

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Vliv neuroaktivních steroidů inhibujících NMDA receptory na chování

The Influence of the Neuroactive Steroids Inhibiting NMDA Receptors on Behaviour

Bc. Markéta Chvojková

Praha 2013

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Valeš, PhD.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Provedením operačních zákroků u laboratorních zvířat se na mé práci podílel Ing. Lukáš Rambousek.

V Praze dne 5. 5. 2013

Markéta Chvojková

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli RNDr. Karlu Valešovi, PhD., za pomoc při vypracování této práce, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat dalším členům oddělení Neurofyziologie paměti Fyziologického ústavu AV ČR, zejména Ing. Lukáši Rambouskovi za provedení operací potkanů a Michaele Fialové za pomoc při experimentech. V neposlední řadě děkuji Mgr. Grygorii Tsenovovi, PhD., za ochotu, podnětné připomínky a metodické rady. Za podporu při studiu patří poděkování i mé rodině.

Abstrakt

Neuroaktivní steroid pregnanolon glutamát (Pg glu), syntetický analog přirozeně se vyskytujícího pregnanolon sulfátu ($3\alpha5\beta S$), má neuroprotektivní vlastnosti a minimum nežádoucích účinků. Předmětem mé práce je vliv zvolených strukturálních modifikací molekuly Pg glu na biologické účinky. První modifikací je zvýšení lipofility, druhou pak připojení kladně nabitě skupiny na C3. Všechny tyto neuroaktivní steroidy jsou use-dependentními inhibitory NMDA receptorů.

Prvním cílem práce bylo zjistit neuroprotektivní účinnost zvolených neuroaktivních steroidů. Druhým cílem bylo prozkoumat vliv vybraných neuroaktivních steroidů na motorickou koordinaci, reflexy, anxiету, lokomoční aktivitu a také účinky jejich vysokých dávek. Třetí cíl představovalo sestavení baterie behaviorálních testů pro screening biologických účinků analogů Pg glu u laboratorních hlodavců.

Neuroprotektivní účinky byly hodnoceny v modelu excitotoxického poškození hipokampu u potkana na základě jeho behaviorálních důsledků. Neuroprotektivní účinnost byla prokázána u androstan glutamátu (And glu) a Pg glu. U kladně nabitých molekul neuroprotektivní účinnost prokázána nebyla.

V neuroprotektivních dávkách (1 mg/kg) neměl And glu ani Pg glu nežádoucí vliv na motoriku, reflexy ani lokomoční aktivitu. Tyto poznatky svědčí pro význam výzkumu a vývoje a steroidních inhibitorů NMDA receptorů jako potenciálních neuroprotektiv.

Kromě toho byly u And glu i Pg glu zjištěny anxiolytické účinky.

Klíčová slova: NMDA receptor, neuroaktivní steroidy, chování, excitotoxicita, kognitivní funkce, neuroprotektce

Abstract

The neuroactive steroid pregnanolone glutamate (Pg glu), a synthetic analogue of the naturally occurring pregnanolone sulfate ($3\alpha5\beta S$), has neuroprotective properties and a minimum of adverse effects. The subject of my thesis is the influence of selected structural modifications of the molecule Pg glu on biological effects. The first modification involves an increase of lipophilicity, the second involves the attachment of a positively charged group to C3. All these neuroactive steroids are use-dependent inhibitors of NMDA receptors.

The first aim of this thesis was to determine the neuroprotective effectiveness of the neuroactive steroids chosen. The second aim was to explore the influence of selected neuroactive steroids on motor coordination, reflexes, anxiety and locomotor activity, as well as the effect of their high doses. The third aim was to create a battery of behavioural tests for screening the biological effects of analogues of Pg glu in laboratory rodents.

The neuroprotective effects were evaluated in a model of excitotoxic damage of hippocampus in the rat on the basis of its behavioural consequences. The neuroprotective efficacy of androstane glutamate (And glu) and Pg glu was demonstrated. In the case of positively charged molecules, neuroprotective efficacy was not demonstrated.

Neuroprotective doses (1 mg/kg) of And glu and Pg glu did not unfavourably influence motor skills, reflexes and locomotor activity. These findings lend support to the importance of research and development of steroidal inhibitors of NMDA receptors as potential neuroprotectants.

In addition, anxiolytic effects of And glu and Pg glu were ascertained.

Key words: NMDA receptor, neuroactive steroid, behaviour, excitotoxicity, cognitive functions, neuroprotection

Obsah

Seznam zkratek	8
Úvod	9
1. NMDA receptory	10
1.1 Struktura NMDA receptoru.....	10
1.2 Aktivace NMDA receptoru.....	12
1.3 Endogenní modulace funkce NMDA receptoru	13
1.4 Fyziologická funkce NMDA receptorů	14
1.5 Role NMDA receptorů v patologických stavech	16
2. Antagonisté NMDA receptorů a jejich behaviorální účinky	17
2.1 Anxiolytické účinky.....	19
2.2 Antidepresivní účinky.....	19
2.3 Vliv na učení a paměť.....	20
2.4 Psychotomimetické účinky.....	20
2.5 Neuroprotektivní účinky	21
3. Neuroaktivní steroidy	22
3.1 Biosyntéza neurosteroidů v CNS	23
3.2 Fyziologická funkce a možné terapeutické využití neuroaktivních steroidů	24
3.3 Vliv neuroaktivních steroidů na NMDA receptory	25
3.3.1 Inhibice NMDA receptorů steroidy.....	26
3.3.2 Potenciace NMDA receptorů steroidy.....	27
3.3.3 Vztah struktury steroidů a jejich účinku na NMDA receptory.....	28
4. Behaviorální účinky neuroaktivních steroidů inhibujících NMDA receptory a jejich terapeutický význam	29
4.1 Neuroprotektivní účinky	29
4.2 Neurosteroidy a psychóza	30
4.3 Anxieta	32
4.4 Deprese.....	32
5. Neurobiologie vybraných behaviorálních úloh	34
5.1 Aktivní alotetické vyhýbání se místu	34
5.2 Open field	35
5.3 Vyvýšené křížové bludiště	36
5.4 NMDA léze hipokampu u potkana jako model excitotoxického poškození.....	36
6. Cíle práce	38

7. Materiál a metody	39
7.1 Použitá zvířata.....	39
7.2 Použité chemikálie a léčiva.....	39
7.3 Použité přístroje.....	40
7.4 Metodické postupy.....	40
7.4.1 Experiment 1.....	40
7.4.1.1 Bilaterální excitotoxické léze dorzálního hipokampu.....	40
7.4.1.2 Aktivní alotetické vyhýbání se místu.....	41
7.4.2 Experiment 2.....	42
7.4.2.1 Primární behaviorální screen	43
7.4.2.2 Vyvýšené křížové bludiště.....	43
7.4.2.3 Open field	44
7.4.2.4 Účinky vysokých dávek.....	44
7.4.3 Statistické vyhodnocení.....	45
8. Výsledky	46
8.1 Experiment 1	46
8.1.1 Operace	46
8.1.2 Aktivní alotetické vyhýbání se místu.....	46
8.2 Experiment 2	48
8.2.1 Primární behaviorální screen.....	48
8.2.2 Vyvýšené křížové bludiště.....	48
8.2.3 Open field.....	50
8.2.4 Účinky vysokých dávek	53
9. Diskuze	55
10. Závěr	62
11. Seznam použité literatury	64

Seznam zkratek

AAPA	aktivní alotetické vyhýbání se místu (active allothetic place avoidance)
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
And arg	androstan argininát
And glu	androstan glutamát
ATP	adenosintrifosfát
CDX	(2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrin
CNS	centrální nervový systém
DHEA	dehydroepiandrosteron
DHEAS	dehydroepiandrosteron sulfát
EPM	vyvýšené křížové bludiště (elevated plus maze)
GABA	kyselina γ -aminomáselná
Gly _B	glycinové vazebné místo na NMDA receptoru
LTD	dlouhodobá deprese (long-term depression)
LTP	dlouhodobá potenciace (long-term potentiation)
MK-801	dizocilpin
NMDA	N-methyl-D-aspartát
Pg arg	pregnanolon argininát
Pg glu	pregnanolon glutamát
PKM ζ	proteinkináza Mzeta
PS	pregnenolon sulfát
P450c17	17 α -hydroxyláza/17,20-lyáza
TRP	transient receptor potential
3 α -HSD	3 α -hydroxysteroid dehydrogenáza
3 α 5 β S	pregnanolon sulfát

Úvod

Patologické stavy, při nichž téměř vždy dochází k poškození a smrti neuronů, jako je iktus nebo chronická neurodegenerativní onemocnění, patří mezi přední příčiny smrti a invalidity. Vzhledem k stárnutí populace a k tomu, že možnosti léčby těchto stavů jsou v současné době nedostačující, představují tyto patologie stále závažnější problém s výraznými ekonomickými dopady. Proto je v současné době věnována velká pozornost vývoji neuroprotektiv (Chen & Lipton 2006).

K poškození neuronů během iktu, úrazu hlavy či epilepsie, ale i při neurodegenerativních onemocněních včetně Alzheimerovy choroby, značnou mírou přispívá excitotoxické působení glutamátu. Jeho zvýšené množství nadměrně stimuluje glutamátové receptory včetně NMDA receptorů, což nakonec vede k buněčné smrti. Podání antagonistů NMDA receptorů proto představuje jedno z možných řešení těchto stavů (Chen & Lipton 2006). Kromě toho mají antagonisté NMDA receptorů i anxiolytické (Chojnacka-Wojcik et al 2001) a antidepresivní (Price et al 2009) účinky, díky kterým by se mohli uplatnit i při léčbě dalších onemocnění. Protože je ale fyziologická aktivita NMDA receptorů nutná pro normální funkci mozku, jejich blokáda často způsobuje závažné behaviorální vedlejší účinky, které jsou překážkou pro klinické využití mnoha antagonistů NMDA receptorů. Proto je třeba vyvíjet látky, které působí proti patologické nadměrné aktivaci NMDA receptorů, ale jejich normální aktivitu příliš neomezují. Nejnadějnější se v tomto ohledu zdají být látky s unkompetitivním mechanismem působení (Chen & Lipton 2006).

Tyto podmínky pravděpodobně splňují i některé neuroaktivní steroidy. Jsou to analogy v mozku přirozeně se vyskytujících neurosteroidů, které modulují mimo jiné i funkci NMDA receptorů. Neuroprotektivní účinky syntetického neuroaktivního steroidu pregnanolon glutamátu byly potvrzeny v animálním modelu excitotoxického poškození mozku. Výsledky experimentů zároveň nasvědčují tomu, že tato látka má minimum nežádoucích psychotomimetických účinků, které obecně u farmak blokujících NMDA receptory představují zásadní problém (Rambousek et al 2011). Díky těmto a dalším potenciálně terapeuticky významným účinkům je vývoj nových neuroaktivních steroidů a testování jejich vlivů na organismus v současné době předmětem zájmu mnoha laboratoří. Proto se také ve své práci zaměřuji na neuroprotektivní účinnost a vybrané behaviorální účinky neuroaktivních steroidů inhibujících NMDA receptory.

1. NMDA receptory

NMDA receptory jsou glutamátém řízené ionotropní receptory, jejichž aktivace vede k otevření iontového kanálu propustného pro Na^+ , Ca^{2+} a K^+ ionty. NMDA receptory hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických procesech včetně synaptické plasticity umožňující paměť (Liu & Zhang 2000).

L-glutamát představuje hlavní excitační neurotransmitter savčího centrálního nervového systému (CNS). Glutamátém řízené receptory dělíme na ionotropní, u nichž po aktivaci dochází k otevření kationtového kanálu, a metabotropní, které jsou spřaženy s G-proteiny (Kew & Kemp 2005).

V rámci ionotropních glutamátergních receptorů dále rozlišujeme NMDA, AMPA a kainátové receptory. Tyto tři skupiny receptorů se liší svou fyziologickou funkcí a farmakologickými vlastnostmi. Byly pojmenovány podle svých selektivních agonistů, kterými jsou N-methyl-D-aspartát (NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát (AMPA) a kainát (Kew & Kemp 2005). AMPA a kainátové receptory jsou pro svou značnou odlišnost od NMDA receptorů někdy nazývány non-NMDA receptory.

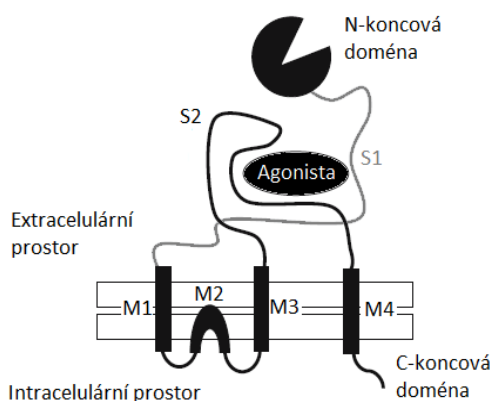
NMDA receptory najdeme ve většině struktur CNS. Byl doložen jejich hojný výskyt v hipokampu, dále také v mozkové kůře, mozečku i v mnoha dalších oblastech mozku (Petralia et al 1994). Na neuronech jsou umístěny především postsynapticky, avšak i perisynapticky, extrasynapticky a presynapticky. Kromě toho se mohou nacházet na některých gliových buňkách (Paoletti 2011) a byly objeveny i mimo CNS (Dingledine et al 1999).

1.1 Struktura NMDA receptoru

NMDA receptory jsou heterotetramery, složené obvykle ze dvou podjednotek NR1 a dvou NR2 (nověji nazývaných GluN1 a GluN2; Paoletti 2011). Vzácněji mohou některé NMDA receptory obsahovat i podjednotku NR3 (GluN3), která u nich pravděpodobně nahrazuje jednu (Kew & Kemp 2005) nebo i obě NR2 (Paoletti 2011).

Transmembránová topologie všech podjednotek je obdobná. Každá z nich obsahuje tři transmembránové domény: M1, M3 a M4. Mezi M1 a M3 se nalézá membránová smyčka M2, která tvoří pór iontového kanálu a určuje jeho propustnost. N-koncová doména a agonistu vázající doména, tvořená globulárními doménami S1 (nacházející se před M1

doménou) a S2 (mezi M3 a M4), jsou umístěny extracelulárně (Dingledine et al 1999). C-konec proteinu se nachází v cytoplazmě a jeho délka závisí na typu podjednotky (Paoletti 2011). Struktura jedné podjednotky NMDA receptoru je znázorněna na obr. 1. Podjednotky NMDA receptoru podléhají posttranslačním modifikacím, jakými jsou fosforylace a glykosylace (Dingledine et al 1999).



Obr. 1 – Podjednotka NMDA receptoru. Obrázek schematicky ukazuje transmembránové domény M1, M3 a M4, membránovou smyčku M2 tvořící pór iontového kanálu a domény S1 a S2, jež se účastní vazby agonisty. Struktura podjednotek ostatních ionotropních glutamátergních receptorů je obdobná (upraveno podle Kew & Kemp 2005).

Nativní NMDA receptory tvoří homogenní populaci. Existence více typů jednotlivých podjednotek umožňuje jejich různé kombinace a tím i vznik funkčně odlišných subpopulací NMDA receptorů (Paoletti 2011).

Podjednotka NR1 je pro NMDA receptory nezbytná a nachází se v celém CNS. Rozlišujeme osm izoform NR1, vznikajících alternativním sestřihem. Tyto izoformy mají rozdílné funkční vlastnosti i distribuci v různých oblastech dospělého a vyvíjejícího se mozku (Paoletti 2011).

Dále existují čtyři různé podjednotky NR2, z nichž každá je kódována svým vlastním genem. Označují se NR2A-D a značně se liší svým rozložením v různých částech mozku. Kromě toho také dochází k zásadním změnám jejich exprese během vývoje. V embryonálním mozku hlodavců byly nalezeny pouze dva typy NR2, a to NR2B ve většině struktur a NR2D v mezimozku a mozkovém kmeni. V postnatálním období se začíná objevovat NR2A, která je později hojně rozšířena po celém dospělém mozku, zatímco výskyt NR2B se v dospělosti omezuje na přední mozek. Během vývoje se objevuje NR2C, především v mozečku a čichovém bulbu. Naopak výskyt NR2D se velmi snižuje (Liu & Zhang 2000; Paoletti 2011).

Receptory složené z NR1 a různých NR2 podjednotek vykazují rozdíly v senzitivě vůči agonistům a alosterickým modulátorům, v kinetice i v dalších vlastnostech. NMDA receptory

obsahující NR2A nebo NR2B mají vyšší vodivost, propustnost pro Ca^{2+} i senzitivitu k blokádě Mg^{2+} ionty, než receptory obsahující NR2C nebo NR2D (Paoletti 2011).

Výsledky studií naznačují, že jeden neuron patrně může exprimovat více různých izoform NR1 a NR2, přičemž rozložení podjednotek na jednotlivých částech neuronu (synaptické versus extrasynaptické oblasti) může být rozdílné. Dva odlišné typy NR1 nebo NR2 byly zjištěny i v rámci jednoho receptoru (Paoletti 2011).

