Porodní komplikace působí prostřednictvím periventrikulárních krvácivých lézí, které vedou k hypoxii, k následné neuronální smrti a poruše neuronálního propojení (Hoschl et al., 2004).

V současné době většina nálezů svědčí pro neurovývojový původ schizofrenie, která obsahuje částečně i neurodegenerativní složku. Velký heuristický význam v etiologii schizofrenie má předpoklad časně excitotoxické léze, která vede k poškození normálního vývoje nervové tkáně a k manifestaci psychotického chování (Weinberger, 1987).

1.2. Změny v glutamatergním systému u schizofrenie

Před 20 lety byly objeveny látky, které působí jako nekompetitivní antagonisté N-metyl-D-aspártátového (NMDA) receptoru, vedoucí ke změnám v chování člověka i zvířat, které má schizofrenii podobné projevy (Coyle et al., 2004). Experimentální použití těchto látek přineslo doklady pro možnou úlohu glutamatergního systému v patofyziologii schizofrenie. V poslední době se také objevují důkazy o přímém vlivu antipsychotik na glutamatergní systém a o možném klinickém využití látek aktivujících glutamátové NMDA receptory v léčbě schizofrenie. Nález u pacientů se schizofrenií ukazují na změny v expresi glutamátových receptorů a v hladinách glutamátu a dalších látek, N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát a kyselina chinolinová (Kim et al., 1980; Schwarcz et al., 1988; Tsai et al., 1995). Kyselina chinolinová (QUIN), jeden z metabolitů tryptofanu, je agonistou NMDA receptorů a její tvorba či podání ve vyšší koncentraci vyvolá excitotoxické poškození neuronů (Jhamandas et al., 1993). U pacientů se schizofrenií byly hladiny kyseliny chinolinové (QUIN) (Schwarcz et al., 1988). Použití technik molekulární genetiky u schizofrenie poukázalo na spojení mezi nukleotidovým polymorfismem některých genů, které souvisejí s glutamatergním systémem a schizofrenií (Harrison a Owen, 2003).

Také změny v metabolismu a hladinách NAAG jsou spojovány se schizofrenií (Tsai et al., 1995). U pacientů se schizofrenií byly nalezeny zvýšené hladiny tohoto dipeptidu v hipokampu a v prefrontální kůře (Tsai et al., 1995). Zároveň aktivita enzymu glutamátcarboxypeptidázy II (GCP II) negativně korelovala se zvýšenými hladinami NAAG v prefrontální kůře (PFC) a hipokampu. Snížení aktivity GCP II a tím i snížení hladiny glutamátu v PFC a hipokampu přispívá k hypoglutamatergnímu stavu, který byl nalezen u pacientů se schizofrenií (Goff a Coyle 2001). Z hlediska neurovývojové hypotézy by NAAG mohl mít důležitou úlohu v etiologii schizofrenie. Neonatálně zvýšená hladina NAAG by mohla mít dlouhodobé následky a vést až ke schizofrenii podobnému chování

1.3. Animální modely schizofrenie

Většina modelů je založena na hypotéze, že schizofrenie vzniká v důsledku poškození vyvíjejícího se mozku, které vede ke změně v jeho funkci i v celkovém chování jedince. Animální modely nám umožňují si ověřit význam různých faktorů, které se uplatňují během prenatálního a perinatálního vývoje jedince a snaží se objasnit patofyziologické mechanismy vyvolávající vznik schizofrenii podobného chování vzhledem k morfologickým a neurochemickým změnám v různých oblastech mozku.

Mimo časné léze ventrálního hipokampu byly podobné nálezy získány také po perinatálním poškození mediálního temporálního laloku u primátů (Bachevalier et al.,

1999), talamu a prefrontální kůry u potkanů (Flores et al., 1996; Rajakumar et al., 1996), nebo po lézi způsobené intracerebroventrikulárním podáním excitotoxické kyseliny kainové mláďatům potkana (Csemansky et al., 1998). Možným vysvětlením pozdních změn chování je předpoklad, že některé oblasti mozku mohou kompenzovat léze vzniklé před pubertou, tj. v době, kdy struktury nemusí být ještě plně funkční. Avšak v dospělosti, kdy se již do funkce zapojují všechny struktury mozku, se změny v chování mohou plně projevit (Goldman, 1971).

1.4. Animální model schizofrenie: neonatální poškození mozku N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátem

N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) je dipeptid, který dosahuje v jednotlivých strukturách mozku potkana koncentrace 0.5-5 $\mu\text{mol/g}$ tkáň (Miyake et al., 1981). Tento dipeptid působí jako agonista metabotropních glutamátových receptorů skupiny II (mGluR II), především podtypu mGluR 3 (Neale et al., 2000). Aktivací těchto receptorů NAAG snižuje hladiny cAMP a tím synaptický výdej glutamátu a GABA (Zhao et al., 2001). Předpokládá se, že aktivací těchto receptorů NAAG působí v řadě případů neuroprotektivně (Orlando et al., 1997). NAAG může být hydrolyzován enzymem glutamátkarboxypeptidázou II (GCP II; EC 3.4.17.21) na glutamát a N-acetylaspartát (Neale et al., 2000). Takto uvolněný glutamát může aktivovat ionotropní NMDA receptory (Thomas et al., 2000). Zvýšená aktivita NMDA receptorů vede k excitotoxickému poškození neuronů. V poslední době uvažujeme i přímé působení NAAG jako parciálního agonisty NMDA receptorů (Pliss et al., 2003; Losi et al., 2004). Především ve vysokých koncentracích aktivuje NAAG přednostně ty oligoheteromery NMDA receptoru, které mají zastoupenou NR2D podjednotku (Hess et al., 1999).

Tento dipeptid hraje důležitou úlohu při vývoji centrálního nervového systému. Až dvojnásobně zvýšené hladiny NAAG byly nalezeny 8. PND ve středním mozku, mozečku, hipokampu a neokortexu potkana ve srovnání z hladinou NAAG při narození. Po 8. PND hladina NAAG klesá na 10 % hodnoty v době narození (Koller and Coyle, 1984). Přestože je hladina NAAG nejvyšší na začátku druhého postnatálního týdne, exprese neuroprotektivních mGluR2 a mGluR je v tomto období velmi nízká (Catania et al., 1994). Naopak výskyt NR1/NR2D podjednotek NMDA receptorů je v tomto období maximální (Ritter et al., 2001). Proto jsme vypracovali animální model, kde zvýšená hladina NAAG v tomto období vede k excitotoxickému poškození mozku s následnou změnou v neurochemii a v chování potkana v pre- a postpubertálním období.

2. CÍL DIZERTAČNÍ PRÁCE

Předmětem práce bylo zavést neurovývojový model schizofrenie navozený intracerebroventrikulární (icv) infuzí N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG).

Daný model charakterizovat

1. **morfologicky**, a to s cílem vymežit regionální rozložení mozkového poškození (Nisslovo barvení, barvení Fluoro Jade B), kvantifikovat zánik nervových buněk v hipokampu v prvních dnech po icv infuzi NAAG a po dosažení pohlavní dospělosti potkana (50. PND) a stanovit charakter buněčné smrti (barvení Hoechst 33342 a TUNEL technika).
2. **neurochemicky**, a to s cílem charakterizovat změny v receptorově specifické vazbě [^3H]glutamátu v hipokampu mladého dospělého potkana (50. PND), ve vysokoafinitním transportu cholinu (HACU) a v receptorově specifické vazbě [^{35}S]TBPS v hipokampu potkana 50. PND.
3. **funkčně (behaviorálně)**, a to s cílem posoudit změny v hravém a sociálním chování jedince v prepubertálním období (22. PND), reakce jedince na nové prostředí v období puberty (35. PND) a dospělosti (50. PND), velikost akustické úlekové reakce a její prepulzní inhibice. Uvedené charakteristiky chování dále ovlivnit: (i) inhibicí transportu dopaminu; (ii) inhibicí NMDA receptoru.
4. Cílem bylo srovnat validitu dvou modelů (založených na icv infuzi NAAG nebo kyseliny chinolinové), vycházejících z glutamátergní hypotézy schizofrenie. Tyto modely porovnat z morfologického, neurochemického a behaviorálního hlediska.

3. METODIKA

3.1. Zvířata a podání látek

Mláďata (Wistar Hann) byla dodána 7. PND v počtu 10 jedinců v hnízdě s matkou (BioTest s.r.o, Konářovice). Všechna zvířata byla ve světelném režimu 12 h světlo/12 h tma s volným přístupem k vodě a potravě. Mláďata jsme odstavovali od matky 28. PND.

V den operace, 12. PND, byl samcům aplikován NAAG nebo QUIN intracerebroventrikulárně (icv) za pomoci Hamiltonovy stříkačky (1 μ l) do postranních komor pomocí stereotaxického přístroje s koordinátami AP: - 1 mm od bregmy; L: \pm 1,5 mm; DV: -3,5 mm od povrchu lebečních kostí (Sherwood and Timiras, 1970). Látky NAAG byla infundována v dávce 0,25 μ mol v 0,25 μ l sterilního fyziologického roztoku do každé postranní komory, QUIN byla infundována ve stejné dávce v 0,25 μ l v pufovaném fyziologickém roztoku pH 7,4 po dobu 3 minut do každé komory. Kontrolním zvířatům byl infundován do postranních komor stejný objem sterilního fyziologického roztoku.

Všechny experimenty byly schváleny odbornou komisí pro laboratorní zvířata při 3. LF UK a PCP a byly provedeny v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a ve smyslu znění vyhlášky 311/1997 Sb.

3.2. Histologické techniky

Nisslovo barvení

Potkany jsme transkardiálně perfundovali Ringerovým roztokem (pH 7,4) a následně 4 % paraformaldehydem v Ringerově roztoku (pH 7,2-7,4). Mozky jsme vyjmuli, odvodnili v xylenu a acetonu, v 70 % a 96 % alkoholu a poté zalili do paraplastu (Sigma). Po odparafinování seriových řezů v xylenu, ethanolu (96 % a 70 %) a vodě byl každý 15. řez (vzdálenost řezů 105 μ m) o síle 7 μ m přenesen do roztoku toluidinové modři (0,1% v destilované vodě). Po odvodnění obarvených řezů v 96 % alkoholu, acetonu a xylenu byly řezy montovány. Rozsah poškození byl pozorován v jednotlivých řezech na světelném mikroskopu Olympus AX 70.

Kvantifikace poškozených neuronů v hipokampu

V řezech obarvených toluidinovou modří byl stanoven počet poškozených neuronů v dorzálním a ventrálním hipokampu (Sherwood and Timiras, 1970). Celkem jsme provedli kvantifikaci ve 20 řezech pro celý hipokampus a po 10 řezech pro dorzální nebo ventrální část. Neuronů nepoškozených i poškozených byly počítány v oblastech o rozměrech 100 μ m x 200 μ m. Oblasti dorzálního hipokampu byly rozděleny podle

atlasu Paxinos a Watson (1998) na CA1, CA3a (blíže k hilu gyrus dentatus), CA3b (vzdálenější část od hilu gyrus dentatus) a na infrapyramidový a suprapyramidový list gyrus dentatus.