U podjednotky NR3 rozlišujeme dvě varianty (NR3A a NR3B), které jsou produkty odlišných genů. Podobně jako tomu je u NR2, i v případě NR3 je prostorová a časová distribuce v CNS rozdílná. Receptory, jejichž součástí je kromě NR1 a NR2 i NR3, se vyznačují menší vodivostí a propustností pro Ca^{2+} než receptory, které NR3 neobsahují (Kew & Kemp 2005).

1.2 Aktivace NMDA receptoru

NMDA receptory mají několik typických vlastností, kterými se odlišují od ostatních ionotropních receptorů. Jednou z nich je aktivace, která vyžaduje vazbu dvou endogenních koagonistů – glutamátu a glycinu. Je nutné obsadit dvě glutamátová vazebná místa (nacházející se na podjednotkách NR2) a dvě glycinová vazebná místa (na podjednotkách NR1; Kew a Kemp 2005). Vazebné místo pro glycin se nalézá i na NR3 (Paoletti 2011). Ligandem vazebného místa na NR1 a NR3 je kromě glycinu i D-serin (Paoletti 2011).

Aktivace NMDA receptoru však závisí nejen na vazbě agonistů, ale i na membránovém potenciálu. Za klidového membránového potenciálu jsou iontové kanály většiny NMDA receptorů blokovány extracelulárními Mg^{2+} ionty. Depolarizací neuronu se Mg^{2+} ionty uvolní ze svého vazebného místa a tím je průtok iontů umožněn v plné míře. NMDA receptory tedy na rozdíl od ostatních ionotropních receptorů pro svou plnou aktivaci vyžadují synaptický výlev glutamátu za současné depolarizace neuronu, na kterém se nalézají. Depolarizace může být způsobena například aktivací AMPA receptorů, vyskytujících se na neuronu společně s NMDA receptory (Dingledine et al 1999).

Iontový kanál NMDA receptoru je ve svém otevřeném stavu propustný pro Na^+ , K^+ a Ca^{2+} ionty, přičemž především propustnost pro Ca^{2+} je významná a uplatňuje se při přenosu signálu během fyziologických (Liu & Zhang 2000) i patofyziologických (Arundine & Tymianski 2003) procesů.

Aktivace NMDA receptoru je ve srovnání s AMPA a kainátovými receptory pomalejší. To má patrně své fyziologické opodstatnění – rychlejší aktivace AMPA receptorů způsobí

depolarizaci a tím umožní následnou aktivaci NMDA receptorů. Rovněž deaktivace a desenzitizace NMDA receptorů probíhá pomaleji než v případě non-NMDA receptorů (Dingledine et al 1999).

1.3 Endogenní modulace funkce NMDA receptoru

Na rozdíl od AMPA a kainátových receptorů, aktivita NMDA receptorů je alostericky modulována velkým množstvím endogenních látek, a to pozitivně i negativně (Dingledine et al 1999; Paoletti 2011). Na NMDA receptoru tak najdeme vazebná místa pro H^+ , Zn^{2+} či polyaminy (Liu & Zhang 2000). Tato skutečnost poukazuje na důležitost správného „vyladění“ funkce tohoto receptoru. Mnohé z inhibičně působících alosterických modulátorů navíc pravděpodobně přispívají k ochraně před nadměrnou aktivací NMDA receptorů a s ní spojenými nebezpečnými následky (Dingledine et al 1999). Existence mnoha vazebných míst na NMDA receptoru zároveň umožňuje různě ovlivňovat jeho funkci podáním exogenních látek, z nichž k nejvýznamnějším patří jeho antagonisté (Kew & Kemp 2005). Strukturu NMDA receptoru a některá jeho vazebná místa ukazuje obr. 2.

Určité endogenní látky mohou modulovat funkci receptoru i několika různými mechanismy zároveň (Dingledine et al 1999). Efekt některých látek je navíc ovlivněn podjednotkovým složením receptoru či přítomností agonisty (Korinek et al 2011), což činí celou problematiku modulace NMDA receptoru ještě komplikovanější.

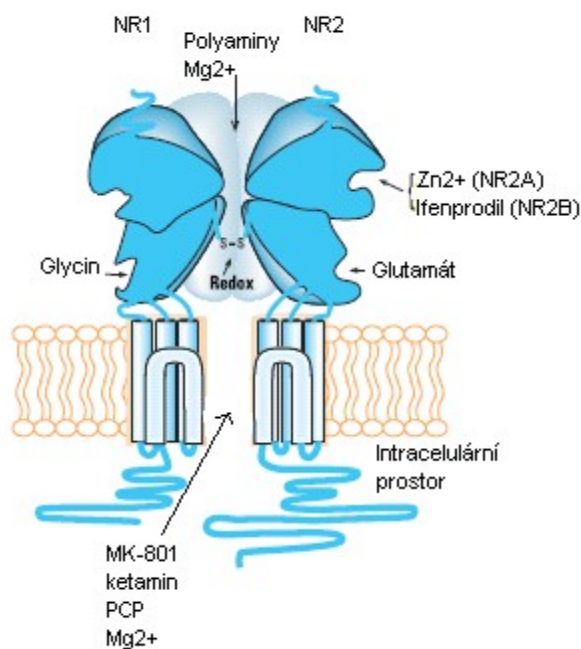
K iontům přirozeně negativně ovlivňujícím funkci NMDA receptoru patří extracelulární Zn^{2+} a H^+ , které spolu s již dříve zmíněným Mg^{2+} přispívají k tonické inhibici NMDA receptorů za fyziologických podmínek. Navíc vzhledem k tomu, že určité patologické procesy v CNS včetně ischemie a záchvatů jsou spojeny s poklesem pH, může inhibice NMDA receptorů protony představovat negativní zpětnou vazbu a pomoci zmírnit poškození neuronů způsobené nadměrnou aktivací NMDA receptorů (Dingledine et al 1999).

NMDA receptory jsou citlivé i na oxidační či redukční působení extracelulárního prostředí, které má za následek snížení, respektive zvýšení aktivity receptoru (Dingledine et al 1999). Potenciace receptoru může být dosaženo i jeho fosforylací (Liu & Zhang 2000).

Funkce NMDA receptoru je dále ovlivňována polyaminy. Ty mohou různými mechanismy vyvolávat potenciační i inhibiční efekt a jejich účinek je pravděpodobně zprostředkován více vazebnými místy (Liu & Zhang 2000).

Samostatnou skupinu endogenních modulátorů NMDA receptorů tvoří v CNS vznikající steroidní látky, nazývané neurosteroidy. Z nich některé, například pregnenolon sulfát (20-oxo-

pregn-5-en-3 α -yl sulfát, PS), mohou po své vazbě na receptor působit potenciačně, zatímco jiné, včetně pregnanolon sulfátu (20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát, 3 α 5 β S) jej inhibují. Neurosteroidy se účastní různých fyziologických procesů včetně učení a paměti, neuroprotektce a vývoje mozku a hrají roli i v některých patologických stavech (Korinek et al 2011). O těchto látkách bude dále podrobně pojednáno v samostatné kapitole.



Obr. 2 – NMDA receptor. Obrázek schematicky znázorňuje vazebná místa agonistů receptoru (glutamát, glycin), některých jeho přirozených modulátorů (Mg²⁺, polyaminy, Zn²⁺), redoxní modulační místo a vazebná místa určitých syntetických nekompetitivních antagonistů (ifenprodil a dále ketamin, fencyklidin a MK-801). Rovněž jsou zobrazeny membránové domény (upraveno podle Kemp & McKernan 2002).

1.4 Fyziologická funkce NMDA receptorů

NMDA receptory jsou klíčové pro synaptickou plasticitu, což je schopnost synapse měnit účinnost přenosu mezi neurony v závislosti na jejich aktivitě. Uplatňuje se při formování synaptických spojení během vývoje a také je všeobecně považována za mechanismus zodpovědný za uchování informací v paměti (Lynch 2004).

Z procesů zprostředkovávajících synaptickou plasticitu je nejvíce pozornosti věnováno dlouhodobé potenciaci (LTP; Lynch 2004). LTP byla poprvé pozorována jako několik minut až hodin trvající posílení komunikace mezi neurony v *gyrus dentatus* králíka, vyvolané vysokofrekvenční stimulací (Bliss & Lomo 1973). Kromě hipokampu může k LTP docházet

i v jiných oblastech mozku (Lynch 2004), možná dokonce na všech excitačních synapsích (Malenka & Bear 2004). Největší zájem však vzbuzuje právě LTP v hipokampu coby pravděpodobný mechanismus paměti. V relativně nedávné době bylo prokázáno, že učení opravdu v hipokampu indukuje LTP (Whitlock et al 2006). Udržování pozdní fáze LTP a uchovávání prostorových informací v paměti navíc sdílí společný molekulární mechanismus. Zablokování proteinkinázy Mzeta (PKM ζ), klíčové pro udržování pozdní fáze LTP, vede ke ztrátě dříve naučení informace (Pastalkova et al 2006). Tyto poznatky potvrzují předchozí domněnky, že LTP je skutečně podkladem paměťové stopy.

Z časového hlediska rozlišujeme časnou fázi LTP, označující zvýšení synaptické síly trvající přibližně 60 minut, a fázi pozdní, která závisí na syntéze proteinů a dovoluje podstatně delší udržení synaptických změn (Malenka & Bear 2004).

Existuje více forem LTP a ne všech z nich se NMDA receptory účastní (Malenka & Bear 2004). Ve většině případů ale indukce LTP (v téměř celém hipokampu i v některých jiných oblastech mozku) na NMDA receptorech závisí. Současná aktivita neuronů doprovázená depolarizací postsynaptického a výlevem glutamátu z presynaptického neuronu aktivuje NMDA receptory. Jimi zprostředkovaný vtok Ca^{2+} do postsynaptického neuronu je nezbytný pro aktivaci kináz, především Ca^{2+} /kaldmodulin-dependentní proteinkinázy II (CaMKII), vedoucí k posílení komunikace mezi neurony. Toho je dosaženo fosforylací postsynaptických AMPA receptorů, která zvýší jejich vodivost. Kromě toho dochází k inkorporaci dalších AMPA receptorů do zúčastněného dendritického trnu (Lynch 2004). Kinázy aktivované v časné fázi a signální kaskády s nimi spojené vedou mimo jiné k aktivaci transkripčních faktorů. Tím dochází k ovlivnění transkripce a syntézy proteinů (Lynch 2004), uplatňujících se při pozdní fázi LTP. Důležitým proteinem zde vznikajícím je PKM ζ . Jde o izoformu proteinkinázy C, která je trvale aktivní a zachováváním vysokého počtu AMPA receptorů v synapsi udržuje pozdní fázi LTP (Sacktor 2012). Mimo to dochází k morfologickým změnám synapse včetně růstu nových a zvětšování stávajících dendritických trnů (Malenka & Bear 2004). Ke změnám dochází i v presynaptické oblasti (Lynch 2004).

Protože indukce LTP většinou závisí na NMDA receptorech, lze jejich zablokováním LTP znemožnit (Lynch 2004). To potvrzují i behaviorální experimenty, ve kterých podání antagonistů NMDA receptorů snížilo efektivitu následného prostorového učení, ale na dříve zapamatované informace nemělo vliv (Morris 1989).

Dalším procesem přispívajícím k synaptické plasticitě je dlouhodobá deprese (LTD). Ta je na rozdíl od LTP vyvolána opakovanou stimulací o nižší frekvenci a vede k zeslabení

komunikace mezi zúčastněnými neurony. Dochází při ní k aktivaci NMDA receptorů, vtoku Ca^{2+} , aktivaci fosfatáz a tím k internalizaci AMPA receptorů a snížení jejich vodivosti. Podobně jako LTP, i LTD má více forem, probíhá v mnoha oblastech mozku a přispívá k procesům učení a paměti (Malenka & Bear 2004).

Kromě učení a paměti se hipokampální NMDA receptory účastní i procesů spojených s emocionalitou, konkrétně především s anxiétou a depresí. Podání antagonistů NMDA receptorů tak působí anxiolyticky. NMDA receptory spojené s anxiétou se přitom nacházejí ve ventrálním hipokampu, zatímco receptory účastnící se prostorové paměti jsou v hipokampu dorzálním (Barkus et al 2010).

NMDA receptory hrají důležitou roli nejen v dospělém, ale i ve vyvíjejícím se mozku. Výsledky studií naznačují jejich účast v procesech proliferace, migrace a přežívání neuronů, synaptogeneze a tvorby neuronálních map. Zablokování NMDA receptorů v určitých kritických periodách vývoje mozku (u potkana během prvních tří až čtyř týdnů života) proto může na organismu zanechat dlouhotrvající behaviorální, neurochemické i anatomické následky, které mohou přetrvat do dospělosti (Contestabile 2000).

1.5 Role NMDA receptorů v patologických stavech

NMDA receptory jsou pro funkci mozku nebytné, ale zároveň se mohou účastnit některých patologických procesů. Z nich k nejvýznamnějším patří excitotoxicita, což je neurodegenerace vyvolaná excitačními aminokyselinami. Hraje roli v akutních stavech, jako je ischemie, úraz hlavy nebo epilepsie (Arundine & Tymianski 2003) a pravděpodobně i v některých chronických neurodegenerativních onemocněních (Liu & Zhang 2000).

V procesu excitotoxicity jsou ionotropní glutamatergní receptory aktivovány nadměrným množstvím glutamátu. To vede k velkému vtoku Ca^{2+} , klíčového mediátoru excitotoxicity. Ca^{2+} mnoha mechanismy včetně nadměrné aktivace proteáz, fosfolipáz, fosfatáz a syntázy oxidu dusnatého způsobuje poškození a smrt buňky. Některé z enzymů navíc přispívají ke vzniku volných radikálů, jež buňku rovněž poškozují. Jiné mohou spouštět kaskády, které pozitivní zpětnou vazbou neurotoxický proces posilují. Glutamátem způsobená depolarizace neuronu má navíc za následek aktivaci voltage-dependentních Ca^{2+} kanálů a tím další vtok Ca^{2+} . Svou roli v excitotoxicitě hraje často i nedostatek ATP, vzniklý například v důsledku hypoxie při ischemii. Ten negativně ovlivňuje aktivitu iontových pump a přenašečů udržujících gradienty Ca^{2+} , Na^+ a K^+ , což vede k dalšímu zvýšení koncentrace Ca^{2+}

a depolarizace. Deficitem ATP je rovněž omezeno odčerpávání glutamátu ze synaptické štěrbin. Zmíněný neurotransmitter tak dále působí na okolní neurony a poškozuje je.

Příčiny prvotní akumulace nadbytku glutamátu v synaptické štěrbině a tím aktivace celé excitotoxické kaskády záleží na konkrétním patologickém stavu. Zahrnují zvýšený výlev glutamátu nebo jeho snížené zpětné odčerpávání (Mark et al 2001).

NMDA receptory se na excitotoxicitě významně podílejí umožněním vtoku Ca^{2+} . Negativní důsledky influxu Ca^{2+} přes NMDA receptory jsou přitom závažnější než důsledky jeho vtoku jinými cestami. To lze vysvětlit spřažením receptoru (pravděpodobně prostřednictvím proteinů postsynaptické denzity) s intracelulárními signalizačními kaskádami, které se procesu excitotoxicity účastní (Arundine & Tymianski 2003). Vliv synaptických a extrasynaptických NMDA receptorů na různé intracelulární procesy není totožný. Podle současných poznatků jsou to především extrasynaptické NMDA receptory, které mají pro excitotoxicitu zásadní význam (Hardingham et al 2002).

Vzhledem k roli NMDA receptorů v excitotoxicitě představuje jejich zablokování podaným antagonistou jeden z možných mechanismů, kterými by bylo možné poškozením spojeným s excitotoxicitou předejít (Liu & Zhang 2000). Mnohé z těchto látek však interagují nejen s patologickou, ale i s fyziologickou funkcí NMDA receptorů a vedou tak k závažným behaviorálním nežádoucím účinkům. Proto je nutné hledat látky účinkující pouze na patologické procesy (Parsons 2001).

NMDA receptory a synaptická plasticita jimi zprostředkovaná se podílí i na vzniku jiných patologických stavů, jako jsou neuropatická bolest, závislosti, lékové senzitivace a tolerance. Také tyto problémy by mohly být řešeny vhodnými antagonisty NMDA receptorů (Parsons 2001).

2. Antagonisté NMDA receptorů a jejich behaviorální účinky

Antagonisty receptoru nazýváme jeho ligandy, které po svém navázání receptor neaktivují, ale naopak různými mechanismy brání účinku agonisty. Antagonista tedy má k receptoru afinitu, ale disponuje velmi nízkou vnitřní aktivitou (efficacy) pro vyvolání aktivace receptoru. Antagonisté se na základě svých farmakologických vlastností dělí do několika skupin (Hynie

2001). Pro tuto práci je to podstatné z důvodu jejich někdy odlišných vlivů na chování. Obecně řečeno, antagonisté NMDA receptorů mají neuroprotektivní, anestetické (Muir & Lees 1995), anxiolytické a antidepresivní (Engin et al 2009) účinky s potenciálním terapeutickým významem. Na druhou stranu mnozí z nich narušují kognitivní funkce, indukují příznaky podobné psychóze či mají další závažné nežádoucí účinky, což jejich využití značně omezuje (Parsons 2001).

Kompetitivní antagonisté se váží na vazebné místo agonisty (kterým je u NMDA receptoru glutamát) a jeho obsazením zabrání aktivaci receptoru. Jejich účinek proto závisí i na poměru jejich koncentrace vůči koncentraci agonisty (Wenke et al 1983). V místech mozku s patologicky zvýšeným množstvím glutamátu je tedy efekt kompetitivních antagonistů pouze malý, zatímco při normální koncentraci glutamátu mohou interagovat s fyziologickou funkcí NMDA receptorů. Využití kompetitivních antagonistů jako neuroprotektiv je proto nepravděpodobné (Chen & Lipton 2006).

U NMDA receptorů dále rozlišujeme antagonisty glycinového vazebného místa, nazývaného též strychnin-insenzitivní či glycin_B (Gly_B) vazebné místo (Parsons 2001).

Pojem nekompetitivní antagonisté označuje látky, které alostericky brání aktivaci receptoru prostřednictvím vlastního vazebného místa, odlišného od vazebného místa agonisty. Jejich účinek přetrvává i při zvýšení množství agonisty (Wenke et al 1983). Mezi nejznámější nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů patří disociativní anestetika ketamin a fencyklidin (PCP) a dále také vysokoafinní látka MK-801 neboli dizocilpin. (Někteří autoři však považují zmíněné látky za antagonisty unkompetitivní; Dingledine et al 1999.) Jejich vazebné místo se nachází přímo v iontovém kanále (Muir & Lees 1995).

Další skupinu antagonistů představují látky, pro jejichž vazbu je nutná přítomnost určité podjednotky (Dingledine et al 1999).

Látky, jejichž vazba na receptor je možná pouze při konkrétním konformačním stavu receptoru v závislosti jeho předchozí aktivaci agonistou, se nazývají unkompetitivní antagonisté (Chen & Lipton 2006). (Přesněji se tyto látky, jejichž vazba na receptor je podmíněna jeho předchozí aktivací, někdy nazývají use-dependentní antagonisté; Vales et al 2010). Častým mechanismem účinku unkompetitivních antagonistů NMDA receptorů je blokáda otevřeného iontového kanálu aktivovaného receptoru. Díky tomu se unkompetitivní antagonisté více uplatní v místech mozku se zvýšenou koncentrací agonisty, kde je větší množství aktivovaných NMDA receptorů. Mohou zde proto působit neuroprotektivně, zatímco fyziologickou funkci NMDA receptorů v jiných oblastech mozku s normální hladinou glutamátu tolik neomezí. Unkompetitivní antagonisté, zejména ti s nižší afinitou, tak

mají minimum nežádoucích účinků a jsou proto z terapeutického hlediska nejatraktivnější. Jejich nejvýznamnějším zástupcem je memantin (Chen & Lipton 2006). Právě ten je spolu s ketaminem jedním z mála antagonistů NMDA receptorů schválených pro klinické využití.

2.1 Anxiolytické účinky

Anxiolytické účinky byly zjištěny u více různých skupin NMDA antagonistů. Anxiolyticky působí zástupce kompetitivních antagonistů (Nascimento Hackl & Carobrez 2007) i antagonistu Gly_B vazebného místa L701,324 (Kotlinska & Liljequist 1998) v různých animálních modelech úzkosti. Podobný efekt má i nekompetitivní antagonist MK-801 (Chojnacka-Wojcik et al 2001) a ketamin (u potkana v dávce 50 mg/kg; Engin et al 2009). Anxiolytické účinky nižších dávek ketaminu (30 mg/kg) u potkana však jiné studie nepotvrzují (Becker et al 2003) nebo dokonce při použití ještě nižších dávek poukazují na anxiogenní efekt (Silvestre et al 1997). V této souvislosti nutno brát v úvahu, že ketamin může kromě NMDA receptorů ovlivňovat i serotonergní a dopaminergní systém (Kapur & Seeman 2002). Oproti tomu u některých antagonistů Gly_B vazebného místa výrazné anxiolytické účinky zjištěny nebyly (Chojnacka-Wojcik et al 2001).

Anxiolytické účinky lze vyvolat i aplikací antagonisty NMDA receptorů přímo do ventrálního hipokampu, což poukazuje na pravděpodobné místo účinku těchto látek (Nascimento Hackl & Carobrez 2007).

2.2 Antidepresivní účinky

Někteří kompetitivní antagonisté NMDA receptorů (Przegalinski et al 1997), nízkoafinní use-dependentní antagonist memantin (Reus et al 2010) i nekompetitivní antagonisté ketamin a MK-801 (Engin et al 2009) potlačují projevy deprese v jejím animálním modelu. V případě ketaminu byly antidepresivní účinky potvrzeny i v klinických studiích, kdy intravenózní podání subanestetické dávky této látky dočasně zmírnilo příznaky u pacientů s depresí, a to i u těch, u nichž byla předchozí léčba antidepresivy neúspěšná. Na rozdíl od klasických antidepresiv se účinek ketaminu dostavuje brzy (v řádu hodin) po podání. Ketamin nebo příbuzné látky by proto mohly představovat rychlé řešení akutních stavů (Price et al 2009). Podobných výsledků bylo u pacientů dosaženo i po podání traxoprodilu, který blokuje NMDA receptory obsahující podjednotku NR2B (Preskorn et al 2008).

Možným místem účinku antidepresivně působících antagonistů NMDA receptorů je opět hipokampus (Przegalinski et al 1997).

2.3 Vliv na učení a paměť

Nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů mohou negativně ovlivňovat kognitivní schopnosti. Aplikace MK-801 způsobuje u laboratorních hlodavců následné zhoršení schopnosti učení v různých prostorových i neprostorových úlohách. Podávání nižších dávek MK-801, kdy ještě nedochází k ovlivnění lokomoční aktivity a dalších funkcí, proto může sloužit jako model kognitivní dysfunkce (van der Staay et al 2011). U ketaminu byl zjištěn negativní vliv na deklarativní paměť a pozornost i u lidí (Malhotra et al 1996).

Naopak antagonisté Gly_B vazebného místa (Smith et al 1993), antagonisté selektivní pro NR2B (Guscott et al 2003) ani unkompetitivní antagonisté NMDA receptorů paměť u zvířat příliš neovlivňují (Vales et al 2010). Memantin byl dokonce schválen pro léčbu Alzheimerovy choroby a jeho podávání vede ke zlepšení kognitivních schopností pacientů (Peskind et al 2006). Mechanismus tohoto terapeutického účinku memantinu však zatím není zcela objasněn (Chen & Lipton 2006). Zlepšení kognitivních funkcí po dlouhodobém podávání memantinu bylo pozorováno i u laboratorních hlodavců (Minkeviciene et al 2008).

2.4 Psychotomimetické účinky

Podání některých, zejména nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů (ketamin, fencyklidin, MK-801), vyvolává stav podobný psychóze. U zvířat se projevuje kognitivním deficitem, hyperlokomocí, stereotypií, narušením sensorimotorického gatingu a dalšími změnami. Nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů lze proto použít k modelování schizofrenie u zvířat a následnému výzkumu podstaty tohoto onemocnění a testování možných léků. Psychotomimetické účinky antagonistů NMDA receptorů zároveň naznačují možnou roli poruchy glutamatergního systému při schizofrenii (Moghaddam & Jackson 2003). Ketamin v subanestetických dávkách způsobuje dočasný psychotický stav i u zdravých lidí, zahrnující příznaky podobné pozitivním (smyslové iluze, podezíravost) i negativním (emoční oploštělost) příznakům schizofrenie (Krystal et al 1994). U schizofreniků ketamin krátkodobě zhoršuje jejich stav a vyvolává příznaky podobné těm, které pacienti měli v akutní fázi onemocnění (Lahti et al 1995).

U laboratorních potkanů byly po aplikaci nekompetitivních, případně i kompetitivních antagonistů NMDA receptorů kromě negativního vlivu na chování zjištěny i neurotoxické změny v některých korových oblastech. Toto poškození neuronů je většinou jen krátkodobé, ale po podání vyšších dávek zmíněných látek přetrvává i delší dobu (Olney et al 1991).

Závažné psychotomimetické projevy po podání fencyklidinu a ketaminu vedly k omezení klinického využití těchto látek. Pro snížení těchto účinků je v anesteziologii ketamin často podáván spolu s benzodiazepiny (Muir & Lees 1995). Zmíněné účinky jsou také důvodem zneužívání těchto látek narkomany a obecně představují zásadní překážku pro klinické využití mnoha antagonistů NMDA receptorů. Výsledky studií naznačují, že podobný efekt mohou mít i antagonisté kompetitivní (Grotta et al 1995).

Naopak antagonisté unkompetitivní, antagonisté Gly_B vazebného místa či podjednotky NR2B jsou v tomto ohledu bezpečnější (Parsons 2001). Výsledky experimentů naopak poukazují na možné antipsychotické působení antagonistů Gly_B vazebného místa, což dosud nebylo uspokojivě vysvětleno (Bristow et al 1996).

2.5 Neuroprotektivní účinky

Významnou potenciálně terapeuticky využitelnou vlastnost antagonistů NMDA receptorů představují neuroprotektivní účinky. Ty byly v případě nekompetitivních antagonistů MK-801 a ketaminu potvrzeny u potkanů s přechodnou mozkovou ischemií, avšak za současných vedlejších účinků (Church et al 1988), které je z velké části činí pro klinickou praxi nepoužitelnými (Chen & Lipton 2006). Nadějnější látkou se zdá být v tomto ohledu unkompetitivní NMDA antagonistem memantin, který zmírňuje poškození mozku v modelu iktu u potkana v dávce, která nenarušuje schopnost učení (Chen et al 1998). Ačkoli jiná studie tyto poznatky zpochybňuje (Creeley et al 2006), terapeutickému efektu memantinu při onemocněních spojených s excitotoxicitou (včetně Alzheimerovy choroby) a minimu nežádoucích účinků, vysvětlovanému unkompetitivním mechanismem účinku a poměrně nízkou afinitou, nasvědčují i některé klinické studie (Chen & Lipton 2006). Nelze však tvrdit s jistotou, že příčinou terapeutického efektu memantinu je nutně blokáda NMDA receptorů a s ní spojený neuroprotektivní efekt (Creeley et al 2006).

Oproti tomu neuroprotektivní účinky kompetitivního antagonisty NMDA receptorů Selfotelu (Davis et al 2000) a antagonisty Gly_B vazebného místa gavestinelu (Sacco et al 2001), očekávané na základě výsledků preklinických experimentů, se v klinických studiích u pacientů s iktem nepotvrdily.

3. Neuroaktivní steroidy

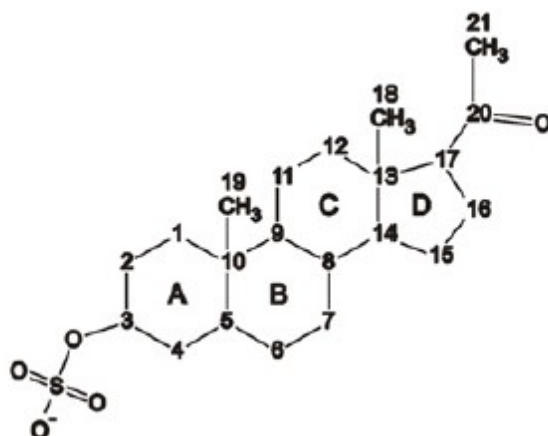
Steroidy jsou organické látky, složené ze tří cyklohexanových a jednoho cyklopentanového kruhu. Jde o látky nepolární či amfipatické povahy (v závislosti na navázaných skupinách). Steroidy přirozeně se vyskytující v tělech živočichů dělíme na steroly, žlučové kyseliny a steroidní hormony. Nejdůležitějším zástupcem sterolů je cholesterol, který se nachází ve všech živočišných tkáních jako složka buněčných membrán. Ve specializovaných tkáních slouží zároveň jako výchozí látka pro syntézu žlučových kyselin a steroidních hormonů, kterými jsou u lidí progesteron, kortizol, aldosteron, testosteron, estradiol a kalcitriol (Koolman & Roehm 2005).

Steroidní hormony prostupují do buněk, působí na intracelulární receptory a jejich prostřednictvím regulují genovou expresi. Účinky tohoto genomického působení steroidních hormonů se projevují relativně pomalu (McEwen 1991).

Kromě toho byl ale u některých steroidních hormonů zjištěn i prakticky okamžitý vliv na excitabilitu CNS. Tento efekt pozoroval Selye jako indukci anestezie po injekci některých steroidů (Selye 1941). Jeho objev vedl k vývoji syntetických steroidních anestetik včetně alfaxalonu. Molekulární mechanismus tohoto rychlého účinku steroidních látek byl však neznámý až asi do 80. let, kdy byl objeven jejich vliv na receptory pro neurotransmitery (Harrison et Simmonds 1984). Zároveň byly publikovány výsledky studií naznačující, že určité steroidní látky jako dehydroepiandrosteron sulfát (17-oxo-androst-5-en-3 β -yl sulfát, DHEAS) vznikají přímo v savčím mozku nezávisle na periferních žlázách (Corpechot et al 1981). To bylo později potvrzeno a v roce 1981 pro tyto látky Étienne Baulieu navrhl termín neurosteroidy (Dubrovsky 2005). Neurosteroidů vzniká v CNS celá řada a ovlivněním membránových receptorů se zde účastní mnoha různých procesů (Compagnone & Mellon 2000). Mezi jejich zástupce patří dehydroepiandrosteron (3 β -hydroxy-androst-5-en-17-on, DHEA), dále již zmíněný DHEAS, pregnenolon (3 β -hydroxy-pregn-5-en-20-on), PS, progesteron a další (Baulieu 1998).

Oproti tomu širší pojem neuroaktivní steroidy označuje steroidní látky různého původu, schopné vazbou na membránové receptory rychle ovlivnit excitabilitu neuronů. Kromě neurosteroidů sem tedy řadíme i určité steroidy vznikající mimo CNS nebo syntetické látky s obdobnými účinky (Paul & Purdy 1992).

Struktura neurosteroidů je znázorněna na obr. 3.



Obr. 3 – Struktura neurosteroidů. Na obrázku vidíme označení čtyř kruhů (A, B, C a D) a číslování uhlíků steroidní molekuly (převzato z Korinek et al 2011).

3.1 Biosyntéza neurosteroidů v CNS

Neurosteroidy vznikají v centrálním a periferním nervovém systému *de novo* z cholesterolu nebo ze steroidních prekurzorů importovaných z periferie (Baulieu 1998; Compagnone & Mellon 2000). Proto se neurosteroidy jako DHEAS v mozku vyskytují ve vyšší koncentraci než v plazmě a přetrvávají zde i po provedení adrenalectomie a gonadektomie (Corpechot et al 1981).

Biosyntézu neurosteroidů zajišťuje soubor steroidogenních enzymů, vyskytujících se v neuronech i gliových buňkách. Jejich exprese v různých buněčných typech, oblastech centrální i periferní nervové soustavy i během různých vývojových období je přísně regulována. Enzymy zodpovědné za steroidogenezi můžeme podle jejich lokalizace dělit na mitochondriální a mikrozomální. Významnou skupinu steroidogenních enzymů tvoří cytochromy P450, které pracují jako oxidázy. Z dalších typů enzymů můžeme jmenovat steroidní hydroxylázy, z nichž mnohé mají více enzymatických aktivit zároveň.

Neurosteroidogeneze v mozku sdílí některé společné kroky se steroidogenními procesy v nadledvinkách, gonádách a placentě. První a zároveň rychlost limitující krok syntézy všech steroidních hormonů zajišťuje enzymatický komplex štěpící postranní řetězec cholesterolu (P450_{scc}) konverzí cholesterolu na pregnenolon. Nalézá se v mitochondriích v mozku i periferních steroidogenních tkáních. V mozku dospělého potkana se vyskytuje v kůře, dále pak v amygdale, hipokampu a středním mozku.

V mozku vzniklý neuroaktivní steroid pregnenolon zde může být pomocí 3 β -hydroxysteroid dehydrogenázy (3 β -HSD) přeměněn na progesteron, který je rovněž neuroaktivní.