Počet poškozených neuronů byl vyjádřen v % jako poměr počtu poškozených neuronů a celkového počtu neuronů v dané oblasti. Stanovení počtu buněk poškozených NAAG bylo provedeno pomocí softwaru MAGELAN verze 5.2. Počet poškozených neuronů byl vyjádřen procentuálně podle výše uvedeného vzorce.

Histochemická charakteristika neuronálního poškození

Pro charakteristiku buněčné smrti jsme použili dvojité fluorescenční barvení TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated biotin dUTP Nick-End) spolu s Hoechst 33342. Pro dvojité fluorescenční barvení TUNEL/Hoescht 33342 byla zvířata 24h po infuzi NAAG nebo fyziologického roztoku transkardiálně perfundována Ringerovým roztokem a následně 10 % formaldehydem. Fluorescenční dvojité barvení TUNEL/Hoechst 33342 jsme modifikovali dle Gavrieli a spol. (1992). Pozitivní kontrola byla získána po inkubaci s DNAázou I a jako negativní kontrola byly použity řezy, které nebyly inkubovány s reakční směsí. Pozorování jsme prováděli na mikroskopu Zeiss Axioplan2 imaging system.

Označení poškozených neuronů Fluoro Jade B

Metoda pro fluorescenční barvení Fluoro Jade B (Histo-Chem, USA) byla upravena podle Schmued a Hopkins, 2000. Na barvení Fluoro Jade B byla použita tři zvířata 24 h po infuzi NAAG/QUIN a tři kontrolní zvířata. Mozky byly připraveny stejně, jak je popsáno v kapitole „Nisslovo barvení“ a kryostatové řezy měly tloušťku 40 μm .

3.3. Vazebné studie

Vazba [^3H]glutamátu do frakce synaptozomálních membrán entorhinální kůry, hipokampální formace a striáta.

Za 38 dnů po aplikaci NAAG/QUIN jsme odebrali vybrané oblasti mozku (entorhinální kůra, hipokampus, striátum) u pokusných i kontrolních zvířat. Vzoroky byly homogenizovány v 0,32 M sacharóze a centrifugovány při 1000 g po dobu 10 minut. Odebraný supernatant byl centrifugován při 48 000 g po dobu 20 minut a sediment byl dvakrát promyt ledovou destilovanou vodou a recentrifugován. Výsledné sedimenty byly zmrazeny v suchém ledu a uchovány při -30°C do dne měření vazby. Metoda na měření vazby byla převzata z práce Lisý et al., (1994). Membránová suspence (100-300 μg proteinu) byla inkubována s 10 nM [^3H]glutamátem (L-G- [^3H]glutamátová kyselina, 21 Ci/mmol) v 1 ml 50 mM Tris-acetátovém pufru (pH 7,4) po

dobu 45 minut při 2 °C bez, anebo s 0,2 mM agonistou pro NMDA nebo non-NMDA typ ionotropních glutamátových receptorů. Inkubace byla ukončena přidáním 4 ml ledového pufru. Filtrace byla provedena při konstantním vakuu přes filtry Whatman CF/C. Po promyti a přidání scintilačního roztoku (5 ml) byla radioaktivita změřena na β -counteru (Beckman 980). Pro stanovení nespecifické vazby jsme do inkubačního média přidali 1 mM glutamát. Množství proteinu jsme stanovovali metodou dle Lowryho et al. (1951).

Stanovení vysokoafinitního transportu cholinu (HACU) na hipokampálních synaptosomech.

Disekované hipokampy jsme homogenizovali v 10-ti násobku 0,32 M sacharózy a vzniklý homogenát jsme centrifugovali při 1200 g (10 minut při 4°C). Supernatant byl centrifugován při 20 000 g, 20 min, 4°C. Získaný sediment byl resuspendován v 10-ti násobku 0,32 M sacharózy a opět centrifugován za stejných podmínek. Konečný sediment jsme resuspendovali v 10-ti násobku 0,32 M sacharózy a 20 μ l synaptosomální suspenze jsme použili ke stanovení koncentrace proteinů (Bradford, 1976). Všechny vzorky byly naředěny 0,32 M sacharózou tak, aby obsahovaly 2 mg proteinu/ml.

K vlastnímu stanovení transportu jsme použili 100 μ l synaptosomální frakce, 880 μ l Krebs-Ringer-HEPES-glukózového pufru (128 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,7 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5 mM glukóza, 10 mM HEPES, pH 7,4) a 20 μ l [³H]cholinu ([metyl-³H]cholin chlorid, 2775 GBq/mmol). Směs byla inkubována 4 minuty při 37 °C a obsahovala 10 nM [³H]cholinu a 200 μ g proteinu/ml. Nespecifická a nízkofafinitní část transportu byla stanovena pomocí 1 μ M hemicholinia-3. Inkubace byla ukončena rychlým ochlazením a filtrací (Whatman GF/B filtry) a radioaktivita změřena po přidání 5 ml scintilačního roztoku na přístroji Beckman LS 1701.

Stanovení specifické vazby [³⁵S]TBPS na hipokampálních membránách

Hipokampální membrány jsme izolovali ze směsných vzorků (hipokampy ze 2 zvířat v případě jednobodové analýzy a hipokampy z pěti zvířat u analýzy Scatchardovy) v souladu s prací Andersona et al. (1997).

Rozmražené membrány byly 3x přečištěny opakovanou centrifugací (28 000 g, 20 min, 4 °C). Sediment jsme resuspendovali v 10-ti násobku pufru (20 mM KH₂PO₄, 200 mM KCl, pH 7,4) a 20 μ l suspenze bylo použito na stanovení obsahu proteinů. Všechny vzorky byly naředěny tak, aby obsahovaly 1 mg proteinu/ml.

Pro stanovení jsme 100 μ l membrán inkubovali s 380 μ l pufru (20 mM KH₂PO₄, 200 mM KCl, pH 7,4), 10 μ l roztoku GABA (500 μ M) a 10 μ l [³⁵S]TBPS (100 nM)

($[^{35}\text{S}]$ butyl bicyclophosphorothionát, 2,4 TBq/mmol). Směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C a obsahovala 2 nM $[^{35}\text{S}]$ TBPS, 1 μM GABA a 200 μg proteinu/ml. Scatchardova analýza byla provedena s 1-50 nM $[^{35}\text{S}]$ TBPS. Nespecifická vazba byla stanovena po přidání 200 μM pikrotoxinu.

3.4. Studium chování

Hravé chování a sociální interakce

Sociální chování spolu s hravým chováním bylo studováno 22. PND na potkanech, kteří patřili do různých vrhů, ale měli stejnou aplikaci NAAG, QUIN, nebo fyziologického roztoku 12. PND. Trvání hrani, čištění partnera, přelézání, izolace a vzdalování nebo přibližování se k partnerovi bylo sledováno v chovném boxu po dobu 15 minut. Zvířata byla před pokusem 3,5 h izolována od matky.

Test otevřeného pole „open field test“

Zvířata 23 dní (35. PND) a 38 dní (50. PND) po aplikaci NAAG, QUIN nebo fyziologického roztoku byla pozorována v aréně o rozměrech 68 x 45 x 35 cm po dobu 5 minut ihned po vložení potkana do arény. V případě farmakologických studií s dizocilpinem (MK-801; Sigma-Aldrich, 0,3 mg/kg i.p.; 20 min před vložení do arény) a GBR 12909 (Tocris, UK, 10 mg/kg i.p.; 20 min před vložení do arény) byl potkan 50. PND ponechán v aréně 10 min a poté byli potkani 5 min pozorováni. Byla sledována frekvence, latence a trvání těchto aktivit: lokomoce (crossing), vztyčování (rearing) a trvání těchto aktivit: imobilita (immobility), čištění (grooming), čichání (sniffing) za pomoci softwaru Activities.

Úleková reakce na silný zvukový podnět (ASR)

Úleková reakce na silný zvukový podnět byla vyjádřena jako celková průměrná hodnota odpovědi na silný zvukový podnět 120 dB v rámci jednoho měření prepulzní inhibice úlekové reakce. Z celkového výpočtu bylo opět vynecháno prvních pět hodnot v každém sezení. Hodnoty úlekové reakce na silný zvukový podnět byly vyjádřeny v mV.

Prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI)

K měření jsme použili zařízení SR-LAB, San Diego Instruments, USA. Šum na pozadí byl o intenzitě 62 dB. Všichni potkani vzati do experimentu byli testováni v sezení jeden den před vlastním experimentem, které se skládalo z aklimatizační periody (5 min) a pětkrát za sebou následujících 5 akustických stimulů o síle 120 dB.

Experimentální provedení bylo převzato z práce Bubeníková et al., 2005. Šum na pozadí byl 62 dB a trval 5 min (aklimatizační doba) a následně byl použit jako pozadí v

průběhu celého experimentu. Po aklimatizační době začalo vlastní měření pěti po sobě jdoucími podněty o síle 120 dB. Dále pokračovalo střídáním čtyř různých typů akustických podnětů, které byly uspořádány náhodně 1) silný akustický podnět: 120db, doba trvání 20 ms; 2) předpodnět: 13 dB nad šum (celkový puls 75 dB), doba trvání 20 ms. Puls (13 dB) byl aplikován 100 ms před začátkem aplikace podnětu 120 dB; 3) samotný prepulse: 13 dB nad šum (celkový podnět 75 dB), doba trvání 20 ms 4) žádný stimulus (62 dB). Celkově během jednoho měření byl aplikován každý zvukový podnět pětkrát. Interval mezi jednotlivými podněty byl průměrně 30s.

Průměrná čísla získaná během měření byla upravena podle vzorce $PPI [100 - (\text{průměrná odpověď na předpodnět-podnět/průměrná odpověď na 120 dB})] \times 100$ a vyjádřeny jako % rozdíl mezi motorickou odpovědí na 120 db a na aplikaci prepulsu a 120 dB.

Stanovení referenční paměti v Morissově vodním bludišti

Učení zvířat po icv aplikaci QUIN/NAAG a fyziologického roztoku (kontrola) bylo studováno v Morissově vodním bludišti o průměru 200 cm. Na hraně bazénu byly vyznačeny čtyři body označující sever, jih, východ a západ. Ostrůvek o průměru 13 cm byl umístěn 1 cm pod hladinou. Tři dny před počátkem experimentu byla zvířata aklimatizována na prostředí a byla u nich určena míra schopnosti plavat. Pro vlastní měření učení a paměti byla použita metoda navigace místa, kdy ostrůvek i okolní předměty zůstávají na svém stálém místě, které se během pokusu nemění. Ostrůvek byl umístěn v severo-východním kvadrantu, 60 cm od hrany bazénu. Během experimentu se měnilo místo startu zvířete podle světových stran. Úkolem potkanů bylo zapamatovat si místo a naučit se, kde je skrytý ostrůvek v bazénu umístěn. Pozorování trvalo pět po sobě následujících dnů a v každém dni zvířata absolvovala osm pokusů. Byla měřena latence do nalezení ostrůvku a splnění kritéria 60 sekund do nalezení ostrůvku.