Pregnenolon i jeho metabolit progesteron mohou být na C17 hydroxylovány 17 α -hydroxylázou/17,20-lyázou (P450c17), nacházející se na hladkém endoplasmatickém retikulu. Vzniklé produkty 17 α -hydroxypregnenolon a 17 α -hydroxyprogesteron jsou dále pomocí stejného enzymu štěpením vazby mezi C17 a C20 přeměněny na neuroaktivní DHEA a androstendion.

Přestože produkty P450c17 jako DHEA se nacházejí i v mozku dospělého potkana, P450c17 byl nalezen pouze v mozku mláďat během prvního týdne života. U dospělých zvířat se DHEA pravděpodobně do CNS dostává z periferního nervového systému, kde je exprese P450c17 zachována.

P450c17 katalyzuje jeden z klíčových kroků steroidogeneze. Jeho produkt androstendion (ve který může být také konvertován DHEA, jiný produkt P450c17) je prekurzorem androgenů a estrogenů. V případě steroidogeneze na periférii rozdílná exprese P450c17 v jednotlivých oblastech nadledvinek a převažující typ jeho aktivity určují, kde bude pregnenolon metabolizován na pohlavní steroidy, mineralokortikoidy nebo glukokortikoidy.

Progesteron může být v mozku metabolizován i jinou drahou za vzniku neuroaktivního allopregnanolonu (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-on, nazývaný též 3 α , 5 α -tetrahydroprogesteron). To je umožněno činností 5 α -reduktázy a posléze 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázy (3 α -HSD).

Vzniklé neurosteroidy jsou v mozku dále modifikovány sulfotransferázami a sulfohydrolázami, které na ně přidávají nebo odnímají sulfátovou skupinu. Tím se výrazně mění farmakologické vlastnosti steroidů a jejich fyziologické účinky (Compagnone & Mellon 2000).

3.2 Fyziologická funkce a možné terapeutické využití neuroaktivních steroidů

Přirozeně se vyskytující neurosteroidy obecně plní v centrálním i periferním nervovém systému mnoho funkcí, a to v dospělosti i během embryogeneze. Některé (DHEA a DHEAS) podporují a řídí růst axonů, resp. dendritů a formování synapsí během embryogeneze. Jiné regulují myelinizaci (Compagnone & Mellon 2000). Určité neurosteroidy (včetně DHEA, DHEAS, allopregnanolonu a progesteronu) mají neuroprotektivní účinky a předpokládá se, že v mozku mohou sloužit k ochraně neuronů před případným poškozením a buněčnou smrtí. U dalších endogenních látek (PS a DHEAS) byl pozorován pozitivní vliv na paměť (Dubrovsky 2005). Behaviorální účinky neurosteroidů zahrnují také vliv na anxiету, sociální

a afektivní chování. Odhalení mechanismů k tomu vedoucích je však kvůli komplexnímu vlivu neurosteroidů na CNS a jejich endogenní produkci obtížné (Korinek et al 2011).

Během stárnutí (Labrie et al 1997), stresu a také při určitých onemocněních, jako jsou afektivní poruchy včetně deprese, úzkostné poruchy (Zorumski et al 2013), Alzheimerova choroba (Weill-Engerer et al 2002) nebo schizofrenie (Marx et al 2006b) byly zaznamenány změny hladin některých neurosteroidů v různých oblastech mozku. Nabízí se proto potenciální možnost léčby zmíněných onemocnění podáváním syntetických neuroaktivních steroidů, nebo ovlivněním biosyntézy těch endogenních. Neuroaktivní steroidy by mohly být využitelné také při léčbě neurodegenerativních onemocnění obecně, dále epilepsie, poranění mozku, alkoholismu, chronické bolesti, migrény nebo jako anestetika. Pro léčbu těchto onemocnění jsou významné hlavně steroidy pozitivně modulující GABA_A receptory (Zorumski et al 2013). Při některých ze zmíněných onemocnění by se mohly uplatnit i steroidy blokující NMDA receptory pro jejich neuroprotektivní (Rambousek et al 2011) a možné antidepressivní účinky (Zorumski et al 2013). Oproti tomu steroidy pozitivně modulující NMDA receptory by mohly být přínosné pro léčbu poruch paměti (Zorumski et al 2013).

Z těchto důvodů je studiu neuroaktivních steroidů, jejich vlivů na CNS a účinků v animálních modelech různých onemocnění i u pacientů a zdravých dobrovolníků v současné době věnována velká pozornost.

3.3 Vliv neuroaktivních steroidů na NMDA receptory

Účinek neurosteroidů v CNS je zprostředkován jejich vazbou na receptory pro neurotransmitery a následným pozitivním či negativním ovlivněním jejich funkce. Hlavním cílem neurosteroidů jsou GABA_A receptory, což jsou inhibiční iontové kanály, a ionotropní glutamatergní receptory včetně NMDA receptorů. Mezi receptory modulovatelné neurosteroidy však dále patří i nikotinové acetylcholinové, glycinové, sigma, napětově závislé vápníkové a draselné a TRP receptory (Zorumski et al 2013). Konkrétní neurosteroid tak může ovlivňovat i více typů receptorů. Některé z neurosteroidů (progesteron a jeho deriváty) působí v nervovém systému navíc i genomicky prostřednictvím jaderných steroidních receptorů (Compagnone & Mellon 2000).

Interakce neurosteroidů s NMDA receptory a jejich vlivy na organismus nejsou natolik prostudovány, jako je tomu v případě GABA_A receptorů. Na NMDA receptoru zatím nebylo přesně identifikováno vazebné místo pro neurosteroidy (Compagnone & Mellon 2000).

3.3.1 Inhibice NMDA receptorů steroidy

Mezi endogenní steroidy s negativním vlivem na funkci NMDA receptoru patří $3\alpha5\beta\text{S}$. Kromě svého vlivu na NMDA receptory $3\alpha5\beta\text{S}$ zároveň inhibuje i GABA_A , AMPA a kainátové receptory (Korinek et al 2011). Jeho vazba na NMDA receptor je podmíněna současnou přítomností glutamátu, jde tedy o antagonistu use-dependentního. Zároveň účinek $3\alpha5\beta\text{S}$ nezávisí na membránovém potenciálu (je voltage-independentní). $3\alpha5\beta\text{S}$ svou vazbou na NMDA receptor zmenšuje pravděpodobnost otevření jeho iontového kanálu. Frekvence otvírání iontového kanálu a doba, kdy je otevřen, jsou tak sníženy (Petrovic et al 2005).

Intenzita inhibičního účinku $3\alpha5\beta\text{S}$ závisí na podjednotkovém složení receptoru. V případě receptorů obsahujících NR2C nebo NR2D je negativní alosterický efekt $3\alpha5\beta\text{S}$ výraznější než u receptorů nesoucích NR2A či NR2B. V souvislosti s tím bylo zjištěno, že pro účinek $3\alpha5\beta\text{S}$ je zásadní extracelulární smyčka mezi transmembránovými doménami M3 a M4 na podjednotce NR2 (Petrovic et al 2005).

Podle současných poznatků jsou tonicky aktivované NMDA receptory ovlivněny $3\alpha5\beta\text{S}$ do větší míry, než je tomu u fázičky aktivovaných synaptických NMDA receptorů. To lze vysvětlit use-dependentním působením $3\alpha5\beta\text{S}$ a pomalou kinetikou jeho vazby. Tyto poznatky jsou významné pro potenciální klinické využití neurosteroidů. Během patologických podmínek spojených s excitotoxicitou dochází spíše k tonické aktivaci extrasynaptických NMDA receptorů dlouhodobě zvýšeným množstvím extracelulárního glutamátu. Neurosteroidy proto představují možné východisko pro vývoj neuroprotektivních látek omezujících patologickou aktivaci NMDA receptorů bez současného významného negativního vlivu na fyziologický synaptický přenos (Petrovic et al 2005).

Jednou z těchto potenciálně využitelných syntetických látek relevantních pro moji práci je pregnanolon glutamát (20-oxo- 5β -pregnan- 3α -yl-L-glutamyl-1-ester, Pg glu), vyrobený v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. Jde o analog $3\alpha5\beta\text{S}$, u kterého je sulfátová skupina na C3 nahrazena glutamátem. Díky tomu Pg glu prochází hematoencefalickou bariérou (maximální koncentrace v mozku je dosaženo 60 minut po intraperitoneálním podání) a nepodléhá deaktivaci způsobené v mozku se vyskytujícími steroidními sulfohydrolázami, což z něj činí potenciálně terapeuticky využitelnou látku. Ve svých účincích na NMDA receptory se Pg glu podobá $3\alpha5\beta\text{S}$ – je jejich use-dependentním inhibítozem, přednostně blokuje tonicky aktivované NMDA receptory a má neuroprotektivní účinky *in vivo* (Rambousek et al 2011).

3.3.2 Potenciace NMDA receptorů steroidy

Zástupcem přirozeně se vyskytujících neurosteroidů s potenciačním vlivem na NMDA receptory je PS. Zároveň u něj bylo zjištěno inhibiční působení na AMPA, kainátové, GABA_A a glycinové receptory (Wu et al 1991).

Později vyšlo najevo, že situace je složitější a PS potenciuje NMDA receptory obsahující podjednotky NR2A nebo NR2B, zatímco receptory s NR2C či NR2D inhibuje. PS má ve skutečnosti patrně duální (zároveň potenciační i inhibiční) vliv na receptory se všemi typy podjednotek NR2, přičemž výsledný efekt závisí na typu NR2. Pozitivní a negativní alosterický efekt jsou nejspíš zprostředkovány dvěma odlišnými vazebnými místy (potenciační a inhibiční) pro neurosteroidy. Předpokládá se, že inhibiční vazebné místo by mohlo být shodné s vazebným místem pro 3 α 5 β S (Horak et al 2006).

Potenciace NMDA receptoru PS spočívá ve zvýšení pravděpodobnosti otevření iontového kanálu NMDA receptoru. Potenciační efekt PS je přitom vyšší, je-li aplikován ještě před glutamátem. Pro potenciační i inhibiční účinek PS, podobně jako pro inhibiční efekt 3 α 5 β S, má zásadní význam extracelulární smyčka mezi transmembránovými doménami M3 a M4 na podjednotce NR2. Potenciační vazebné místo však zatím rovněž nalezeno nebylo (Horak et al 2006).

Jiným neurosteroidem pozitivně modulujícím NMDA receptory je DHEAS (Korinek et al 2011). Vliv vybraných neurosteroidů na NMDA receptory a jejich současný účinek na GABA_A receptory uvádím v tabulce 1.

Tabulka 1 – Vliv vybraných neurosteroidů na NMDA a GABA_A receptory

	NMDA receptory	GABA_A receptory
3α5βS	↓	↓
PS	↑(podjednotky NR2A, NR2B) ↓(NR2C, NR2D)	↓
DHEAS	↑	↓
Allopregnanolon	↓	↑

Tabulka ukazuje potenciační (↑) či inhibiční (↓) působení uvedených neurosteroidů (sestaveno na základě Dubrovsky 2005; Korinek et al 2011; Zorumski et al 2013).

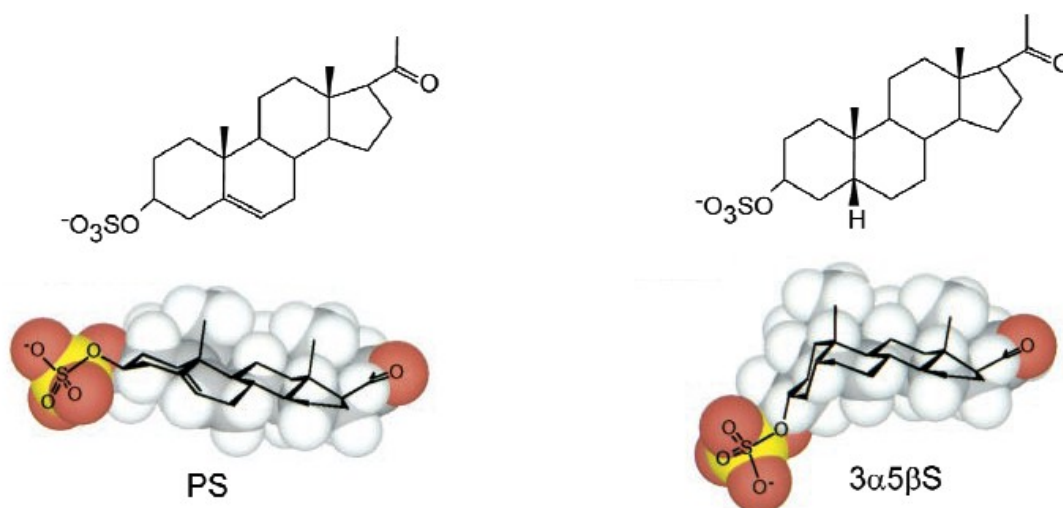
3.3.3 Vztah struktury steroidů a jejich účinku na NMDA receptory

Vzhledem ke zcela rozdílným účinkům různých steroidů (jako $3\alpha5\beta\text{S}$ a PS) na NMDA receptory se nabízí otázka, které strukturální vlastnosti steroidů jsou pro jejich efekt určující. $3\alpha5\beta\text{S}$ se přitom od PS liší jen nepřítomností dvojně vazby mezi C5 a C6 (a také konfigurací na C3).

Právě absence dvojně vazby spolu s β konfigurací na C5 dodávají $3\alpha5\beta\text{S}$ zahnutý tvar, který je charakteristickým znakem steroidů inhibujících NMDA receptory. Oproti tomu steroidy s více planární molekulou, jakou má PS, se váží spíše na potenciační vazebné místo (Weaver et al 2000). Strukturu PS a $3\alpha5\beta\text{S}$ ukazuje obr. 4.

Pro účinky $3\alpha5\beta\text{S}$ i PS je důležitá přítomnost sulfátové skupiny. Nesulfatované formy těchto neurosteroidů nemají na NMDA receptory vliv. Nahradíme-li však sulfátovou skupinu na C3 u $3\alpha5\beta\text{S}$ i PS jinou negativně nabitou skupinou, jakou představují některé estery dikarboxylových kyselin různých délek, zůstane účinek těchto steroidů na NMDA receptory (do různé míry) zachován. To ukazuje na důležitost přítomnosti nabitě skupiny na C3 u neurosteroidů působících na NMDA receptory. Syntetické analogy $3\alpha5\beta\text{S}$ jako pregnanolon hemisukcinát, pregnanolon hemioxylát a pregnanolon hemiglutarát jsou proto schopny inhibice NMDA receptorů a tím i neuroprotektivního působení (Weaver et al 2000).

Hlubší pochopení vztahu struktury steroidů a jejich vlivu na NMDA receptory je spolu s nalezením jejich vazebného místa klíčové nejen pro lepší objasnění mechanismu jejich účinku, ale především i pro vývoj látek s možným terapeutickým využitím.



Obr. 4 – Struktura PS a $3\alpha5\beta\text{S}$. Obrázek ukazuje strukturu a tvar molekuly PS, který má na NMDA receptory potenciační vliv, a $3\alpha5\beta\text{S}$, jenž je inhibuje (převzato z Sedlacek et al 2008 a Weaver et al 2000).

4. Behaviorální účinky neuroaktivních steroidů inhibujících NMDA receptory a jejich terapeutický význam

U některých zástupců neuroaktivních steroidů blokujících NMDA receptory, podobně jako u antagonistů NMDA receptorů obecně, byly zjištěny neuroprotektivní, anxiolytické (Korinek et al 2011) a antidepresivní (Zorumski et al 2013) účinky. Na rozdíl od mnoha jiných NMDA antagonistů některé neuroaktivní steroidy nemají zároveň psychotomimetické a další negativní behaviorální vedlejší účinky, které by znemožňovaly jejich využití (Rambousek et al 2011). Také díky tomu neuroaktivní steroidy inhibující NMDA receptory představují látky s potenciálním terapeutickým významem.

Oproti tomu možný význam steroidů potenciujících NMDA receptory spočívá především v jejich pozitivním vlivu na kognitivní funkce (Korinek et al 2011).

Přestože se zaměřuji na účinky neuroaktivních steroidů blokujících NMDA receptory, je nutno mít na paměti současný vliv některých těchto steroidů i na jiné membránové receptory a možné další, intracelulární cíle, které mohou k jejich účinkům přispívat. Právě schopnost interakce s více strukturami CNS činí neuroaktivní steroidy z terapeutického hlediska atraktivními (Zorumski et al 2013).

V souvislosti s terapeutickými účinky aplikace steroidů zmiňuji také změny endogenní produkce různých neurosteroidů pozorované při zkoumaných onemocněních.

4.1 Neuroprotektivní účinky

Podobně jako někteří další antagonisté NMDA receptorů, také zástupci steroidů blokujících tento typ receptoru mají neuroprotektivní účinky. Pro tuto práci jsou zvláště důležité především výsledky studie týkající se Pg glu, jednoho z námi testovaných steroidů. Jeho neuroprotektivní účinek, potenciálně významný pro klinickou praxi, byl prokázán v naší laboratoři v modelu excitotoxického poškození mozku u potkana. Zvířatům byly pomocí NMDA provedeny bilaterální léze hipokampu. Po zákroku byl s určitou časovou latencí (30 minut, 3 hodiny nebo 24 hodin) intraperitoneálně aplikován Pg glu, a to v různých dávkách (0,1, 1 nebo 10 mg/kg). Pg glu, pokud byl podán v dávce 0,1 nebo 1 mg/kg 30 minut po provedení léze, zmírnil kognitivní deficit lézí hipokampu navozený. Kognitivní funkce

byly konkrétně studovány v úloze aktivní alotetické vyhýbání se místu (AAPA). Při podání Pg glu 3 hodiny po lézi vedla ke zmírnění poškození kognitivních funkcí pouze dávka 10 mg/kg. Byl-li ale Pg glu aplikován až 24 hodin po operaci, žádná z použitých dávek již nebyla účinná (Rambousek et al 2011).

Kromě výsledků testu kognitivních funkcí na neuroprotektivní účinky Pg glu poukazuje i histochemické stanovení znaků excitotoxického poškození mozkové tkáně lézovaných potkanů (Rambousek et al 2011).

Neuroprotektivně působí i $3\alpha5\beta S$ a jeho další syntetické analogy blokující NMDA receptory, kterými jsou pregnanolon hemisukcinát, pregnanolon hemioxylát a pregnanolon hemiglutarát, jak naznačují výsledky studií *in vitro* (Weaver et al 2000). Pregnanolon hemisukcinát také snižuje rozsah poškození mozkové tkáně potkana po provedení fokální mozkové ischemie (Weaver et al 1997). Pregnanolon hemisukcinát působil neuroprotektivně i po ischemii míchy u králíka. Podání steroidu až 30 minut po ischemii zmírnilo behaviorální deficit tímto zákrokem navozený. Také v tomto případě je účinnost pregnanolon hemisukcinátu přičítána jím způsobené blokádě NMDA receptorů (Lapchak 2004).

Účinnost $3\alpha5\beta S$ *in vivo* je v porovnání s pregnanolon hemisukcinátem nižší, pravděpodobně kvůli tomu, že $3\alpha5\beta S$ je za fyziologického pH ionizovaný, a proto méně prochází hematoencefalickou bariérou. $3\alpha5\beta S$ je rovněž v mozku metabolizován steroidními sulfatázami, což může přispívat k jeho nižším protektivním účinkům *in vivo* (Weaver et al 1997). Z těchto důvodů se syntetické steroidy jako Pg glu a pregnanolon hemisukcinát, které hematoencefalickou bariérou procházejí, jeví výhodnější. Při podání těchto dvou látek zvířatům v neuroprotektivních dávkách nebyly zjištěny viditelné vedlejší účinky (Weaver et al 1997, Rambousek et al 2011).

4.2 Neurosteroidy a psychóza

Psychotomimetické a další negativní behaviorální vedlejší účinky představují hlavní překážku pro využití mnoha antagonistů NMDA receptorů (Parsons 2001).

Oproti tomu steroidní inhibitor NMDA receptorů Pg glu ani ve vysokých dávkách nezpůsobuje změny v lokomoční aktivitě, prepulzní inhibici úlekové reakce (Rambousek et al 2011) ani kognitivních funkcí potkanů (Vales et al 2012), které by na psychotomimetické účinky poukazovaly. Obdobně ani podání pregnanolon hemisukcinátu nevede k hyperlokomoci (Sadri-Vakili et al 2003). Příznivý bezpečnostní profil Pg glu pravděpodobně souvisí s jeho use-dependentním a voltage-independentním působením na

receptor. Na rozdíl od MK-801 a dalších antagonistů NMDA receptorů tak lze při podávání Pg glu dosáhnout požadovaných neuroprotektivních účinků bez nebezpečí závažných behaviorálních vedlejších účinků nebo poškození neuronů v mozkové kůře (Rambousek et al 2011).

Pg glu dokonce naopak potlačuje kognitivní deficit v animálním modelu schizofrenie vyvolaném MK-801. Hyperlokomoci, která je považována za analogii pozitivních příznaků schizofrenie, však Pg glu nesnižuje. Ke zmírnění kognitivního deficitu dochází pravděpodobně díky stabilizaci excitačního systému v mozku (Vales et al 2012).

Výsledky studií navíc poukazují na možnou úlohu neurosteroidů v patofyziologii schizofrenie a v její léčbě. U pacientů se schizofrenií byla nalezena zvýšená hladina pregnenolonu a DHEA v určitých oblastech mozku (v posteriorní cingulární a parietální kůře), zatímco množství allopregnanolonu v parietální kůře bylo sníženo. Ačkoli potenciálních vysvětlení tohoto jevu je více, mohlo by jít o kompenzační mechanismus (Marx et al 2006b). Podání pregnenolonu (Marx et al 2009) nebo DHEA (Strous et al 2003) pacientům se schizofrenií léčeným antipsychotiky má totiž na jejich stav příznivý efekt, zejména díky zmírnění negativních příznaků, dále také deprese a úzkosti.

Po podávání pregnenolonu bylo u schizofrenních pacientů zjištěno zmírnění negativních příznaků. Ty přitom nejsou současnými antipsychotiky vždy dobře léčitelné. Není přitom známo, jak pregnenolon zlepšení vyvolává, přestože bylo navrženo více možných mechanismů vysvětlujících jeho terapeutický efekt. Podávání pregnenolonu má za následek zvýšení plasmatické hladiny nejen tohoto neurosteroidu, ale i jeho metabolitů PS a allopregnanolonu (Marx et al 2009). K podobnému efektu, tedy zvýšení allopregnanolonu (Marx et al 2003) a pregnenolonu v krvi a také v mozku (Marx et al 2006a) přitom vede i léčba některými atypickými antipsychotiky jako klozapin a olanzapin, jak bylo zjištěno u potkanů. To by také mohlo přispívat k terapeutické účinnosti těchto antipsychotik (Marx et al 2003, Marx et al 2006a).

Zvýšení hladiny pregnenolonu samotného nebo zmíněných dvou jeho metabolitů představuje možné příčiny zlepšení stavu pacientů léčených pregnenolonem. Zvýšení množství PS, který pozitivně moduluje NMDA receptory, by vzhledem k pravděpodobné roli hypofunkce NMDA receptorů při schizofrenii mohlo být terapeuticky významné (Marx et al 2009). Podobně by tomu mohlo být i v případě DHEA (Strous et al 2003). Protože podání pregnenolonu či PS má pozitivní vliv na paměť, dalo by se po aplikaci pregnenolonu

předpokládat i zmírnění kognitivního deficitu při schizofrenii, i když výsledky provedené studie to přímo nepotvrzují (Marx et al 2009).

4.3 Anxieta

Vzhledem k anxiolytickým účinkům antagonistů NMDA receptorů (Chojnacka-Wojcik et al 2001) by se podobný efekt dal očekávat i u steroidů blokujících tento typ receptoru.

Experimenty s Pg glu to částečně potvrdily. Pg glu u potkanů ve zvýšeném křížovém bludišti (EPM) mírně potlačuje úzkost, ale pouze ve vysoké dávce (10 mg/kg). V tomto efektu by kromě blokády NMDA receptorů mohla hrát roli i možná interakce vysokých dávek Pg glu s GABAergní neurotransmisí (Vales et al 2012).

Anxiolytické účinky byly zjištěny také u pregnanolon hemisukcinátu, a to po jeho intraperitoneálním podání myším a následném testu v EPM. Konkrétně šlo o dávky 10 a 20 mg/kg, přičemž citlivost dvou testovaných kmenů myší vůči anxiolytickým účinkům pregnanolon hemisukcinátu byla rozdílná (Finn et al 2003).

Anxiolyticky působí u myší také allopregnanolon (Finn et al 2003). Tento jeho účinek je patrně zprostředkován GABA_A receptory, neboť jej lze blokovat jejich antagonistou pikrotoxinem (Korinek et al 2011). Tento neurosteroid se také pravděpodobně účastní patologických úzkostných stavů (Strohle et al 2003).

Farmakologicky indukované panické ataky u pacientů s panickou poruchou jsou doprovázeny poklesem hladiny allopregnanolonu a pregnanolonu v krvi. Tyto změny patrně přispívají ke snížení GABAergní neurotransmise během panické ataky a lze očekávat, že k nim dochází i během spontánních panických atak u pacientů. Není však jasné, zda změny hladin neurosteroidů přispívají ke vzniku panických atak, nebo jsou pouze jejich důsledkem. Výsledky studie každopádně poukazují na roli neurosteroidů při panických poruchách a tím i potenciálně při jejich léčbě (Strohle et al 2003).

U různých úzkostných poruch byly nalezeny i změny hladin některých dalších neurosteroidů (Dubrovsky 2005). Jejich přesná role při těchto poruchách, podobně jako při některých dalších onemocněních, není dosud zcela jasná.

4.4 Deprese

U antagonistů NMDA receptorů i u látek pozitivně modulujících GABA_A receptory byly zjištěny antidepresivní účinky. Pro vývoj antidepresiv by proto mohly být zvláště výhodné syntetické steroidy s potenciačním vlivem na GABA_A receptory a současným inhibičním

vlivem na NMDA receptory. Tyto látky by zároveň mohly být prosty nežádoucích účinků antagonistů NMDA receptorů. Testování účinnosti takovýchto látek je však v začátcích (Zorumski et al 2013).

Antidepresivní účinky byly zjištěny u endogenního steroidu allopregnanolonu, který potenciuje GABA_A a inhibuje NMDA receptory (Korinek et al 2011). Konkrétně byly pozorovány v testu nuceného plavání u laboratorních hlodavců, který představuje model deprese, po intracerebroventrikulárním, intraperitoneálním (Khisti et al 2000) i intrahipokampálním (Nin et al 2008) podání allopregnanolonu.

Podle současných poznatků navíc endogenní neurosteroidy hrají roli přímo při depresi i při její léčbě antidepresivy. Pacienti s depresí mají sníženou plasmatickou hladinu allopregnanolonu a změněné hladiny dalších neurosteroidů působících na GABA_A receptory (Romeo et al 1998, Strohle et al 1999). Tato dysregulace syntézy GABAergních neurosteroidů patrně přispívá ke snížení GABAergní neurotransmise při depresi (Romeo et al 1998).

Po léčbě antidepresivy (selektivními inhibitory zpětného vychytávání serotoninu – SSRI nebo i jinými) se hladina allopregnanolonu zvýší, a to pravděpodobně ovlivněním enzymu 3 α -HSD, zodpovědného za jeho syntézu. Normalizace hladin neurosteroidů tak nejspíš přispívá k účinku některých antidepresiv (Romeo et al 1998, Strohle et al 1999).

Mechanismus antidepresivního účinku allopregnanolonu není zcela jasný. Podle výsledků z animálního modelu deprese je za něj zodpovědný jeho silný potenciační vliv na GABA_A receptory (Khisti et al 2000). Allopregnanolon také může snižovat výlev kortikoliberinu (corticotropin-releasing hormone, CRH) v hypotalamu (Patchev et al 1994), který je při depresi zvýšen. K antidepresivnímu efektu allopregnanolonu proto může částečně přispívat i snížení aktivity osy hypotalamus-hypofýza-nadledvinky (Romeo et al 1998). Allopregnanolon, podobně jako mnoho jiných antidepresiv, navíc posiluje neurogenezi v *gyrus dentatus* v hipokampu, což regulací osy hypotalamus-hypofýza-nadledvinky může napomáhat antidepresivním účinkům (Zorumski et al 2013). Pro roli hipokampu svědčí i skutečnost, že antidepresivní efekt lze vyvolat injekcí allopregnanolonu přímo do této struktury (Nin et al 2008).

5. Neurobiologie vybraných behaviorálních úloh

Jednotlivé okruhy chování laboratorních zvířat a jejich ovlivnění farmaky lze testovat pomocí mnoha různých úloh. V následující kapitole se omezím pouze na popis některých úloh, které jsou vzhledem k této práci relevantní.

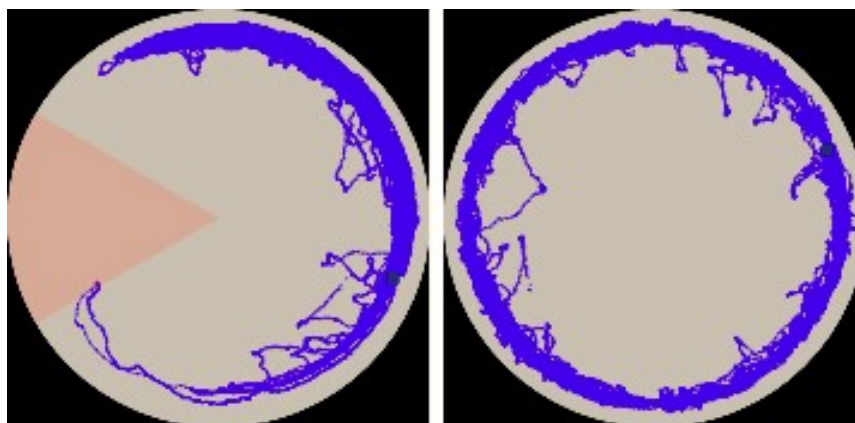
5.1 Aktivní alotetické vyhýbání se místu

Aktivní alotetické vyhýbání se místu (active allothetic place avoidance, AAPA) představuje jednu z prostorových úloh používaných k výzkumu paměti a dalších kognitivních schopností laboratorních hlodavců, zejména potkanů. Byla navržena na oddělení Neurofyzologie paměti a početních neurověd Fyziologického ústavu AV ČR. Jde o otáčející se kruhovou arénu obsahující stabilní zakázaný sektor ve tvaru kruhové výseče, vymezený v souřadnicovém systému místnosti, který se tedy s arénou neotáčí. Při vstupu do zakázané oblasti je potkan potrestán elektrickou rankou. Úkolem potkana je na základě averzivní motivace se vyhýbat zakázanému sektoru. Ten není nijak označen a potkan musí jeho polohu sám rozeznat na základě vzdálených orientačních bodů v místnosti, zapamatovat si ji a aktivním pohybem proti směru rotace arény se mu vyhýbat (Petrasek et al 2009). Pro názornost zařazuji obr. 5, ukazující počítačem zaznamenané trajektorie potkana úspěšně řešícího AAPA.

Pomocí AAPA lze studovat vliv podávání farmak nebo jiných experimentálních manipulací na kognitivní funkce. Výkon zvířat můžeme hodnotit pomocí mnoha parametrů. Hlavním měřítkem zvládnutí úlohy je počet vstupů do zakázaného sektoru během jednoho sezení. Dále můžeme měřit maximální dobu vyhýbání se sektoru (doba mezi dvěma vstupy) a také počet obdržení šoků, který ukazuje schopnost vybavit si únikovou reakci. Kromě kognitivních schopností úloha umožňuje i sledování lokomoční aktivity. Je-li lokomoční aktivita velmi nízká až nulová, poukazuje to na neschopnost zvířete řešit úlohu (Petrasek et al 2009).

Mozkovou strukturou klíčovou pro řešení AAPA je hipokampus. Zásadní význam hipokampu pro řešení úloh zaměřených na prostorovou kognici laboratorních zvířat, mezi které AAPA patří, je všeobecně uznáván (Petrasek et al 2009). Úspěšné řešení úlohy AAPA však na rozdíl od jiných prostorových úloh vyžaduje kromě prostorové paměti a navigace i jiné náročné kognitivní procesy, vedoucí k rozlišení prostorového rámce místnosti a arény.

Tato schopnost kognitivní koordinace prostorových informací z oddělených referenčních rámců je vysoce závislá na integritě obou hipokampů. Metoda AAPA je proto k poškození zmíněné mozkové struktury zvláště citlivá. I zvířata s pouze unilaterální inaktivací hipokampu, která v některých jiných úlohách zaměřených na prostorovou paměť nepředstavuje zásadní problém, vykazují v AAPA deficit (Wesierska et al 2005).



Obr. 5 – Snímky trajektorie potkana v AAPA. Snímky zobrazují dráhu potkana při čtvrtém sezení v AAPA. Zvíře si již pamatuje polohu sektoru a je schopno se mu úspěšně vyhýbat. Na obrázku vlevo, vztazeném k prostorovému rámci místnosti, vidíme zakázaný sektor (výseč vlevo) a pohyb potkana vůči němu. Je patrné, že došlo pouze k jednomu vstupu do zakázaného sektoru. Obrázek vpravo je vztazen k prostorovému rámci arény a ukazuje aktivní pohyb téhož potkana po aréně.