3.5. Statistika

Pro porovnání více skupin byla použita metoda jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) s použitím post-hoc Newman-Keuls testu. Pro srovnání dvou skupin byl použit nepárový t-test a v případě kvantifikační analýzy poškozených neuronů byl použit nepárový t-test s Welchovou korekcí. Rozdíl byl brán jako statisticky významný, pokud $p < 0.05$.

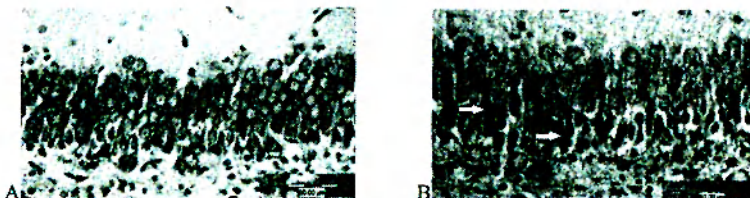
4. VÝSLEDKY

4.1. Charakteristika neurovývojového modelu schizofrenie založeného na neonatální lézi NAAG

4.1.1. Mozkové poškození po neonatální icv infuzi NAAG

Nisslovo barvení umožnilo v sériových řezech prokázat regionální distribuci poškozených neuronů. Jako poškozené neurony byly počítány ty neurony, který měly trojúhelníkový tvar, tmavé zbarvení cytoplazmy a špatně viditelná jádra (Obrázek 1). Rozsah poškození byl největší 24 h po podání NAAG v cingulární kůře, gyrus dentatus, mediální části substantia nigra a v dorzální části rostrálního talamu. Menší rozsah poškození byl pozorován 96 h po infuzi. Žádné poškození jsme nepozorovali 38 dní po icv infuzi NAAG. Maximum poškození bylo v oblasti gyrus dentatus.

Barvení Fluro Jade B značí poškozené neurony, ale neumožňuje rozlišit mezi apoptotickým a nekrotickým typem buněčné smrti (Fernandes et al., 2004). Dvojitě barvení Hoechst 33342 a Fluoro Jade B ukázalo zánik neuronů za 24 h po icv infuzi NAAG, především v gyrus dentatus a v oblasti CA3 a kondenzaci chromatinu.



Obrázek 1. Infrapyramidální list gyrus dentatus z dorzálního hipokampu u kontrol (A) a u zvířat 24 h po icv infuzi NAAG), část B. Bílou šipkou jsou označeny poškozené buňky (barvení toluidinovou modří. Použité zvětšení 400x).

Největší poškození bylo pozorováno v infrapyramidální vrstvě gyrus dentatus dorzálního i ventrálního hipokampu (Tabulka 1). Poškozené neurony byly lokalizovány především v subgranulární zóně hilu gyrus dentatus. Poškozené buňky byly také pozorovány v pyramidové vrstvě CA3a a CA3b oblasti dorzálního a ventrálního hipokampu. Naše data ukazují, že v oblasti CA1 bylo o 6- až 8-krát menší poškození než v gyrus dentatus a o 2- až 4-krát menší než v oblastech CA3. Počet poškozených neuronů v CA1 oblasti se statisticky významně nelišil od kontroly (Tabulka 1). Rozsah poškození za 96 h po aplikaci NAAG byl menší než za 24 h. Počet poškozených neuronů zůstal statisticky významně zvýšen v gyrus dentatus dorzálního hipokampu.

Tabulka 1. Kvantitativní zhodnocení poškozených neuronů v hipokampu potkana 24 a 96 hodin po icv infuzi NAAG.

Poškození za 24 hodin (%)

Dorzální hipokampus

	GDinf	GDsup	CA3a	CA3b	CA1
KONTROLY (20)	6,8 ± 0,9	3,6 ± 0,9	6,5 ± 0,09	7,7 ± 1	2,9 ± 0,3
NAAG (30)	*** 36,1 ± 2,8	*** 26,3 ± 2	*** 17,4 ± 2,2	*** 16,6 ± 2,2	4,4 ± 1,2

Ventrální hipokampus

	GDinf	GDsup	CA3a	CA3b	CA1
KONTROLY (18)	13,6 ± 2,1	5,8 ± 1,5	7,4 ± 1,1	6,2 ± 1	4,8 ± 1,6
NAAG (29)	*** 43,5 ± 2,7	*** 20 ± 2,1	*** 21,3 ± 2,2	*** 16,7 ± 2,9	6,6 ± 1,2

Poškození za 96 hodin (%)

Dorzální hipokampus

	GDinf	GDsup	CA3a	CA3b	CA1
KONTROLY (19)	6,8 ± 1,3	6,4 ± 1,4	4,2 ± 1,1	6,1 ± 1,2	1,6 ± 0,5
NAAG (30)	*** 26,7 ± 1,2	*** 16,8 ± 1,5	8,1 ± 1,33	7,6 ± 2,2	5,7 ± 0,9 ***

Ventrální hipokampus

	GDinf	GDsup	CA3a	CA3b	CA1
KONTROLY (11)	10,7 ± 2,2	3,4 ± 1,3	9,3 ± 1,8	8,2 ± 2,3	2,9 ± 1,4
NAAG (30)	18,4 ± 1,8	9,8 ± 1,3	5,5 ± 0,8	5,3 ± 0,9	2,3 ± 0,5

*Hodnoty vyjadřují procentuální podíl poškozených neuronů (průměr ± SEM) získaných ze 11-30 řezů z každé oblasti. Data byla získána ze třech nezávislých experimentů. Srovnání poškození z jednotlivých oblastí mezi kontrolou a NAAG skupinou byla vyhodnocena nepárovým t-testem s Welchovou korekcí. ** p < 0,01, *** p < 0,001.*

Techniku TUNEL jsme použili pro označení jednovláknových zlomů DNA. Přítomnost TUNEL pozitivních buněk ukazuje na časnou fázi jejich apoptotické smrti. Po icv infuzi NAAG (24 h) byly TUNEL pozitivní buňky pozorovány v gyrus dentatus, a to především v infrapyramidálním listu.

4.1.2. Vliv NAAG na neurotransmiterové systémy u dospělých potkanů

Neonatální infuze NAAG snížila receptorově specifickou vazbu [³H]glutamátu do membrán hrubé synaptozomální frakce izolované z entorhinální kůry přibližně o 19 % (nepárový t-test, p < 0,05). V ostatních strukturách nebyla pozorována žádná statisticky významná změna ve vazbě [³H]glutamátu (Tabulka 2).

Specifická vazba [³H]glutamátu v přítomnosti agonistů NMDA, AMPA a kainátu (KA) ukázala, že NMDA složka tvoří přibližně 47 % z celkové vazby v mozku potkana.

Avšak u zvířat po podání NAAG byla statisticky významně zvýšena vazba v přítomnosti AMPA ve striatu. Celkový podíl vazby pro AMPA složku ve striatu byl 12 % u kontrol.

Tabulka 2. Vliv NAAG na specifickou vazbu [³H]glutamátu do synaptických membrán (P2 frakce) izolovaných z oblastí mozku potkana (50. PND).

	Kontrola fmol/mg proteinu	NAAG fmol/mg proteinu
Entorhinální kůra	828 ± 66	670 ± 23 *
Hipokampus	817 ± 43	854 ± 23
Striatum	413 ± 28	394 ± 39

*Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr osmi měření ze dvou nezávislých experimentů ± SEM. Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí nepárového t-testu; * p < 0,05.*

Vliv NAAG na hodnoty specifické vazby [³⁵S]TBPS do hipokampálních membrán izolovaných z potkanů 13., 16., a 54. PND ukazuje tabulka č. 4. Statisticky významné snížení vazby značeného ligandu na 68 % jsme zjistili u zvířat starých 54 dnů. Scatchardova analýza provedená s 1-50 nM [³⁵S]TBPS naznačila, že u zvířat starých 54 dnů bylo snížení vazby způsobeno zejména změnami v B_{max}.

U zvířat 60. PND po podání NAAG nebyla nalezena žádná změna v aktivitě HACU v pravém a levém hipokampu

Tabulka 4. Specifická vazba [³⁵S] TBPS na hipokampálních membránách 24 hodin, 96 hodin a 42 dní po icv infuzi NAAG .

Aplikace	Postnatální den	Počet zvířat	Vazba (fmol/mg)
KONTROLA	13. PND	4	33,5 ± 12,9
NAAG		4	43,7 ± 9,4
KONTROLA	16. PND	8	45,8 ± 11,2
NAAG		8	36,7 ± 11,9
KONTROLA	54. PND	8	47,8 ± 14,8
NAAG		8	32,5 ± 7,7*

*Hodnoty jsou vyjádřené jako průměry ± SEM a jsou získané ze dvou (13. PND a 16. PND) až třech nezávislých experimentů (54. PND). Statistická významnost * p < 0,05, nepárový t-test.*

4.1.3. Vliv NAAG na chování potkana

Sledovali jsme trvání, latence a frekvence těchto aktivit: hraní, vzdalování se, přelézání a podlézání, přiblížování se a čištění partnera. Trvání jednotlivých aktivit neukázalo žádnou statisticky významnou změnu mezi skupinou NAAG a kontrolními zvířaty. Přestože rozdíl v trvání aktivity přelézání a podlézání (sociální kontakt) mezi

NAAG skupinou a kontrolními zvířaty nebyl statisticky významný, našli jsme však statisticky významně sníženou latenci této aktivity u zvířat s NAAG aplikací.

Po podání NAAG 12. PND jsme nenalezli statisticky významné změny v trvání sledovaných aktivit v testu otevřeného pole u potkanů 35. PND. Lokomoční aktivita zůstala nezměněna. Žádné změny jsme nenalezli ani v latencích jednotlivých aktivit.

Vliv icv infuze NAAG na chování dospělých potkanů (50. PND) v testu otevřeného pole byl sledován ve stejném experimentálním uspořádání jako u zvířat 35. PND. Podání NAAG mělo významný vliv na trvání čištění (Tabulka 5). Trvání ostatních aktivit nevykázalo statisticky významné změny. Současně byla nalezena statisticky významně prodloužená latence větvení u skupiny NAAG ($27,2 \pm 7,1$ s kontrolou vs. $47,5 \pm 12,3$ s NAAG; * $p < 0,05$, nepárový t-test).

Tabulka 5. Vliv icv aplikace NAAG na chování 50.PND.

Skupina	Počet zvířat	Imobilita	Větvení	Čichání	Čištění
Kontrola	16	$24,3 \pm 12,8$	$34,4 \pm 5,3$	$166 \pm 7,9$	$6,6 \pm 2,1$
NAAG	16	$10,1 \pm 6,1$	$25,2 \pm 4,4$	$179,7 \pm 4,8$	$16,5 \pm 4,2$ *

*Hodnoty v sekundách jsou vyjádřeny jako průměr \pm S.E.M. * $p < 0,05$ nepárovým t-testem*

Neonatální icv infuze NAAG 12. PND však neměla statisticky významný vliv ani na úlekovou reakci, ani na prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI).