5.2 Open field

Open field (open field test, test otevřeného pole, OF) je behaviorální test často používaný u potkanů a myší, spočívající pouze v jejich umístění do kruhové či čtvercové arény. Sleduje se v něm explorační chování a celková aktivita zvířete v novém prostředí. Mezi nejčastěji měřené parametry patří spontánní lokomoční aktivita, kterou lze kvantifikovat jako celkovou ušlou dráhu, dále lze sledovat změny aktivity v čase, vertikální aktivitu („panáčkování“), čištění a mnoho dalších projevů v závislosti na konkrétním experimentu. Můžeme tedy sledovat i ovlivnění těchto prvků chování farmaky a jejich možné sedativní, stimulační či toxické účinky. Příčiny změn celkové aktivity však mohou být různé a zahrnují vliv na motoriku, explorační chování či anxiету. Doba sledování zvířat v aréně při jednotlivých experimentech se může lišit, nejčastěji se ale pohybuje mezi 5 až 60 minutami (Gould et al 2009).

Pomocí OF můžeme hodnotit i anxiету, a to na základě pohybu zvířete ve středu arény či naopak u jejích okrajů. Zvířata s vyšší anxiетou se kvůli přirozenému strachu z otevřených prostor více zdržují u stěn arény (thigmotaxe; Bourin et al 2007). Protože se však pro OF používají různé arény lišící se tvarem, osvětlením či tím, zda jsou shora kryté, což může chování zvířat ovlivnit, výsledky získané na různých pracovištích nemusí být vždy navzájem porovnatelné (Bourin et al 2007).

5.3 Vyvýšené křížové bludiště

Vyvýšené křížové bludiště (elevated plus maze, EPM) představuje často používaný test nepodmíněné anxiety u laboratorních hlodavců (Bourin et al 2007). Anxieta (úzkost) je emoce, kterou jedinec reaguje v situacích nejistoty, konfliktu a možného ohrožení. Patrně se jí účastní NMDA receptory ve ventrálním hipokampu (Barkus et al 2010). EPM umožňuje rychlé a snadné testování vlivu farmak na anxiету. Je založeno na strachu z otevřených prostor, který je u hlodavců přirozený (Bourin et al 2007).

EPM má tvar kříže, přičemž dvě jeho protilehlá ramena jsou otevřená a dvě ohraničená stěnami. Celé bludiště je vyvýšené nad zemí. U hlodavců dochází v EPM ke konfliktu mezi explorací a strachem z neznámých otevřených prostor. Intaktní zvířata se tedy více zdržují v uzavřených ramenech bludiště. Podání látek s anxiogenním účinkem má za následek zesílení této přirozené tendence. Naopak aplikace anxiolytik vyvolá zvýšení počtu vstupů do otevřených ramen. Právě počet vstupů do otevřených ramen a celková doba strávená v těchto částech bludiště vyjadřuje míru anxiety zvířete. V EPM mohou být případně sledovány i další projevy chování, jako vzpřimování těla nebo vyklánění hlavy dolů pod úroveň bludiště.

Při modelování anxiety u zvířat představují etologicky založené úlohy, mezi něž EPM patří, patrně lepší analogii lidské úzkosti, než je tomu u úloh podmíněných. Další výhoda etologicky založených úloh spočívá v minimalizaci vlivu jiných možných účinků farmak (změny vnímání, schopnosti učení či motivace) na výsledky (Bourin et al 2007).

5.4 NMDA léze hipokampu u potkana jako model excitotoxického poškození

Excitotoxické poškození tkáně podobné tomu, ke kterému dochází při ischemii či neurodegenerativních onemocněních, lze experimentálně vyvolat i lokální aplikací agonistů NMDA receptorů včetně NMDA (Beal et al 1991).

Injekcí NMDA přímo do hipokampu je možné dosáhnout destrukce různých buněčných typů v celé této struktuře, přičemž jiné části mozku zůstanou nezasázeny. Míra poškození závisí na koncentraci podaného roztoku excitotoxinu, zatímco velikost zasažené oblasti je ovlivněna objemem roztoku (Jarrard 2002).

Provedení NMDA lézí hipokampu u laboratorních zvířat (především potkanů) a sledování behaviorálních změn jimi způsobených umožňuje výzkum role hipokampu v jednotlivých okruzích chování (Jarrard 2002). Vzhledem k zásadnímu významu hipokampu pro prostorovou paměť se u zvířat s lézí této struktury projevuje deficit v úlohách testujících tento typ paměti (Lynch 2004). Po bilaterálních excitotoxických lézích dorzálního hipokampu (zasahujících 30–50 % objemu hipokampu) nebo celého hipokampu dochází u potkanů ke zhoršení prostorové paměti, pozorovatelnému v Morrisově vodním bludišti (Broadbent et al 2004). Kognitivní deficit vyvolaný lézemi dorzálního hipokampu je patrný také v AAPA (Rambousek et al 2011).

Poškození hipokampu přitom může být zmírněno aplikací antagonistů NMDA receptorů (Jarrard 2002). Pomocí efektivity učení lze proto kvantifikovat míru účinku potenciálně neuroprotektivních látek včetně námi testovaných neurosteroidů.

6. Cíle práce

V této práci jsme vycházeli ze známých účinků syntetického neuroaktivního steroidu Pg glu, jehož neuroprotektivní vlastnosti a minimum nežádoucích účinků byly již dříve prokázány v naší laboratoři Neurofyziologie paměti FgÚ AV ČR. Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na srovnání jednoduchých strukturálních modifikací molekuly tohoto steroidu (zvýšení lipofility a připojení kladně nabitě skupiny na C3) z hlediska behaviorálních účinků u laboratorních hlodavců. Byly zvoleny modelové molekuly, které jsou stabilní a dobře syntetizovatelné.

Cíle práce byly:

- 1) prokázat neuroprotektivní účinky zvolených neuroaktivních steroidů (Experiment 1),
- 2) prostudovat vliv syntetických neuroaktivních steroidů, vybraných na základě jejich neuroprotektivního účinku, na motorickou koordinaci, reflexy, anxieta, spontánní lokomoční aktivitu a také možné sedativní či anestetické účinky vysokých dávek (Experiment 2),
- 3) vytvořit baterii behaviorálních testů aplikovatelnou pro rychlé testování biologických vlastností dalších analogů Pg glu.

7. Materiál a metody

7.1 Použitá zvířata

V Experimentu 1 byli použiti dospělí (3 měsíce, 300–400 g) samci laboratorního potkana kmene Long-Evans. Zvířata pocházela z chovů Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Potkani byli ustájeni v průhledných plastových boxech o rozměrech 50 x 25 x 25 cm, umístěných ve zvěřinci s 12hodinovým světelným cyklem (světla se ráno zapínala vždy v 7:00 hodin). Zvířata měla volný přístup k potravě a vodě.

V Experimentu 2 byli použiti dospělí (30 g) samci laboratorní myši kmene CD-1, pocházející z chovů Velaz. Myši byly ustájeny v plastových boxech o rozměrech 31 x 16 x 13 cm v samostatném zvěřinci. Světelný cyklus byl stejný jako u potkanů. Myši měly volný přístup k potravě i vodě.

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

7.2 Použité chemikálie a léčiva

Neuroaktivní steroidy pregnanolon glutamát (Pg glu), pregnanolon argininát (Pg arg), androstan glutamát (And glu) a androstan argininát (And arg) byly připraveny spolupracujícím pracovištěm v Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Neuroaktivní steroidy byly rozpuštěny v roztoku 3 g (2-hydroxypropyl)- β -cyklodextrinu (CDX, Sigma-Aldrich) a 157 mg kyseliny citronové (3-hydroxy-penta-1, 3, 5-trikarboxylová kyselina, Sigma-Aldrich) v 30 ml destilované vody. pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí hydroxidu sodného (NaOH, Sigma-Aldrich). Takto byly připraveny roztoky všech čtyř steroidů pro aplikaci dávek 0,1, 1, 10 a 100 mg/kg.

Další testovanou látkou byl memantin (Sigma-Aldrich) v dávce 5 mg/kg u potkanů, ketamin (Vétoquinol) v dávce 10 mg/kg a MK-801 (Sigma-Aldrich) v dávce 0,03 mg/kg u myší. Tyto tři látky byly rozpuštěny ve fyziologickém roztoku (B Braun).

Testované látky byly zvířatům aplikovány intraperitoneálně. Potkanům byl vždy aplikován 1 ml roztoku na 1 kg tělesné hmotnosti. U myší bylo vzhledem k jejich nižší hmotnosti podáváno 10 ml/kg pro přesnost aplikace.

K anestezii potkanů při operacích byl použit isofluran (3,5%, Baxter). Pro vyvolání excitotoxických lézí dorzálního hipokampu byl aplikován 0,05M roztok NMDA (Sigma-Aldrich) v 0,4M fosfátovém pufru. 0,4M fosfátový pufr byl připraven smísením roztoku 356 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (m. v. 358,14) v 4,2 l destilované vody a roztoku 62,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (m. v. 156,01) v 0,8 l destilované vody. pH výsledného roztoku NMDA bylo upraveno pomocí NaOH na hodnotu 7,4.

Během operace jsme použili Septonex (IVAX Pharmaceuticals, s. r. o.) a lékařskou vazelinu (Herbacos-Bofarma), k pooperační péči pak antibiotikum Framykoin (Zentiva) a analgetikum a nesteroidní antirevmatikum Nurofen (Reckitt Benckiser Healthcare International Ltd).

7.3 Použité přístroje

Při operacích byl použit dvouramenný stereotaktický aparát (Kopf Instruments) a mikroinfuzní pumpa (TSE Systems). K anestezii byl použit odpařovač pro isofluran (A. E. Services & Supplies) a inhalační maska pro potkany.

Speciální aparatury použité při behaviorálních úlohách budou spolu s postupem při experimentu popsány níže.

7.4 Metodické postupy

7.4.1 Experiment 1

V tomto experimentu byly hodnoceny neuroprotektivní účinky neuroaktivních steroidů. Postup byl modifikován dle (Rambousek et al 2011).

7.4.1.1 Bilaterální excitotoxické léze dorzálního hipokampu

Potkani byli náhodně rozděleni do jedenácti skupin. První skupina byla nazvána sham a zahrnovala kontrolně operovaná zvířata, kterým byl do hipokampu aplikován fosfátový pufr s pH upraveným na 7,4. Druhou skupinu, nazvanou NMDA, tvořila zvířata, kterým byly provedeny NMDA léze hipokampu. Zvířatům ve třetí skupině byl po provedení NMDA léze aplikován nesteroidní use-dependentní antagonist NMDA receptorů memantin v dávce 5 mg/kg. Zbýlých osm skupin tvořila zvířata, kterým byl po operaci podán Pg glu, Pg arg, And glu či And arg v dávce 1 nebo 10 mg/kg.

Anestezie byla zahájena v indukční komoře, kde byli potkani vystaveni isofluranu (3,5%). Pak jim byla ostříhána srst na hlavě a kůže desinfikována Septonexem. Oči zvířete byly zakryty tamponem potřeným vazelinou, aby nedošlo k jejich podráždění a vyschnutí.

Poté byli potkani upevněni do stereotaktického aparátu a v pokračující isofluranové (1,5 – 2%) anestezii jim byla skalpelem rozříznuta kůže na hlavě a obnažena lebka. Následně byly pomocí mikrovrtáčky provedeny dva malé otvory do lebky, umístěné bilaterálně nad oblastí dorzálního hipokampu. Vzniklými otvory byl pomocí mikroinfuzní pumpy bilaterálně aplikován 1 μ l 0,05M roztoku NMDA do obou hipokampů (–4 mm anterioposteriorně od bregmy, \pm 2,5 mm mediolaterálně, 4 mm pod povrch lebky), a to rychlostí 0,2 μ l/min. Ihned poté byl zvířatům intraperitoneálně aplikován neuroaktivní steroid v příslušné dávce. Zvířatům z kontrolních skupin sham a NMDA byl intraperitoneálně aplikován roztok CDX. Po zažití rány, jejím ošetření Framykoinem a ukončení inhalační anestezie byla zvířata přemístěna do plastového boxu. Následujících 48 hodin byl potkanům v pitné vodě podáván Nurofen *ad libitum* (2,5 ml/0,5 l vody).

7.4.1.2 Aktivní alotetické vyhýbání se místu

Aparaturu pro aktivní alotetické vyhýbání se místu (AAPA) tvořila kruhová aréna s kovovým dnem o průměru 82 cm a s průhlednými plexisklovými stěnami (výška 30 cm). Motor umístěný na spodní straně arény zajišťoval její otáčení po směru hodinových ručiček konstantní rychlostí 1 otáčka/min. Před testem byl potkanovi na záda upevněn postroj s LED diodou. Pomocí této diody a druhé (referenční) diody umístěné na okraji arény program iTrack (Biosignal Group) automaticky zaznamenával pozici zvířete v aréně po dobu trvání experimentu.

Zakázaný sektor na aréně měl podobu kruhové výseče (60°) a byl definován počítačem v souřadnicovém systému místnosti. Pokud potkan vstoupil do tohoto sektoru, byl mu do končetin udělen slabý elektrický impuls (monofázický, trvající 500 ms a s individuálně kalibrovanou intenzitou proudu od 0,3 do 0,7 mA). Jestliže zvíře sektor neopustilo, impuls se každých 1200 ms opakoval. Vodivé spojení bylo zajištěno kabelem, připojeným svorkou k zakroucené injekční jehle, kterou měl potkan trvale implantovanou ve volné kůži na zádech. Aplikace jehly není pro potkana bolestivá.

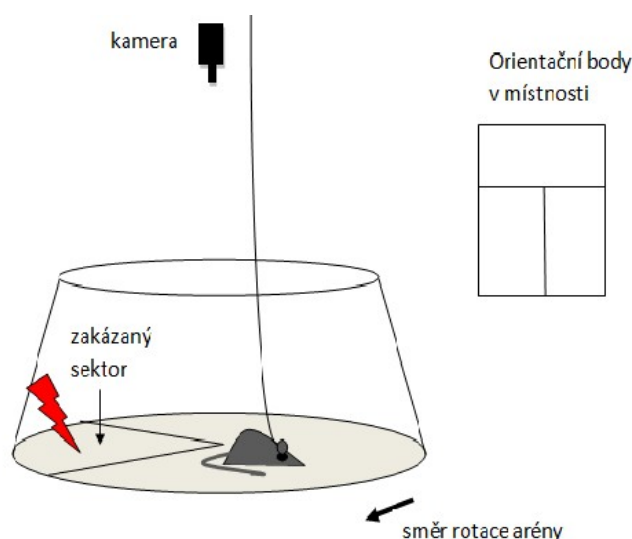
Aréna se nacházela v malé oddělené místnosti s definovaným slabým osvětlením. Předměty zde umístěné mohly potkanům sloužit jako orientační body. Před testováním každého zvířete byla aréna očištěna detergentem. Uspořádání aparatury pro AAPA při experimentu ukazuje obr. 6.

Testování paměti a prostorové kognice potkanů pomocí AAPA bylo zahájeno po zotavení zvířat jeden týden po operaci. Experiment probíhal dva po sobě následující dny. První den byl

potkan nejprve do arény na pět minut umístěn bez rotace a bez elektrických impulsů za účelem habituace na arénu a monitorování lokomoční aktivity. Následovala dvě dvacetiminutová sezení v AAPA, mezi kterými byla tři až čtyřhodinová pauza. Příští den se dvě dvacetiminutová sezení zopakovala. Poloha zakázaného sektoru byla po celou dobu stejná.

Čtyři sezení v AAPA jsou u zdravých potkanů dostačující pro dosažení asymptotické úrovně a tedy optimální zvládnutí úlohy při posledním sezení (Stuchlik et al 2008). Pro zhodnocení paměti a prostorové kognice byla využita data ze čtvrtého sezení, a to počet vstupů do zakázaného sektoru a maximální doba vyhýbání se sektoru. Tato data byla off-line analyzována (programem TrackAnalysis, Biosignal Group) a následně statisticky vyhodnocena.

Po ukončení experimentu byla lokalizace léze orientačně histologicky verifikována.



Obr. 6 – Schematické znázornění aparatury pro AAPA. Úkolem potkana je vyhýbat se stabilnímu zakázanému sektoru na otáčející se aréně. Sektor je definován vzhledem k místnosti, potkan se tedy při jeho lokalizaci musí řídit orientačními body v místnosti, nikoli na aréně.

7.4.2 Experiment 2

Jako modelový organismus byla pro tento experiment zvolena laboratorní myš. Laboratorní myš je pro účely rychlého screeningu behaviorálních účinků testovaných látek vhodnější pro menší velikost a nižší spotřebu studovaných látek. Na základě výstupu předchozího experimentu byly pro další testování vyselektovány pouze steroidy Pg glu

a And glu, které vykazovaly vyšší neuroprotektivní účinnost v modelu excesivního působení glutamátu (viz Experiment 1).

7.4.2.1 Primární behaviorální screen

Účelem primárního behaviorálního screenu bylo rychlé zjištění vlivu látek na CNS dependentní funkce a případných zjevných projevů toxicity. Šlo o zjednodušenou modifikaci Irwinova testu zvolenou s ohledem na behaviorální profil antagonistů NMDA receptorů.

Myši byly testovány jednotlivě. Zvířatům byl intraperitoneálně podán Pg glu nebo And glu v dávce 1 mg/kg. Kontrolní skupiny tvořili jedinci, jimž byl aplikován roztok CDX nebo fyziologický roztok. Počet myší v jednotlivých skupinách v celém Experimentu 2 byl šest.

Vzápětí byla myš umístěna do průhledné plastové nádoby tvaru válce (průměr 10 cm, výška 20 cm) a po dobu 30 minut bylo sledováno její chování. Zaměřili jsme se především na výskyt abnormalit, jako je sedace, třes, zjevení srsti nebo slinění. Ihned poté byla otestována úleková reakce jako odpověď na tlesknutí a některé další reflexy. Prvním z nich byl righting reflex, což je reflex korigující polohu těla zvířete po jeho obrácení. Pro zjištění righting reflexu bylo zvíře položeno na záda a změřen čas do jeho otočení zpět do přirozené polohy (postavení na nohy). Dále jsme hodnotili negativní geotaxi, kdy byla myš za ocas zvednuta do vzduchu a měřil se čas do projevení snahy zvednout tělo nahoru. Otestovali jsme též schopnost přesného uchopení, která je založena na přirozené tendenci myši zachytit se končetinami např. hrany akvária, je-li před ní podržena ve vzduchu za ocas. Hodnotilo se, zda k uchopení dojde bez viditelné nepřesnosti, poukazující na senzorní či motorické narušení.

Následoval test rovnováhy a motorické koordinace pomocí laťky (beam walking). K tomu byla použita dřevěná laťka (délka 120 cm, šířka 1,7 cm), upevněná ve výšce 90 cm. Zvíře bylo postaveno na konec laťky a byl měřen čas do jeho spontánního přeběhnutí na druhý konec, kde byl umístěn box s ostatními myšmi. Tento test byl opakován třikrát po sobě. Zároveň jsme počítali výskyt úšlapů. Počet úšlapů a čas do přeběhnutí laťky je v tomto testu ukazatelem schopnosti koordinace pohybů a rovnováhy zvířat (Luong et al 2011).

7.4.2.2 Vyvýšené křížové bludiště

Test ve vyvýšeném křížovém bludišti (EPM) sloužil ke zjištění vlivu látek na anxieta zvířat. Byly studovány účinky Pg glu a And glu v dávkách 1 a 10 mg/kg. Kontrolní skupiny představovala zvířata, kterým byl aplikován fyziologický roztok, a zvířata, jimž byl podán

roztok CDX. Pro srovnání byla zařazena skupina myši, jimž byl podán nekompetitivní antagonist NMDA receptorů ketamin (10 mg/kg). Látky byly myším aplikovány intraperitoneálně 30 minut před testováním v EPM.

EPM se skládalo ze čtyř ramen a bylo vyrobeno z hnědého plastu. Dvě protilehlá ramena byla otevřená (bez okrajů), zatímco dvě zbývající byla ohraničena okraji (výška 15 cm). Délka každého ze čtyř ramen byla 30 cm, šířka 5 cm. Celé bludiště bylo vyvýšeno 45 cm nad zemí a bylo osvětleno umělým světlem. Před každým použitím bylo bludiště očištěno etanolem a vodou.

Zvíře bylo umístěno do středu EPM tak, aby hlavou směřovalo do jednoho z uzavřených ramen. Experiment trval 10 minut a jeho průběh byl natáčen videokamerou umístěnou nad bludištěm. Během experimentu byl měřen počet vstupů do otevřených ramen a celková doba strávená v otevřených ramenech. Za vstup byla považována situace, když měla myš celý trup včetně pánve v otevřeném rameni bludiště.

7.4.2.3 Open field

Aréna pro open field (OF) měla kruhový tvar (průměr 82 cm) a byla ohraničena průhlednými okraji. Byla umístěna v samostatné místnosti s definovaným osvětlením.

Před testem byl myši intraperitoneálně aplikován Pg glu nebo And glu v dávce 0,1, 1 nebo 10 mg/kg. Jako kontroly byly použity intaktní myši a myši, kterým byl podán roztok CDX. Pro srovnání účinků s nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů byla dalším myším podána látka MK-801 (0,3 mg/kg). Myš byla ihned umístěna přibližně do středu arény. Zde byla následně po dobu 50 minut počítačovým systémem (iTrack, Biosignal Group) monitorována její dráha.

Ze získaného záznamu byla posléze vyhodnocena celková dráha jako ukazatel lokomoční aktivity. Kromě toho byla posouzena dráha ušlá během jednotlivých desetiminutových úseků experimentu. Na základě těchto hodnot bylo možné zjistit časovou latenci nástupu účinku a změny lokomoční aktivity v průběhu času.

7.4.2.4 Účinky vysokých dávek

Pro zjištění možných anestetických, sedativních či případně toxických účinků vysokých dávek neuroaktivních steroidů byla myším aplikována příslušná látka v dávce 100 mg/kg. Myši byly vráceny do jejich boxu, kde byly následně pozorovány. V průběhu času byla sledována lokomoční aktivita a případné zjevné změny jako třes, ataxie, neklid, případně

sedace (ospalost, přivřené oči, sezení na místě bez lokomoční aktivity) nebo celková anestezie (absence reakcí na podněty, snížení svalového tonu). Reakce na podněty (štípnutí do ocasu, tlesknutí) byly u myši zjišťovány v pětiminutových intervalech. Stav zvířat byl průběžně sledován až do jejich probuzení nebo normalizace chování.

Přehledný seznam testovaných steroidů a jejich dávek použitých ve všech úlohách ukazuje tabulka 2 a 3.

Tabulka 2 – Dávky Pg glu, Pg Arg, And glu a And Arg použité u potkanů v rámci Experimentu 1

Testované vlastnosti látek	Testované dávky Pg glu, Pg Arg, And glu, And Arg
Neuroprotektivní účinnost	1 mg/kg, 10 mg/kg

Tabulka 3 – Dávky Pg glu a And glu a jejich účinky zjišťované u myši v rámci Experimentu 2

Testované vlastnosti látek	Testované dávky Pg glu, And glu
Primární behaviorální screen	1 mg/kg
Vliv na anxiету	1 mg/kg, 10 mg/kg
Vliv na spontánní lokomoční aktivitu	0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg
Účinky vysokých dávek	100 mg/kg

7.4.3 Statistické vyhodnocení

Statistickému vyhodnocení byla podrobena data získaná v Experimentu 1 (počet vstupů a maximální doba vyhýbání se sektoru při čtvrtém sezení v AAPA) a dále data z OF (celková dráha, plocha pod křivkou časového průběhu lokomoční aktivity) a z EPM (počet vstupů do otevřených ramen bludiště a doba zde strávená) v rámci Experimentu 2.

Data byla vyhodnocena pomocí neparametrického testu s využitím kritéria Mann Whitney v programu GraphPad. Rozdíl byl považován za signifikantní pro $p < 0,05$, za nesignifikantní tendenci pak pro $0,05 < p < 0,075$. V grafech jsou zobrazeny průměry, chybové úsečky vyjadřují standardní chybu průměru (SEM).

8. Výsledky

8.1 Experiment 1

8.1.1 Operace

Do následného testování v AAPA byla zařazena pouze zvířata v dobrém zdravotním stavu bez výrazných obtíží. V AAPA bylo použito celkem 77 zvířat.

Po absolvování testů v AAPA byli potkani utraceni a lokalizace léze byla orientačně histologicky verifikována. Pozice poškození hipokampu byla u všech potkanů ve skupinách srovnatelná.

8.1.2 Aktivní alotetické vyhýbání se místu

NMDA léze dorzálního hipokampu u potkanů indukovaly kognitivní deficit, projevující se jako signifikantní zvýšení počtu vstupů do zakázaného sektoru a signifikantní snížení maximální doby vyhýbání se sektoru při čtvrtém sezení v AAPA ve srovnání se skupinou sham.

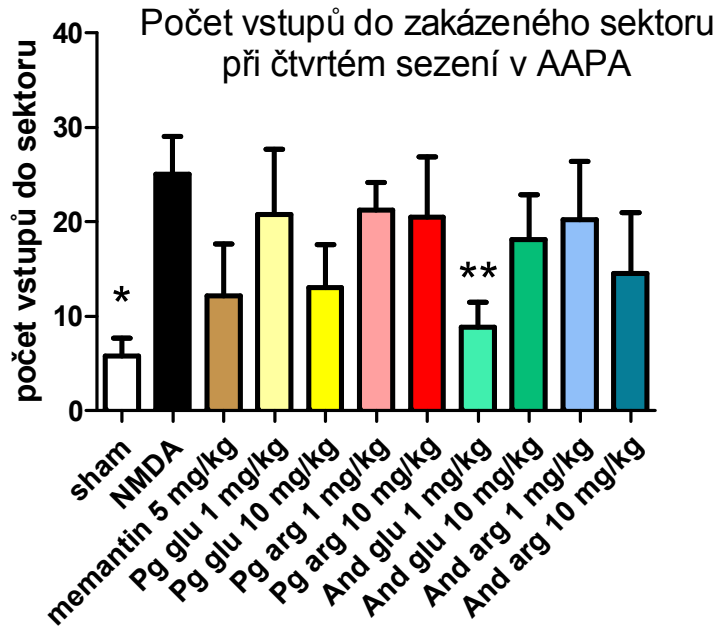
U potkanů, kterým byl po operaci aplikován And glu v dávce 1 mg/kg, došlo k signifikantnímu snížení počtu vstupů do zakázaného sektoru při čtvrtém sezení v AAPA oproti skupině NMDA. And glu (1 mg/kg) zároveň signifikantně zvýšil maximální čas vyhýbání se sektoru při čtvrtém sezení vzhledem k NMDA. Tyto poznatky poukazují na zmírnění kognitivního deficitu a tedy neuroprotektivní účinnost And glu.

V případě podání Pg glu v dávce 1 mg/kg jsme pozorovali signifikantní zvýšení maximální doby vyhýbání oproti NMDA. K signifikantnímu snížení počtu vstupů do sektoru v porovnání se skupinou NMDA však po aplikaci této látky nedošlo.

Dále jsme zaznamenali tendenci ke zvýšení maximální doby vyhýbání u potkanů s aplikovaným Pg glu v dávce 10 mg/kg ($p = 0,0734$) oproti NMDA. Tendence ke snížení počtu vstupů ale patrná nebyla.

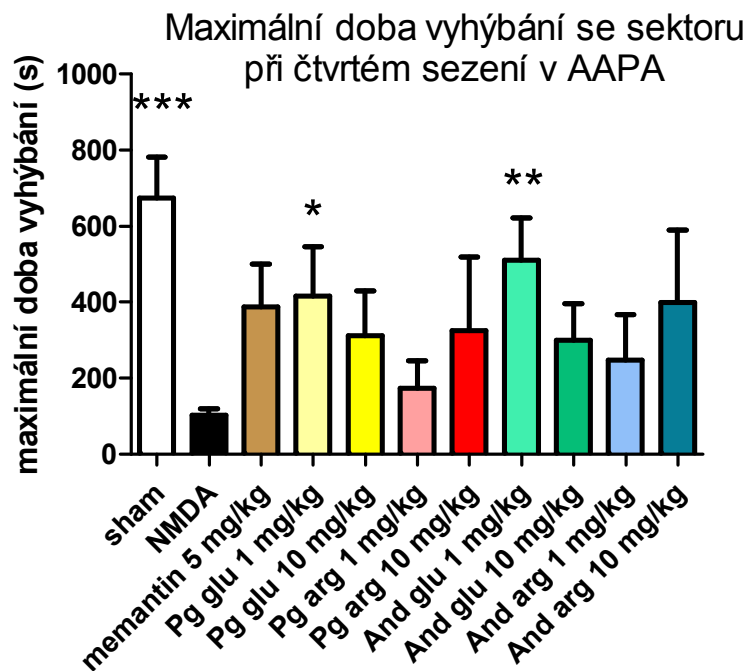
Ostatní neuroaktivní steroidy (Pg arg, And arg) i memantin byly bez signifikantních neuroprotektivních účinků. Kognitivní deficit byl nejvýraznější ve skupině NMDA. Naopak nejlepší výsledky testu kognitivních funkcí vykazovala kontrolně operovaná zvířata (sham).

Počty vstupů do zakázaného sektoru a maximální dobu vyhýbání se tomuto sektoru v závislosti na látce podané po provedení NMDA léze dorzálního hipokampu ukazuje obr. 7 a obr. 8.



Obr. 7 – Počty vstupů do zakázaného sektoru při čtvrtém sezení v AAPA v závislosti na aplikované látce. U potkanů s aplikovaným And glu v dávce 1 mg/kg došlo k signifikantnímu snížení počtu vstupů oproti skupině NMDA, které žádná účinná látka po operaci podána nebyla.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve srovnání se skupinou NMDA.



Obr. 8 – Maximální doba vyhýbání se zakázanému sektoru při čtvrtém sezení v AAPA v závislosti na aplikované látce. U potkanů s aplikovaným Pg glu v dávce 1 mg/kg a u potkanů, kterým byl podán And glu v dávce 1 mg/kg, byla maximální doba vyhýbání ve srovnání se skupinou NMDA signifikantně delší. Po podání Pg glu v dávce 10 mg/kg byla patrná tendence ($p = 0,0734$) k prodloužení maximální doby vyhýbání oproti NMDA.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve srovnání se skupinou NMDA.

8.2 Experiment 2

8.2.1 Primární behaviorální screen

Primární behaviorální screen neodhalil žádné abnormální chování po podání Pg glu ani And glu (1 mg/kg). Reflexy všech myší i jejich rovnováha a motorická koordinace byly normální. Nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly mezi skupinami.

8.2.2 Vyvýšené křížové bludiště

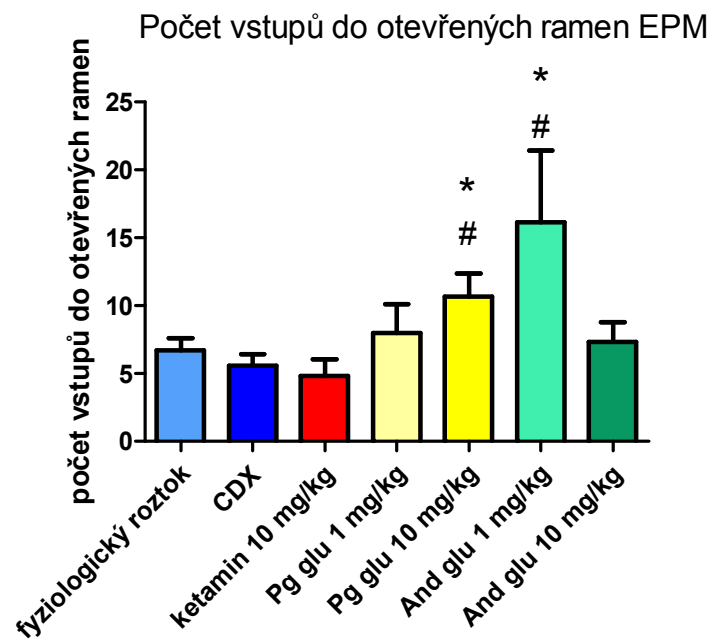
Vliv neurosteroidních látek na anxieta zvířat byl sledován v EPM. Míra anxiety byla hodnocena na základě počtu vstupů do otevřených ramen a celkové doby strávené v otevřených ramenech bludiště. Bylo prokázáno signifikantní zvýšení obou sledovaných parametrů po podání Pg glu v dávce 10 mg/kg a And glu v dávce 1 mg/kg, a to ve srovnání s kontrolní skupinou s aplikovaným fyziologickým roztokem i se skupinou s podaným roztokem CDX. Tyto poznatky poukazují na anxiolytické účinky uvedených dávek Pg glu a And glu. Nejvyšších hodnot počtu vstupů do otevřených ramen i doby zde strávené ze všech testovaných skupin bylo dosaženo po podání And glu v dávce 1 mg/kg.

Aplikace And glu v dávce 10 mg/kg měla za následek signifikantní prodloužení celkové doby strávené v otevřených ramenech EPM oproti zvířatům s aplikovaným fyziologickým roztokem i oproti zvířatům s roztokem CDX. Počet vstupů do otevřených ramen po podání And glu (10 mg/kg) se však od žádné z kontrolních skupin (fyziologický roztok, CDX) signifikantně nelišil.

Pg glu v dávce 1 mg/kg ani nesteroidní antagonisty NMDA receptorů ketamin (10 mg/kg) neměly na žádný z parametrů anxiety signifikantní vliv.