Výsledky týkající se prostorové paměti v Morrisově vodním bludišti ukázaly, že podání NAAG nepoškodilo referenční paměť u dospělých potkanů. Všechna zvířata byla schopná najít ostrůvek ve stanoveném limitu.

4.1.4. Vliv inhibitoru dopaminového transportéru (GBR 12909) na chování dospělého potkana v testu otevřeného pole a PPI po neonatální infuzi NAAG

Zvířata s aplikací NAAG + GBR 12909 (10 mg/kg i.p., 30 min před testem) vykazovala nižší trvání imobility při nezměněné lokomoční aktivitě ve srovnání s kontrolními zvířaty, kterým byl rovněž podán GBR 12909 (Tabulka 6). Také pokles trvání čištění u zvířat s aplikací NAAG byl statisticky významný. V latencích jednotlivých aktivit nebyly nalezeny žádné statisticky významné změny mezi skupinami.

Podání GBR 12909 (10 mg/kg i.p.) potkanům 50. PND, kterým byl podán NAAG nebo fyziologický roztok (kontrola), statisticky významně nezměnilo hodnoty PPI ani samotné úlekové reakce.

Tabulka 6: Vliv NAAG na trvání aktivit (v sekundách) v otevřeném poli u potkana 50. PND po i.p. podání GBR 12909 (10 mg/kg).

Skupina	Počet zvířat	imobilita	větření	čichání	čištění
Kontrola	6	36,5 ± 27,1	63,3 ± 10	117,8 ± 17,97	38,5 ± 16,7
NAAG	7	1,9 ± 1,8 ***	102 ± 13,9	129,1 ± 11,9	22,4 ± 6,4 *

Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM ze dvou nezávislých experimentů. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ ve srovnání s kontrolou (fyziologický roztok + GBR 1290), nepárový t-test.

4.1.5. Vliv dizocilpinu (MK-801) na chování a PPI u dospělého potkana po neonatální infuzi NAAG

Podání MK-801 (0,3 mg/kg i.p.) potkanům 50. PND výrazně změnilo chování v testu otevřeného pole jak zvířatům po podání NAAG, tak i po podání fyziologického roztoku. Nejvýraznější změnou bylo až 10-násobné navýšení lokomoční aktivity (ANOVA $F(3,39) = 10,1$; $p < 0,001$ a 2,5-násobné zvýšení čichání u obou skupin zvířat (Tabulka 7). Podání MK-801 statisticky významně snižuje počet vztyčování a čištění ve srovnání se zvířaty s odpovídající icv aplikací (NAAG nebo fyziologický roztok), tabulka 7. Podání MK-801 nemělo vliv na větření.

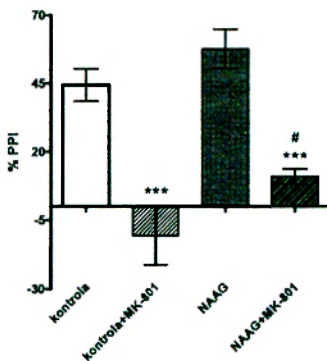
Vliv icv infuze NAAG na chování způsobené MK-801 byl patrný ze srovnání skupin kontrola+MK-801 a NAAG+MK-801 nepárovým t-testem, které ukázalo na statisticky významný rozdíl v imobilitě. Potkani s aplikací NAAG+MK-801 měli větší trvání imobility než příslušné kontroly ($p < 0,01$). Jiné statisticky významné rozdíly mezi skupinami kontrola+MK-801 a NAAG+MK-801 nebyly nalezeny.

Podání MK-801 (0,3 mg/kg i.p.) potkanům 50. PND, kterým byl neonatálně infundován fyziologický roztok, způsobilo výrazné snížení PPI, ANOVA ukázala na významný rozdíl ve skupině [$F_{3,37}=20,14$; $p < 0,001$], obrázek 2. U zvířat s aplikací NAAG+MK-801 byla statisticky významně zvýšená PPI ve srovnání se skupinou kontrola+MK-801. Samotná neonatální infuze NAAG neměla vliv na PPI. Amplituda úlekové reakce na 120 dB však zůstala nezměněna pro všechny experimentální skupiny.

Tabulka 7 Vliv dizocilpinu (MK-801) na trvání aktivit v sekundách v otevřeném poli (50. PND) po icv aplikaci NAAG 12. PND.

	IMOBILITA	ČICHÁNÍ	VĚTŘENÍ	ČIŠTĚNÍ
KONTROLA n = 10	64,5 ± 20 100 %	58,8 ± 3,3 100 %	95,4 ± 7,1 100 %	45,4 ± 12,9 100 %
KONTROLA + MK-801 n = 10	1,5 ± 1,5 2,3 % **	119,6 ± 8,5 150 % ***	74,1 ± 18,1 78 %	4,4 ± 2,7 9,8 % *
NAAG n = 10	66,5 ± 16,8 100 %	58,7 ± 6,7 100 %	106,6 ± 10,1 100 %	27,9 ± 11,7 100 %
NAAG + MK-801 n = 10	6,5 ± 4,6 ¹ 10 % ##	108,5 ± 8,9 185 % ##	88,8 ± 14,2 83 %	11,1 ± 4,9 40 % ns

Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM. Procenta vyjadřují trvání aktivit ve srovnání se skupinou zvířat bez aplikace MK-801 (100 %). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ ve srovnání se skupinou kontrola; ## $P < 0,01$ ve; ### $P < 0,001$ srovnání se skupinou NAAG post hoc Newman-Keuls test. ¹ Statisticky významné zvýšení imobility ve srovnání se skupinou kontrola+MK-801, nepárový t-test ($p < 0,01$).



Obrázek 2. Vliv MK-801 (0,3 mg/kg i.p.) 50. PND na prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI) u zvířat s neonatální icv infuzí NAAG/fyziologický roztok ve srovnání s kontrolou *** $p < 0,001$, ve srovnání s MK-801 # $p < 0,05$ post-hoc Newman-Keuls test.

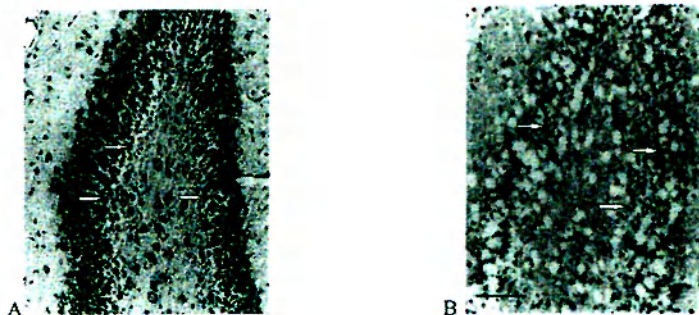
4.2. Porovnání dvou neurovývojových modelů schizofrenie založených na neonatálních lézích NAAG a kyselinou chinolinovou (QUIN)

4.2.1. Porovnání mozkového poškození po icv infuzi NAAG a QUIN

Rozsáhlejší poškození v mozku potkana ve srovnání s poškozením po podání NAAG bylo pozorováno 24 h po icv infuzi QUIN potkanům 12. PND (Obrázek 3). U potkanů 24 h po podání NAAG bylo poškození především v gyrus dentatus a v

dorzálním talamu, zatímco 24 h po podání QUIN bylo poškození pozorováno především v cingulární, motorické a v retrosplenální kůře, v septu, v dorzálním talamu a v hipokampu. U potkanů 96 h po podání QUIN bylo poškození mozku méně rozsáhlé, ale rozsáhlejší než u potkanů infundovaných NAAG. U dospělých potkanů (50. PND) jsme pozorovali poškozené neurony v retrosplenální kůře a hipokampu po neonatálním podání QUIN. Naopak žádné poškození ve sledovaných oblastech jsme nezjistili u dospělých potkanů po podání NAAG.

Dvojité barvení Hoechst 33342 a Fluoro Jade B ukázalo rozsáhlé neurodegenerativní poškození 24 h po icv infuzi QUIN. Barvením Hoechst 33342 jsme pozorovali tvorbu apoptotických tělísek a kondenzaci chromatinu způsobenou QUIN.



Obrázek 3. Ukázka poškozených buněk v hilu gyrus dentatus 24 h po podání NAAG (A) a QUIN (B). Bílé šipky označují poškozené buňky v granulární vrstvě a v hilu gyrus dentatus. Zvětšení je 200x.

4.2.2. Porovnání účinku NAAG a QUIN na neurotransmiterové systémy u dospělých potkanů

U potkanů po podání NAAG byla specifická vazba [³H]glutamátu snížena v entorhinální kůře o 20 %. Naopak u zvířat s icv infuzí QUIN byla statisticky významně snížena vazba ve frontální kůře, hipokampu a striatu v průměru o 40 % (Tabulka 8).

U zvířat s aplikací NAAG nebyla pozorována změna v aktivitě HACU. Naopak u zvířat po podání QUIN jsme zjistili výrazně sníženou aktivitu HACU v levém hipokampu (Tabulka 9). Sníženou aktivitu HACU doprovázelo i snížení vazby [³H]hemicholinia-3 o 30 %. Tyto výsledky ukazují na snížení počtu transportérů a aktivity HACU v levém hipokampu.

Tabulka 8. Vliv QUIN na vazbu [³H]glutamátu do membrán hrubé synaptosomální frakce z frontální kůry, hipokampální formace a striata 38. dní po infuzi QUIN, nebo fyziologického roztoku 12. PND.

	Kontrola fmol/mg proteinu	QUIN fmol/mg proteinu	
Frontální kůra	1068 ± 49	603 ± 8	***
Hipokampus	1199 ± 28	718 ± 21	***
Striatum	578 ± 23	383 ± 14	***

*Hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr z osmi měření ± SEM ve dvou nezávislých experimentech *** p < 0,001 nepárový t-test.*

Tabulka 9. Účinek QUIN na vysokoafinitní transport cholinu (HACU) v levém a pravém hipokampu dospělého potkana.

Skupiny (n)	%	Pravý hipokampus	Levý hipokampus
		fmol/4 min/mg proteinu	
KONTROLA(6)	126 ± 18,6	212,2 ± 23,2	267,3 ± 49,6
QUIN(6)	90,8 ± 15,1 **	197 ± 35,8	180,8 ± 48,9 *

*Procenta vyjadřují poměr mezi levým a pravým hipokampem. Průměr absolutních hodnot HACU ± SD byl spočítán pro pravý a levý hipokampus zvlášť. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátech. * p < 0,05 *** p < 0,01 ve srovnání s kontrolními zvířaty, nepárový t-test.*

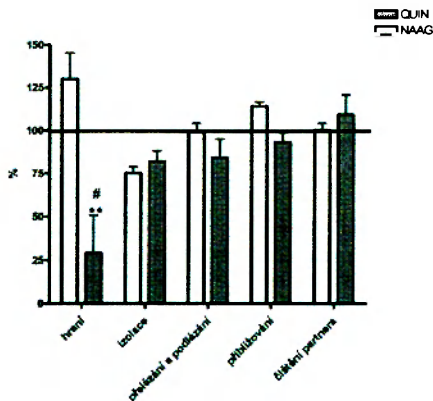
4.2.3 Porovnání účinku NAAG a QUIN na chování potkana

Celkové změny v trvání jednotlivých aktivit hravého chování a sociální interakce byly malé. Statisticky významný [F_{3,39} = 5,8, p < 0,01] rozdíl mezi skupinami QUIN a NAAG byl v trvání hravého chování. Pro aktivitu hraní byl nalezen statisticky významný rozdíl. Post-hoc test ukázal statisticky významné snížení této aktivity po aplikaci QUIN ve srovnání s příslušnou kontrolou (Obrázek 4).

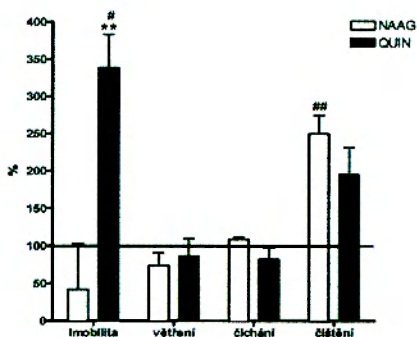
Vyhodnocení one-way ANOVA [F_{3,15} = 1,4] neukázalo statisticky významný rozdíl mezi skupinami ve sledovaných aktivitách u potkanů 35. PND. Také lokomoční aktivita měřena jako počet prošlých čtvrců zůstala nezměněna jak po podání NAAG, tak QUIN. Naopak u potkanů 50. PND srovnání zvířat s aplikací NAAG a QUIN ukázalo statisticky významné prodloužení trvání imobility u potkanů s QUIN [F_{3,51} = 4,59, p < 0,01] jak ve srovnání s kontrolními zvířaty (p < 0,05), tak se skupinou NAAG (p < 0,01), obrázek 5. Statisticky významné prodloužení doby čištění jsme pozorovali u zvířat po podání NAAG ve srovnání s příslušnou kontrolní skupinou.

Po icv infuzi NAAG nedošlo k žádnému poškození referenční paměti u dospělých potkanů. Naopak podání QUIN způsobilo statisticky významné prodloužení (F (4,62) =

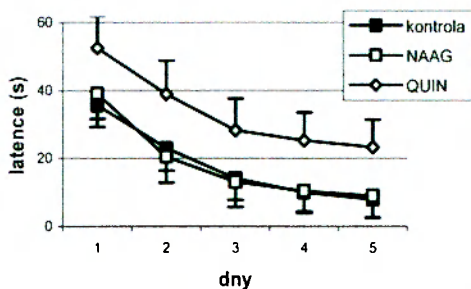
3,72; $p = 0,009$] latence dosažení ostrůvku, což svědčí pro poškození prostorového učení a referenční paměti (Obrázek 6).



Obrázek 4. Vliv infuze NAAG a QUIN 12. PND na trvání hrani, izolace a sociálních aktivit (přelézání + podlézání, přiblížování, čistění partnera) 22. PND. Hodnotu 100 % představují příslušné kontrolní skupiny ($n=10$ párů). Procenta byla počítána z průměrných hodnot získaných ze tří nezávislých experimentů. # $p < 0,05$ ve srovnání s kontrolou; ** $p < 0,01$ porovnání QUIN versus NAAG post-hoc Newman-Keuls testem.



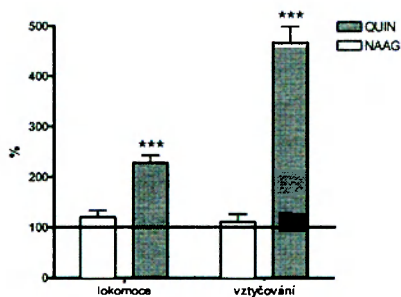
Obrázek 5. Vliv NAAG a QUIN na trvání aktivit v testu otevřeného pole 50. PND. Hodnotu 100 % mají příslušné kontroly. Procenta byla počítána z průměrných hodnot (9-14 zvířat) ze třech nezávislých experimentů. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ ve srovnání s kontrolou, ** $p < 0,01$ QUIN versus NAAG post-hoc Newman-Keuls testem.



Obrázek 6. Latence nalezení skrytého ostrůvku v Morrisově vodním bludišti. Všechna zvířata byla schopná najít ostrůvek ve stanoveném limitu. Podání QUIN ($n=16$) zhoršilo prostorovou paměť a učení, NAAG ($n=10$) neovlivnil dlouhodobou paměť ve srovnání s kontrolními potkany ($n=22$).

4.2.4. Vliv GBR 12909 na chování dospělých potkanů v otevřeném poli po neonatálním podání NAAG nebo QUIN

Srovnání zvířat po podání NAAG a QUIN vůči jednotlivým kontrolám ukázalo na statisticky významné snížení včtení [$F_{3,45} = 4,34$, $p < 0,01$] u skupiny QUIN ve srovnání se skupinou NAAG (Obrázek 7). Naopak explorační aktivita (frekvence přechod čtverců [$F_{3,45} = 12,75$, $p < 0,001$] a vztyčování [$F_{3,45} = 55,5$, $p < 0,001$]) byly zvýšeny u zvířat s aplikací QUIN ve srovnání se zvířaty aplikovanými NAAG.



Obrázek 7. Vliv GBR 12909 po infuzi NAAG a QUIN 12. PND na trvání aktivit v testu otevřeného pole. Hodnotu 100 % mají příslušné kontroly. Procenta byla počítána z průměrných hodnot (9-14 zvířat) ze třech nezávislých experimentů. ** $p < 0,01$ srovnání QUIN vs. NAAG.

5. DISKUZE

5.1. Poškození jeho kvantitativní hodnocení a charakter buněčné smrti po neonatální icv infuzi NAAG v průběhu ontogeneze potkana.

Naším cílem bylo vytvořit neurovývojový model schizofrenii podobného chování icv infuzí N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamátu (NAAG), který je agonistou mGluR II a ve vyšších dávkách také aktivuje NMDA receptory přímo, nebo prostřednictvím glutamátu.

Zánik neuronů po neonatálním podání NAAG jsme doložili Nisslovým barvením a specifickým barvením znázorňujícím zanikající neurony, a to Fluoro-Jade B v kombinaci s DNA barvivem (Hoechst 33342). Kvantitativní analýza poškozených neuronů v hipokampu 24 h po icv infuzi NAAG ukázala na nejvyšší poškození v infrapyramidálním listu gyrus dentatus, a to v dorzálním i ventrálním hipokampu. Neurodegenerativní poškození způsobené NAAG se zmenšovalo v průběhu ontogeneze potkana. Tyto výsledky ukazují na značnou plasticitu nervového systému. Pozorované poškození s maximem do 24 hodin pravděpodobně souvisí s velkou citlivostí neuronů v gyrus dentatus, která je 12. PND podmíněna zvýšenou expresí NMDA receptorů. V hipokampu je v období prvních postnatálních týdnů u potkana větší exprese NR2D podjednotek (Ritter et al., 2001). Právě aktivace NMDA receptorů vysokými koncentracemi NAAG, které exprimují NR2D podjednotku, může vést k poškození neuronů v gyrus dentatus (Hess et al., 1999). V literatuře byl popsán neurovývojový model schizofrenii-podobného chování, který je založen na excitotoxickém poškozením vývíjecího se mozku potkana intracerebroventrikulárním podáním (10 a 50 nmol/komora) kyseliny kainové (Csemansky et al., 1998). V tomto modelu podání kyseliny kainové potkanům 7. PND poškodilo tkáň hipokampu, a to především pyramidových buněk v oblastech CA1, CA3a a CA3c. Kvantitativní hodnocení ukázalo největší poškození 24 h po icv infuzi kainové kyseliny v oblasti CA3a. Použití TUNEL barvení naznačuje také možný zánik neuronů apoptotickou cestou v oblastech CA3 a v CA1 (Humphrey et al., 2002). Po icv infuzi kyseliny kainové 7. PND bylo také ukázáno zvýšení proliferace v gyrus dentatus (barvení 5-bromodeoxyuridinem) 40.-60. PND, což ukázalo na možnou reparaci poškozené tkáně.

Naše výsledky s NAAG-indukovanou lézí ukázalo na možnost, že excitotoxické poškození mozku v časném postnatálním období provází převaha apoptózy nad nekrotózou.

5.2. Vliv neonatálního podání NAAG na neurotransmiterové systémy dospělého potkana

Naše výsledky ukazují, že léze navozená NAAG vede k mimému buněčnému poškození, a také ke změně glutamatergního systému dospělého potkana. Snížená specifická vazba [^3H]glutamátu byla nalezena jen v entorhinální kůře u dospělých potkanů (50. PND). Entorhinální kůra patří funkčně do hipokampální formace (Amaral a Witter, 1995) a je propojena excitační, perforující nervovou dráhou s gyrus dentatus. Je tedy možné, že nalezené poškození v granulární vrstvě gyrus dentatus mělo zpětný vliv na vývoj glutamatergního systému. Naopak jsme nepozorovali žádné změny v aktivitě vysoko-afinitního transportu u dospělých potkanů (60. PND).

Neonatální icv infuze NAAG změnila vývoj GABAergního systému v hipokampu dospělého potkana. Výrazné snížení vazby [^{35}S]TBPS a snížení B_{max} a K_D u dospělých jedinců je pravděpodobně kompenzačním mechanismem v důsledku dlouhodobě zvýšené hladiny GABA související se změnou vývoje celého GABAergního systému po neonatálním podání NAAG. Nejčastěji se GABAergní neurony nacházejí v hipokampu na vnitřní straně granulární vrstvy obou listů v hilu gyrus dentatus a také v jeho stratum moleculare.

Výsledky studie, ve které byla podána kyselina kainová (7. PND), popisují snížený počet GABAergních interneuronů pozitivních na kalbindin 40. a 60. PND ve stratum radium, v oblasti CA1 a CA3 (Dong et al., 2003). Také neonatální excitotoxická léze ventrálního hipokampu kyselinou ibotenovou způsobila změnu GABAergního systému a to snížení hladiny mRNA pro GAD67 (glutamátdekarboxyláza-67) v substantia nigra a ve ventrální tegmentální oblasti (Lipska et al., 2003). Je tedy možné, že excitotoxická neonatální léze vede obecně k časnému poškození GABAergního systému mozku.

5.3. Vliv neonatálního podání NAAG na chování potkana

Na základě neurovývojové hypotézy schizofrenie jsme chtěli ukázat, že navození excitotoxické léze NAAG v časném postnatálním období potkana povede ke změně hravého a sociálního chování u potkanů 22. PND. Neonatální aplikace NAAG však nevedla k poškození ani hravého chování ani sociální interakce v prepubertálním období u potkana.

V období puberty (35. PND) i v časné dospělosti potkana (50. PND) jsme sledovali chování v otevřeném poli jako reakci potkana na nové prostředí. Test otevřeného pole se často používá ke sledování emoční reaktivity, lokomoční aktivity a explorační aktivity potkana (Alleva a Sorace, 2000). V experimentálním uspořádání, kde zvířata byla umístěna do rovnoměrně osvětlené arény kterou neznala, přičemž chování se sledovalo v krátkém časovém úseku, jsme mohli explorační aktivitu (čichání, vztyčování)

korelovat s úrovní hledání nového (O'Keef a Nadel, 1978). Po icv infuzi NAAG však nebyly nalezeny žádné změny v chování v otevřeném poli 35. PND.

Naopak po dosažení pohlavní dospělosti (50. PND) bylo nalezeno statisticky významné zvýšení aktivity čištění u zvířat po podání NAAG ve srovnání s kontrolou. Čištění je aktivita, kterou potkani vykazují pokud se cítí v bezpečí a v dobře známém prostředí (Whishaw et al., 1999). V našem experimentálním uspořádání byl pro zvířata test otevřeného pole v novém prostředí také zátěžovou až stresující situací a změny v tomto testu ukázaly jak reagují zvířata na mírný stres. Z tohoto ohledu by zvýšené trvání čištění mohlo znamenat zvýšenou anxieta (Komorowska a Pellis, 2004).

V období časně dospělosti jsme sledovali také vliv neonatální léze NAAG na úroveň zpracování sensorimotorických informací pomocí testu prepulzni inhibice úlekové reakce (PPI). Prepulzni inhibice úlekové reakce je definována jako schopnost slabého zvukového podnětu inhibovat motorickou odpověď na intenzivní úlekový podnět (Koch, 1999). Snížení PPI je často dokumentovaným jevem u pacientů se schizofrenií a jejich příbuzných a považuje se za neurobiologický ukazatel tohoto onemocnění (Bubeníková et al., 2002). Zvířata s neonatální NAAG lézí dokázala v časně dospělosti zpracovávat sensorimotorické informace stejně jako kontrolní zvířata.

U mladých jedinců (60-65. PND) byla měřena schopnost učení po neonatální lézi NAAG v Morrisově vodním bludišti se skrytým ostrůvkem. U zvířat s icv infuzí NAAG nebyla pozorována žádná změna v učení ve srovnání s kontrolními zvířaty. V daném experimentálním uspořádání se u zvířat vedle schopnosti učení sledovala především referenční paměť. Poškození prostorové referenční paměti ani učení nebylo nalezeno u pacientů se schizofrenií (McGurk et al., 2004).

Pozdní vliv neonatální excitotoxické léze na chování potkana byl také pozorován u potkanů po neonatální lézi kyselinou ibotenovou. Tyto potkani vykazovali 56. PND hyperlokomoci a deficit v PPI (Lipska et al., 1995; Sams-Dodd et al., 1997). Také neonatální excitotoxická léze kyselinou kainovou (7. PND) měla za následek pokles PPI u dospělých potkanů (56. PND) (Howland et al., 2004).

5.4. Vliv neonatální icv infuze NAAG na chování a PPI dospělého potkana po akutní aplikaci inhibitoru dopaminového transportéru (GBR 12909)

Senzitizace mesolimbického dopaminergního systému je spojována s výskytem pozitivních symptomů u schizofrenie (Grace, 1991). Amfetamin zvyšuje extracelulární hladinu dopaminu jak stimulací výdeje dopaminu z vezikulárních váček, tak i přes dopaminový transportér (Jones et al., 1988). Současně však zvyšuje výdej noradrenalinu a serotoninu (Rothman et al., 2001).

V našem experimentálním uspořádání jsme použili selektivní inhibitor dopaminového transporteru, GBR 12909. Tato látka zvyšuje extracelulární hladiny dopaminu ve striátu a nucleus accumbens (Rahman et al., 2001). Předpokládali jsme, že u zvířat, kde byl navozen schizofrenii podobný stav, budeme po podání GBR 12909 pozorovat větší změny v chování v testu otevřeného pole. Pro tento účel byla zvířata už habituována na experimentální arénu. U zvířat s lézí NAAG jsme pozorovali po podání GBR 12909 statisticky významné snížení trvání imobility bez zvýšení lokomoční aktivity. Také trvání aktivity čištění bylo u těchto zvířat sníženo ve srovnání s kontrolními zvířaty, kterým byl podán GBR 12909. Naše výsledky tak dokládají zvýšenou citlivost NAAG-infundovaných zvířat na zvýšené extracelulární hladiny dopaminu. Avšak nenalezli jsme žádnou změnu v úrovni PPI u potkanů s icv infuzí NAAG, kterým jsme podali GBR 12909 v časně dospělosti. Tyto výsledky ukazují na rozdíly mezi amfetaminem a GBR 12909. Podání amfetaminu vede k poškození PPI u potkanů i lidí (Swerdlow et al., 2003). Amfetamin je však nejčastěji experimentálně užívaná látka ve studiích týkajících se schizofrenie. Také zvýšená senzitivita na amfetamin byla popsána u dospělých potkanů po neonatální lézi ventrálního hipokampu kyselinou ibotenovou (Lipska et al., 1993).

5.5. Vliv akutního podání dizocilpinu (MK-801) na chování a PPI reakci dospělého potkana po neonatální lézi NAAG

V této studii bylo uspořádání pokusu takové, že měřilo chování potkana již adaptovaného na prostředí experimentální arény. V souladu s literaturou (Jentsh a Roth, 1999) byl v našem experimentu pozorován velmi výrazný vliv MK-801 na chování potkana v otevřeném poli. Akutní, systémové podání MK-801 prodloužilo trvání čichání a počet přeběhů čtverců v testu otevřeného pole. Naopak vedlo ke snížení trvání imobility a počtu vztyčování.

Srovnání dospělých potkanů s neonatální lézí NAAG a odpovídajícími kontrolami, kterým byla podána MK-801, ukázalo na statisticky významné prodloužení imobility u NAAG skupiny. Tento výsledek ukazuje na menší odpověď těchto zvířat po podání dizocilpinu. Dále, neonatální infuze NAAG vedla ke zlepšení deficitu PPI způsobeném MK-801 v časně dospělosti potkana. Naše výsledky ukazují, že přestože neonatální zvýšení hladin NAAG v mozku vede k jeho poškození, především gyrus dentatus, dospělé jedince chrání proti negativnímu účinku MK-801 na zpracování senzomotorických informací.

Možným, mechanismem, který vysvětluje námi pozorované výsledky, je změna podjednotkového složení NMDA receptorů během vývoje mozku potkana. NAAG působí především na ty NMDA receptory, které obsahují NR2D podjednotku (Hess et

al., 1999). Exprese NMDA receptorů s touto podjednotkou je zvýšená během I. týdne postnatálního období potkana (Ritter et al., 2001). Zvýšená aktivace NMDA receptorů určitého složení během časného postnatálního vývoje může vést ke změně podjednotkového složení NMDA receptorů v časně dospělosti potkana a způsobit tak změnu citlivosti na vazbu MK-801. Druhým možným vysvětlením je vliv NAAG na vývoj GABAergního systému. NMDA receptory se vyskytují na GABAergních neuronech (Green, 2001). Excitotoxické poškození těchto neuronů může vést ke změně ve vývoji GABAergního systému, protože tento inhibiční systém v mozku funkčně a strukturálně dozrává u potkana až po druhém postnatálním týdnu (Frank a Draguhn, 2001).

5.6. Porovnání mozkového poškození a charakteristiky buněčného poškození po NAAG a QUIN.

Neurovývojový model schizofrenie vyvinutý navozením neonatální excitotoxické léze NAAG byl porovnán s dalším modelem vyvinutým v naší laboratoři Biochemie a patofyziologie mozku v Psychiatrickém centru Praha. Tento model je založen na podání QUIN do mozkových komor o stejné koncentraci jako byl infundován NAAG, a to 12. PND.

QUIN je jedním z metabolitů odbourávání L-tryptofanu kynureninovou cestou a je produkován aktivovanou mikroglií. Zvýšená produkce QUIN aktivovanou mikroglií a makrofágy vede k produkci chemokinů, které zvyšují přestup leukocytů a makrofágů z krevního řečiště do mozku a tím zvyšuje také produkci dalších cytokinů (IL-6) a zánětlivou reakci (Schiefer et al., 1998). Prozánětlivé cytokiny také aktivují apoptózu (Gilman a Mattson, 2002). Neonatálně zvýšené hladiny QUIN provázejí zánětlivou reakci v časném postnatálním období potkana.

Porovnání regionálního rozložení mozkového poškození mezi NAAG-aplikovanými potkany a QUIN-aplikovanými potkany ukázalo na rozsáhlejší poškození v cingulární, motorické, retrosplenální kůře a hipokampu u potkanů 24 a 96 h po neonatálním podání QUIN. V protikladu s nálezy u NAAG-aplikovaných zvířat jsme pozorovali přetrvávající poškození v retrosplenální kůře u dospělých potkanů.

Nisslovo barvení ukázalo výraznou kondenzaci chromatinu v neuronech hipokampu po podání QUIN. Poškozené neurony (barvení Fluoro Jade B a Nisslovo barvení) nebyly omezeny jen na gyrus dentatus jako u zvířat s NAAG-aplikací. Na fezech barvených Hoechst 33342 jsme dokumentovali také tvorbu apoptotických tělísek, která nebyla viděna u potkanů s lézí NAAG. Neurony po neonatálním podání QUIN tedy také umírají apoptotickou smrtí.

Rozsáhlejší poškození po neonatální infuzi QUIN souvisí s aktivací NMDA receptorů, především těch s NR2A a NR2B podjednotkami. Právě NR2B podjednotka je nejčastěji se vyskytující podjednotkou v mozku v časně postnatálním období u potkana (Luján et al., 2005).

5.7. Porovnání vlivu NAAG a QUIN na neurotransmiterové systémy v mozku dospělého potkana.

V porovnání s neonatální icv infuzí NAAG je poškození glutamatergního systému u dospělých potkanů mnohem rozsáhlejší. Neonatální aplikace QUIN vede ke statisticky významnému snížení vazby [³H]glutámatu ve všech měřených oblastech mozku průměrně o 40 %.

Výrazné snížení vazby [³H]glutámatu a tedy možné snížení vazebných míst pro glutamát u dospělých potkanů ukazuje na dlouhodobě zvýšené hladiny glutamátu uvolněného z poškozených buněk. Snížení vazebných míst pro glutamát bychom mohli vysvětlit jako kompenzační mechanismus na tuto zvýšenou hladinu. Následné pokusy tento předpoklad nepotvrdily (Šťastný et al., 2005). Je proto pravděpodobné, že rozsáhlá neurodegenerace v mozku potkana pozorovaná po neonatálním podání QUIN poškodí buňky exprimující NMDA receptory a tím naruší další vývoj glutamatergního systému.

Neonatální podání NAAG nezpůsobilo žádné změny v aktivitě HACU. Poškození transportéru po neonatální lézi QUIN jsme pozorovali v levém hipokampu.

Na⁺-dependentní HACU systém je lokalizován na presynaptických cholinergních zakončeních a podílí se na syntéze acetylcholinu (Simon et al., 1976). Pro celkové ovlivnění cholinergního systému svědčí nálezy, že icv infuze QUIN snížila aktivitu acetylcholintransferázy a vazbu [³H]hemicholinia-3 (Yamada et al., 1990). Snížení aktivity HACU a vazby [³H]hemicholinia-3, které souvisí s úbytkem cholinergních zakončení v hipokampu bylo dokumentováno i u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Křištofiková et al., 1993).

5.8. Porovnání účinku NAAG a QUIN na chování potkanů

U zvířat s infuzí QUIN jsme zjistili významný deficit v trvání hravého chování v porovnání jak s kontrolními zvířaty, tak se zvířaty po podání NAAG. Hravé chování potkana je důležité pro vzájemnou komunikaci potkanů, pro určení sociální hierarchie a pro nácvik sociálních dovedností (Van den Berg et al., 1999). Deficit v hravém chování u zvířat s lézí QUIN svědčí pro poškození sociálních interakcí již v časném postnatálním období a může být příčinou přetrvávajícího sociálního deficitu v dospělosti. Deficit v sociálním chování byl pozorován i u dětí, které v dospělosti

onemocněly schizofrenií. Tento projev je jedním s prediktivních nálezů pozorovaných u schizofrenie (Schiffman et al., 2004). Ve srovnání s potkany po podání NAAG neonatální podání QUIN vede k deficitu v sociálním a hravém chování mláďat potkana. Ostatní sociální interakce zůstaly nezměněny.

Chování zvířat po podání NAAG a QUIN v testu otevřeného pole po dosažení pohlavní dospělosti (50. PND), bylo v mnoha ohledech významně odlišné od chování zvířat v období puberty. V období časně dospělosti bylo nalezeno statisticky významné prodloužení trvání imobility u zvířat po podání QUIN, a to jak v porovnání s kontrolami, tak i s potkany po podání NAAG.

Imobilita souvisí s lokomoční aktivitou potkana. Postupně se zvyšující imobilita v prepubertálním období dosáhla statistické významnosti v časně dospělosti potkana. Prodloužení imobility u potkanů po podání QUIN ukazuje na zvýšené defenzivní reakce potkana, až na jeho úzkostné chování. Vyšší imobilita v novém neznámém prostředí také může znamenat i snížení explorační aktivity. Přestože neonatální podání NAAG a QUIN ovlivňuje jiné typy chování v novém prostředí (imobilitu a čištění), mohli bychom toto chování charakterizovat jako úzkostné.

V porovnání s potkany po podání NAAG, měli potkani po podání QUIN výrazně delší latence při hledání skrytého ostrůvku, ale stále se učili. Tyto výsledky svědčí pro poškození referenční paměti u potkanů po podání QUIN. Přitom je známo, že pro deficit v referenční paměti potkana je potřeba rozsáhlého poškození obou hipokampů (Fenton a Bures, 1993). Naše výsledky ukazují na větší funkční poškození hipokampů po podání QUIN v porovnání s NAAG-operovanými potkany. Řešení prostorových úkolů v Morrisově vodním bludišti je současně velmi citlivé na poškození cholinergního a glutamatergního systému (Fishkin et al., 1993; Stuchlik et al., 2004). Neonatální icv infuze QUIN snížila aktivitu HACU v levém hipokampu u dospělých potkanů a současně snížila vazbu [³H]glutamátu v obou hipokampech. Je tedy možné, že právě poškození vývoje cholinergního a glutamatergního systému je zodpovědné za pozorovaný deficit prostorové referenční paměti. Naopak zvířata po NAAG nemají poškozenou referenční paměť ani cholinergní systém a jen velmi málo mají poškozený systém glutamatergní.

5.9. Vliv GBR 12909 na chování dospělého potkana v otevřeném poli po podání NAAG a QUIN

Potkani s lézí QUIN měla po podání GBR 12909 výrazně zvýšenou lokomoční aktivitu (horizontální explorační aktivita) i vztyčování (vertikální explorační aktivita) ve srovnání s NAAG-operovanými zvířaty. Tyto výsledky ukazují na zvýšenou citlivost

zviřat s neonatální lézí QUIN v odpovědi na podání inhibitoru dopaminového transportu GBR 12909.

6. ZÁVĚR

Na podkladě výše uvedených nálezů lze uzavřít, že neonatální léze způsobená icv podáním QUIN i NAAG změní chování potkana v jeho časné dospělosti, a také zvýší reakci potkana po podání inhibitoru dopaminového transportéru v testu otevřeného pole. Tyto projevy vykazují vzhledem ke známé etiopatogenezi schizofrenie konstruktivní a fenomenologickou validitu. Některé specifické nálezy jako je omezení poškozených neuronů v granulární vrstvě gyrus dentatus 24 hodin po infuzi NAAG, snížení počtu GABA_A receptorů v hipokampu dospělého potkana nebo snížení citlivosti NAAG-infundovaných potkanů na stimulační účinky MK-801, svědčí pro specifický účinek NAAG v časném postnatálním období potkana. Tyto účinky NAAG jsou pravděpodobně způsobeny jeho interakcí s NMDA receptory, které exprimují NR2D podjednotku. Právě exprese této podjednotky je u potkana největší v 1. postnatálním týdnu a v průběhu ontogeneze výskyt této podjednotky v mozku klesá. Naopak rozsáhlé poškození korových i podkorových oblastí po neonatální infuzi QUIN, které má za následek snížení hravého chování u mladých potkanů, poškození cholinergního a glutamatergního systému a zároveň paměti v Morrisově vodním bludišti u dospělých potkanů je důsledkem aktivace NMDA receptorů, které obsahují NR2B podjednotky. Tyto podjednotky jsou ve větším množství, než podjednotky NR2D, exprimovány v časném postnatálním období potkana.

7. SEZNAM LITERATURY

1. Alleva E, Sorace A 2000 Important hints in behavioural teratology of rodents. *Curr Pharm Des* 6:99-126.
2. Amaral DG, Witter MP 1995 The hippocampal formation In: *The Rat Brain Paxinos G* (Ed), Academic Press 2nd edition, 443-493.
3. Anderson A, Boyd AC, Byford A, Campbell AC, Gemmell DK, Hamilton NM, Hill DR, Hill-Venning C, Lambert JJ, Maidment MS, May V, Marshall RJ, Peters JA, Rees DC, Stevenson D, Sundaram H 1997 Anesthetic activity of novel water-soluble 2 beta-morpholinyl steroids and their modulatory effects at GABAA receptors. *J Med Chem* 40:1668-1681.
4. Bachevalier J, Alvarado MC, Malkova L 1999 Memory and socioemotional behavior in monkeys after hippocampal damage incurred in infancy or in adulthood. *Biol Psychiatry* 43:436-445.
5. Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
6. Bubeniková V, Horáček J, Šťastný F 2002 Prepulzní inhibice úlekové reakce jako deficitu zpracování informací. *Psychiatrie* 6:29-32.
7. Bubeniková V, Votava M, Horáček J, Páleníček T, Dockery C 2005 The effect of zotepine, risperidone, clozapine and olanzapine on MK-801-disrupted sensorimotor gating. *Pharmacol Biochem Behav* 80:591-596.
8. Catania MV, Landwehrmeyer G, Testa CM, Standaert DG, Penney JB, Young AB 1994 Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience* 61:481-495.
9. Coyle JT, Tsai G, Goff D 2004 Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann NY Acad Sci* 1003:318-327.
10. Csernansky JG, Csernansky CA, Kogelman L, Montgomery EM, Bardgett ME 1998 Progressive neurodegeneration after intracerebroventricular kainic acid administration in rats: implications for schizophrenia? *Biol Psychiatry* 44:1143-1150.
11. Dong H, Csernansky CA, Chu Y, Csernansky JG. 2003 Intracerebroventricular kainic acid administration to neonatal rats alters interneuron development in the hippocampus. *Dev Brain Res* 145:81-92.
12. Erlenmeyer-Kimling L, Rock D, Roberts SA, Janal M, Kestenbaum C, Cornblatt B, Adamo UH, Gottesman II 2000 Attention, memory, and motor skills as childhood predictors of schizophrenia-related psychoses: the New York High-Risk Project. *Am J Psychiatry* 157: 1416-1422.
13. Fenton AA, Bures J 1993 Place navigation in rats with unilateral tetrodotoxin inactivation of the dorsal hippocampus: place but not procedural learning can be lateralized to one hippocampus. *Behav Neurosci* 107:552-564.
14. Fernandes AM, Maurer-Morelli CV, Campos CB, Mello ML, Castilho RF, Langone F 2004 Fluoro-Jade, but not Fluoro-Jade B, stains non-degenerating cells in brain and retina of embryonic and neonatal rats. *Brain Res* 1029:24-33.
15. Fishkin RJ, Ince ES, Carlezon WA Jr, Dunn RW 1993 D-cycloserine attenuates scopolamine-induced learning and memory deficits in rats. *Behav Neural Biol* 59:150-157.
16. Flores G, Wood GK, Liang JJ, Quirion R, Srivastava LK 1996 Enhanced amphetamine sensitivity and increased expression of dopamine D2 receptors in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 16:7366-7375.
17. Frank C, Draguhn A 2001 GAD and GABA transporter (GAT-1) mRNA expression in the developing rat hippocampus. *Dev Brain Res* 132: 1-13.
18. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA 1992 Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.
19. Gilman CP, Mattson MP 2002 Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? *Neuromolecular Med* 2:197-214.
20. Goldman PS 1971 Functional development of the prefrontal cortex in early life and the problem of neuronal plasticity. *Exp Neurol* 32:366-387.
21. Goldman PS 1971 Functional development of the prefrontal cortex in early life and the problem of neuronal plasticity. *Exp Neurol*;32:366-387
22. Grace AA 1991 Phasic versus tonic dopamine release and modulation of dopamine system responsivity: A hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neurosci* 41:1-24.
23. Green R 2001 Circuit analysis of NMDAR hypofunction in the hippocampus, in vitro, and psychosis of schizophrenia. *Hippocampus* 11:569-577.
24. Harrison PJ, Owen MJ 2003 Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 361:417-419

25. Heaton R, Paulsen JS, McAdams LA, Kuck J, Zisook S, Braff D, Harris J, Jeste DV. 1994 Neuropsychological deficits in schizophrenics. Relationship to age, chronicity, and dementia. *Arch Gen Psychiatry* 51:469-476.
26. Hess SD, Pasieczny R, Rao SP, Jachec C, Varny MV, Johnson EC 1999. Activity of *N*-acetylaspartylglutamate at human glutamate receptors. *Soc Neurosci Abstr* 25:975
27. Hoschl C, Libiger J, Švestka J 2004 *Psychiatrie*. Tígs 2. vydání. pp 352-412.
28. Howland JG, Hannesson DK, Phillips AG. 2004 Delayed onset of prepulse inhibition deficits following kainic acid treatment on postnatal day 7 in rats. *Eur J Neurosci* 20:2639-2648
29. Humphrey WM, Dong H, Csernansky CA, Csernansky JG. 2002 Immediate and delayed hippocampal neuronal loss induced by kainic acid during early postnatal development in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 137:1-12.
30. Jentsch JD, Roth RH 1999 The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20:201-225.
31. Jhamandas KH, Boegman RJ, Beninger RJ 1994 The 1993 Upjohn Award Lecture. Quinolinic acid induced brain neurotransmitter deficits: modulation by endogenous excitotoxin antagonists. *Can J Physiol Pharmacol* 72:1473-1482.
32. Jones S, Gainetdinov R, Wightman M, Caron M. 1988 Mechanism of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J Neurosci* 18:1979-1985.
33. Keshavan MS 1999 Development, disease and degeneration in schizophrenia: a unitary pathophysiological model. *J Psychiatr Res* 33:513-521.
34. Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B 1980 Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett* 20:379-82.
35. Koch M 1999 The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology* 59:107-128.
36. Koller KJ, Coyle JT 1984 Ontogenesis of *N*-acetyl-aspartate and *N*-acetyl-aspartyl-glutamate in rat brain. *Brain Res* 317:137-140.
37. Komorowska J, Pellis SM 2004 Regulatory mechanisms underlying novelty-induced grooming in the laboratory rat. *Behav Processes* 67:287-293.
38. Křištofiková Z, Benešová O, Tejkalová H 1993 Comparison of the effects of aging *in vivo* and of oxygen free radicals *in vitro* on high-affinity choline uptake and hemicholinium-3 binding in the rat brain. *Arch Gerontol Geriatr* 17:179-188.
39. Lipska BK, Weinberger DR. 1993 Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Dev Brain Res* 75:213-222.
40. Lipska BK, Swerdlow NR, Geyer MA, Jaskiw GE, Braff DL, Weinberger DR. 1995 Neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats causes postpubertal changes in prepulse inhibition of startle and its disruption by apomorphin. *Psychopharmacology* 27:47-54.
41. Lipska BK, Lerman DN, Khaing ZZ, Winberger DR. 2003 The neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: effects on dopamine and GABA mRNA markers in the rat midbrain. *Eur J Neurosci* 18:3097-3104.
42. Lisy V, Dvorakova L, Stastny F 1994 Altered glutamate binding following quinolinate lesions in developing rat brain. *Exp Neurol* 125:82-86.
43. Losi G, Vicini S, Neale J 2004 NAAG fails to antagonize synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in cerebellar granule neurons. *Neuropharmacology* 46:490-496.
44. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
45. Lujan R, Shigemoto R, Lopez-Bendito G 2005 Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130:567-580.
46. McGurk SR, Coleman T, Harvey PD, Reichenberg A, White L, Friedman J, Parrella M, Davis KL 2004 Working memory performance in poor outcome of schizophrenia: relationship to age and executive functioning. *J Clin Exp Neuropsychol* 26:153-160.
47. Meltzer HY, McGurk SR 1999 The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 25:233-55.
48. Miyake M, Kakimoto Y, Sorimachi M 1981 A gas chromatographic method for the determination of *N*-acetyl-L-aspartic acid, *N*-acetyl- α -aspartylglutamic acid and beta-citryl-L-glutamic acid and their distributions in the brain and other organs of various species of animals. *J Neurochem* 36:804-810.
49. Neale JH, Bzdega T, Wroblewska B 2000 *N*-acetylaspartylglutamate: The most abundant peptide neurotransmitter in the mammalian central nervous system. *J Neurochemistry* 75:443-452.
50. O'Keefe J, Nadel L. 1978 *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford University Press.

51. Orlando LR, Luthi-Carter R, Standaert DG, Coyle JT, Penny Jr JB, Young AB 1997 *N*-acetylaspartylglutamate (NAAG) protects against rat striatal quinolinic acid lesions in vivo. *Neurosci Lett* 236:91-94.
52. Paxinos G, Watson C 1998 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press.
53. Pliss L, Balcar VJ, Pokorný J, Bubeniková V, FitzGibbon T, Šťastný F 2003 Morphology and ultrastructure of rat hippocampal formation after intracerebroventricular administration of *N*-acetyl-L-aspartyl-glutamate. *Neuroscience* 122:93-101.
54. Rahman S, Engleman E, Simon J, McBride WJ 2001 Negative interaction of dopamine D2 receptor antagonists and GBR 12909 and GBR 12935 dopamine uptake inhibitors in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 414:37-44.
55. Rajakumar N, Williamson PC, Stoessl JA, Flumerfelt BA 1996 Neurodevelopmental pathogenesis of schizophrenia. *Soc Neurosci Abstract* 22:1187.
56. Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH 2001 Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Dev Brain Res* 139:227-236.
57. Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, Partilla JS 2001 Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* 39:32-41.
58. Sams-Dodd F, Lipska BK, Weinberger DR. 1997 Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology* 132:303-310.
59. Sherwood NM, Timiras PS 1970 *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. University of California Press, Los Angeles, CA.
60. Schiefer J, Topper R, Schmidt W, Block F, Heinrich PC, Noth J, Schwarz M 1998 Expression of interleukin 6 in the rat striatum following stereotaxic injection of quinolinic acid. *J Neuroimmunol* 89:468-176.
61. Shiffman S, Bronstein M, Sternfeld M, Pisante-Shalom A, Lev-Lehman E, Weizman A, Reznik I, Spivak B, Grisaru N, Karp L, Schiffer R, Kotler M, Strous RD, Swartz-Vanetik M, Knobler HY, Shinar E, Beckmann JS, Yakir B, Risch N, Zak NB, Darvasi A 2002 A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia *Am J Hum Genet* 1296-1302.
62. Schmued LC, Hopkins KJ 2000 Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration *Brain Res* 874:123-130.
63. Schwarcz R, Tamminga CA, Kurlan R, Shoulson I 1988 Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann Neurol* 24:580-582.
64. Simon JR, Atweh S, Kuhar MJJ 1976 Sodium-dependent high affinity choline uptake: A regulatory step in the synthesis of acetylcholine. *J Neurochem* 26:909-922.
65. Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S 2004 Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci. Lett.* 366:162-166
66. Šťastný F, Tejkalová H, Skuba I, Palenicek T, Mares V, Klaschka J, Balcar VJ 2005 Quinolinic acid alters hippocampal levels of glutamate and NR2B subunit of NMDA receptor: A developmental model of schizophrenia. *J Neurochem* 94 (Suppl 2):230
67. Swerdlow NR, Stephany N, Wasserman LC, Talledo J, Shoemaker J, Auerbach PP 2003 Amphetamine effects on prepulse inhibition across-species: replication and parametric extension. *Neuropsychopharmacology* 28:640-650.
68. Thomas AG, Vormov JJ, Olkowski JL, Merion AT, Slusher BS 2000 *N*-acetylated α -linked acidic depeptidase converts *N*-acetylaspartylglutamate from a neuroprotectant to a neurotoxin. *J Pharm Exp Ther* 295:16-22.
69. Tsai G, Passani LA, Slusher BS, Carter R, Baer L, Kleinman JE, Coyle JT 1995 Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch Gen Psychiatry* 52: 829-836.
70. Van den Berg CL, Hol T, Van Ree JM, Spruijt BM, Everts H, Koolhaas JM 1999 Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. *Dev Psychobiol* 34:129-138.
71. Weinberger DR 1987 Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44:660-669.
72. Wishaw IQ, Haun F, Kolb B 1999 Analysis of behavior in laboratory rodents pp 1-33 In Windhorst U, Johansson D (eds) *Modern techniques in Neuroscience*. Springer-Verlag.
73. Yamada K, Fuji K, Nabeshima T, Kameyama T 1990 Neurotoxicity induced by continuous infusion of quinolinic acid in the lateral ventricle in rats. *Neurosci Lett* 118:128-131
74. Zhao J, Ramadan E, Cappiello M, Wroblewska B, Bzdega T, Neale JH 2001 NAAG inhibits KCl-induced $[3H]$ -GABA release via mGluR3, cAMP, PKA and L-type calcium conductance. *J Neurosci* 13:340-346.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA V ZAHRANIČNÍCH ČASOPISECH S IF

1. Pliss L., Balcar V. J., Bubenikova V., Pokorný J., FitzGibbon T., Šťastný F. (2003) Morphology and ultrastructure of rat hippocampal formation after intracerebroventricular administration of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate. *Neuroscience* 122: 93-101.
2. Křištofiková Z., Šťastný F., Bubeniková V., Druga R., Klaschka J., Španiel F. (2004) Age- and sex-dependent laterality of rat hippocampal cholinergic system in relation to animal model of neurodevelopment and neurodegenerative disorders. *Neurochem. Res.* 29: 671-680
3. Stuchlík A., Rezacova L., Vales K., Bubenikova V., Kubik S. (2004) Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci. Lett.* 366:162-166.
4. Bubeniková V., Horaček J., Kožený J., Platilová V., Závěšická L., Páleníček T., Höschl C. (2004) The effect of tryptophan depletion in the action of haloperidol in MK-801-treated rats. *Eur J Pharmacol* 502:109-166.
5. Bubenikova V., Votava M., Horaček J., Páleníček T., Dockery C. (2005) The effect of zotepine, risperidone, clozapine and olanzapine on MK-801-disrupted sensorimotor gating. *Pharmacol Biochem Behav* 80:591-596.
6. Bubeniková V., Votava M., Horaček J., Páleníček T. (2005) Relation of sex and estrous phase to deficits in prepulse inhibition of the startle response induced by ecstasy (MDMA). *Behav Pharmacol* 16:127-130.
7. Horaček J., Závěšická L., Tintěra J., Dockery C., Platilová V., Kopeček M., Španiel F., Bubeniková V., Höschl C. (2005) The effect of tryptophan depletion on brain activation measured by functional magnetic resonance imaging during the stroop test in healthy subjects. *Physiol Res* 54:235-244.
8. Páleníček T., Votava M., Bubeniková V., Horaček J. (2005) Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. *Physiol Behav* 86:546-553.
9. Horaček J., Bubeniková V., Kopeček M., Páleníček T., Dockery C., Mohr P., Höschl C. (2005) The mechanism of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs in press*
10. Kaiser M., Mareš V., Šťastný F., Bubeniková V., Lisá V., Suchomel P., Balcar V.J. (2006) The influence of interleukin-1 β on γ -glutamyltranspeptidase activity in rat hippocampus. *Physiol Res. in press*
11. Bubeniková V., Balcar V. J. , Tejkalová H., Langmaier M., Šťastný F. (2006) Neonatal administration of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate induces early neurodegeneration in hippocampus and alters behaviour in young adult rats. *Neurochem Int in submission*