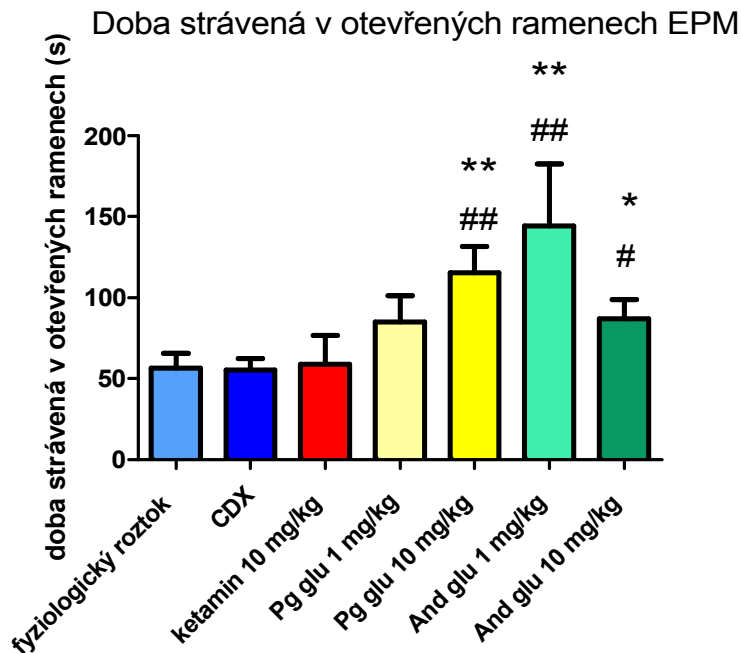
Zvířata, kterým byl aplikován CDX, a zvířata, která dostala fyziologický roztok, nevykazovala signifikantní rozdíly v počtu vstupů do otevřených ramen EPM ani v době zde strávené.

Počty vstupů do otevřených ramen EPM v závislosti na aplikované látce ukazuje obr. 9, celkovou dobu strávenou v otevřených ramenech pak obr. 10.



Obr. 9 – Počet vstupů do otevřených ramen EPM v závislosti na aplikované látce. U myši, kterým byl podán And glu v dávce 1 mg/kg, došlo k signifikantně vyššímu počtu vstupů do otevřených ramen EPM v porovnání se zvířaty, kterým byl aplikován roztok CDX, i s těmi, jimž byl podán fyziologický roztok. Obdobný signifikantní efekt mělo i podání Pg glu v dávce 10 mg/kg.

* $p < 0,05$ ve srovnání se skupinou „fyziologický roztok“, # $p < 0,05$ ve srovnání se skupinou „CDX“.



Obr. 10 – Celková doba strávená v otevřených ramenech EPM v závislosti na aplikované látce. Po podání Pg glu v dávce 10 mg/kg i obou testovaných dávek And glu došlo k signifikantnímu prodloužení této doby, a to oproti zvířatům, jimž byl podán fyziologický roztok, i oproti zvířatům s aplikovaným CDX.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve srovnání se skupinou „fyziologický roztok“, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ve srovnání se skupinou „CDX“.

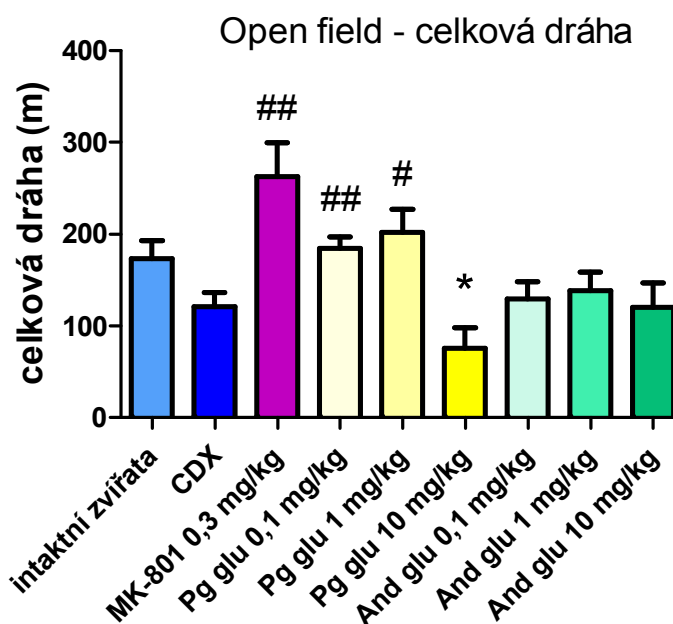
8.2.3 Open field

Vliv neuroaktivních steroidů na spontánní lokomoční aktivitu zvířat byl hodnocen podle celkové dráhy ušlé v OF za dobu 50 minut. Mezi celkovou dráhou myší obou kontrolních skupin (intaktní zvířata a CDX) nebyl signifikantní rozdíl.

Podání MK-801 (0,3 mg/kg) mělo za následek signifikantní prodloužení celkové dráhy vůči kontrolní skupině s aplikovaným roztokem CDX. Vůči intaktním zvířatům byla patrná tendence ke zvýšení ($p = 0,0653$).

Po aplikaci Pg glu v dávkách 0,1 i 1 mg/kg došlo k signifikantnímu zvýšení dráhy oproti skupině CDX. Vůči intaktním zvířatům však ke statisticky významné změně nedošlo. Naopak podání Pg glu v dávce 10 mg/kg vedlo k signifikantnímu snížení dráhy ve srovnání s intaktními myšmi. Jiné signifikantní rozdíly mezi dráhou myší s aplikovaným Pg glu a kontrolními skupinami zjištěny nebyly.

V případě And glu nevedla žádná z testovaných dávek k signifikantní změně dráhy oproti dráze intaktních myší ani dráze kontrolní skupiny s CDX. Vliv jednotlivých dávek neuroaktivních steroidů na celkovou dráhu v OF ukazuje obr. 11.



Obr. 11 – Celková dráha v OF v závislosti na aplikované látce. Myši, jimž byl podán Pg glu v dávkách 0,1 nebo 1 mg/kg, ušly během 50minutového testu v OF signifikantně delší dráhu než myši, kterým byl podán CDX. V porovnání s intaktními zvířaty však ke signifikantní změně nedošlo. Po aplikaci Pg glu v dávce 10 mg/kg byla dráha signifikantně kratší oproti intaktní skupině zvířat. Podání MK-801 vedlo k signifikantnímu prodloužení dráhy oproti skupině CDX a k tendenci k prodloužení dráhy vůči intaktním zvířatům ($p = 0,0653$). And glu v žádné z testovaných dávek nevyvolal signifikantní změnu ušlé dráhy oproti kontrolním skupinám.

* $p < 0,05$ ve srovnání se skupinou „intaktní zvířata“, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ve srovnání se skupinou „CDX“.

Hodnoty dráhy ušlé v jednotlivých desetiminutových úsecích experimentu jsou v přímé spojitosti se změnami lokomoční aktivity v čase. Pro statistické porovnání těchto změn jsme použili výpočet plochy pod křivkou, který je přímým vyjádřením časového průběhu změn v ušlé dráze. Výpočet plochy pod křivkou byl proveden vždy pro každé pozorování, následně takto získaná data byla statisticky porovnána mezi jednotlivými skupinami.

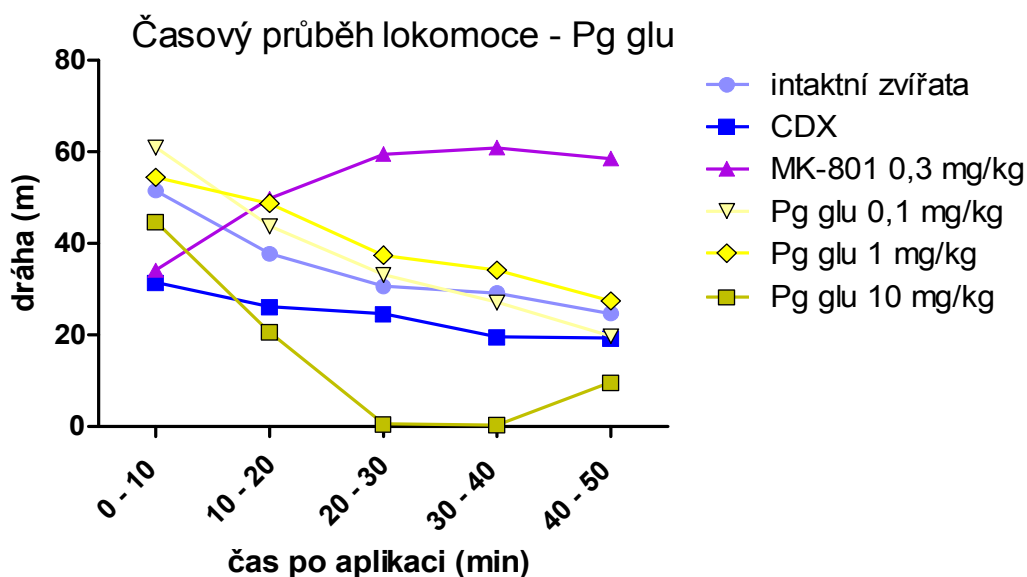
Výsledky ukazují, že lokomoce intaktních zvířat se postupně snižovala. Tento trend byl obdobný i u skupiny myši po podání CDX. V lokomoční aktivitě intaktních zvířat a zvířat s aplikovaným CDX nebyl signifikantní rozdíl.

V případě MK-801 (0,3 mg/kg) naopak došlo k postupnému zvyšování lokomoční aktivity. Na nejvyšší a poměrně neměnné úrovni se lokomoce udržovala mezi 20. a 50. minutou po podání MK-801 (obr. 12a). Celková lokomoční aktivita po podání MK-801 byla oproti oběma kontrolním skupinám signifikantně vyšší.

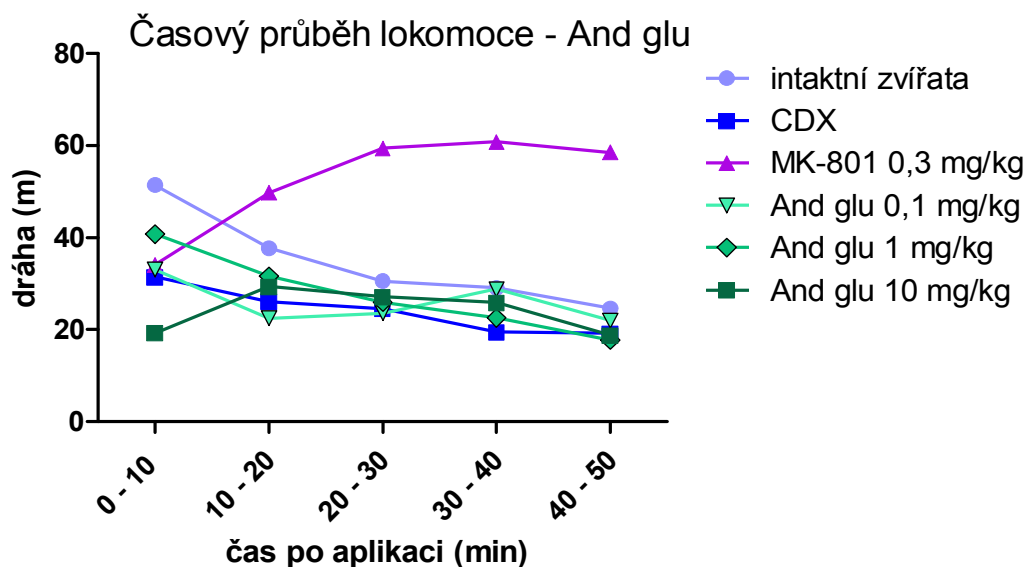
Aplikace Pg glu v dávce 10 mg/kg vyvolala značný pokles lokomoční aktivity. Mírný pokles lokomoce byl patrný již po 10. minutě po aplikaci. Mezi 20. a 40. minutou byla lokomoce myši téměř nulová (obr. 12a). Celková lokomoční aktivita myši po podání Pg glu (10 mg/kg) byla signifikantně nižší oproti oběma kontrolním skupinám.

Podání ostatních zkoumaných dávek neuroaktivních steroidů (Pg glu 0,1 a 1 mg/kg, And glu 0,1, 1 a 10 mg/kg) nezpůsobilo výrazné změny průběhu lokomoční aktivity v čase ani signifikantní změnu celkové lokomoční aktivity oproti intaktním zvířatům. Po podání nižších dávek (0,1 a 1 mg/kg) Pg glu jsme pozorovali signifikantně vyšší lokomoční aktivitu v porovnání se zvířaty, jimž byl podán roztok CDX. K žádným dalším signifikantním rozdílům od kontrolních skupin nedošlo.

Časový průběh lokomoční aktivity v OF po podání Pg glu ukazuje obr. 12a, stejné údaje pro And glu pak obr. 12b. Obr. 12c vyjadřuje časový průběh lokomoční aktivity jednotlivých skupin zvířat formou plochy pod křivkou lokomoční aktivity zvířat v OF.

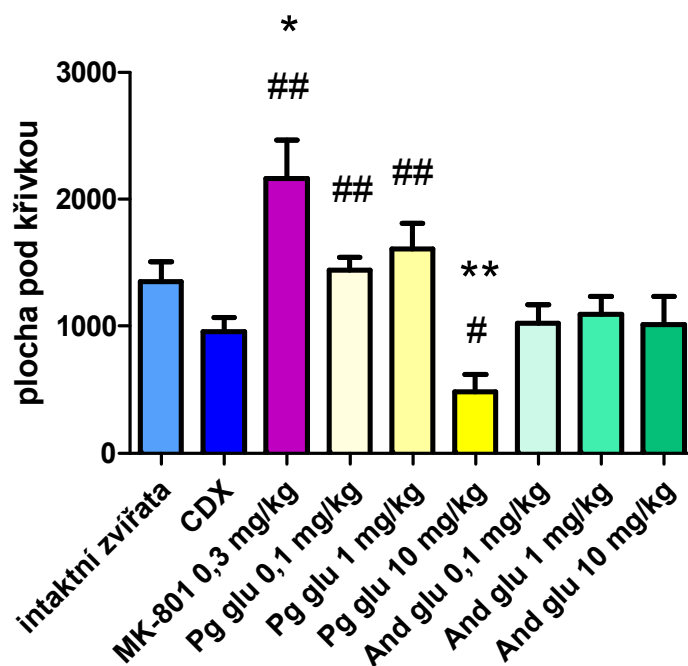


Obr. 12a – Časový průběh lokomoční aktivity v OF po podání Pg glu. Aplikace Pg glu v dávce 10 mg/kg vyvolala signifikantní pokles lokomoce oproti kontrolním (intaktním i CDX) zvířatům. Nejnižších hodnot lokomoce dosáhla mezi 20. a 40. minutou po podání Pg glu (10 mg/kg), kdy byla prakticky nulová. Naopak aplikace nižších dávek (0,1 a 1 mg/kg) Pg glu výrazné změny vůči intaktním zvířatům nevyvolala. Aplikace MK-801 (0,3 mg/kg) vyvolala signifikantní hyperlokomoci oproti oběma kontrolním skupinám. Hyperlokomoce byla nejvíce patrná mezi 20. a 50. minutou experimentu.



Obr. 12b – Časový průběh lokomoční aktivity v OF po podání And glu. Žádná ze tří testovaných dávek And glu nezpůsobila zásadní změny průběhu lokomoční aktivity v porovnání s intaktními zvířaty a zvířaty, jimž byl podán roztok CDX.

Časový průběh lokomoční aktivity - plocha pod křivkou časového průběhu lokomoční aktivity



Obr. 12c – Vyjádření časového průběhu lokomoční aktivity zvířat v OF po podání Pg glu a And glu formou plochy pod křivkou (průměr + SEM). Podání Pg glu v dávce 10 mg/kg způsobilo signifikantní snížení lokomoční aktivity oproti oběma kontrolním skupinám zvířat. Podání nižších dávek (0,1 a 1 mg/kg) vedlo k signifikantnímu zvýšení lokomoce oproti zvířatům s aplikovaným roztokem CDX. Aplikace MK-801 měla za následek signifikantně vyšší lokomoční aktivitu v porovnání a oběma kontrolními skupinami zvířat.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ve srovnání se skupinou „intaktní zvířata“, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ ve srovnání se skupinou „CDX“.

8.2.4 Účinky vysokých dávek

Podání Pg glu v dávce 100 mg/kg vyvolalo u všech testovaných myší celkovou anestezii. Její nástup byl velmi rychlý. Do tří minut po aplikaci látky ustala lokomoční aktivita a začala se projevovat počínající anestezie (ospalost, cukání, ataxie). K úplné anestezii (absence reakce na podnět) došlo u všech zvířat do 15 minut po aplikaci injekce. Anestezie trvala v průměru 4 hodiny. Teprve po uplynutí této doby se u myší dostavila reakce na podněty. Samotné probouzení z anestezie bylo poměrně rychlé a po úplném probuzení jsme u myší nezaznamenali žádné behaviorální abnormality.

Po podání And glu v dávce 100 mg/kg jsme u 50 % myši pozorovali silné sedativní účinky (ospalost, přivřené oči, sezení na místě bez lokomoční aktivity), které se dostavily 3 až 5 minut po aplikaci látky. Předcházelo jim takřka okamžité snížení lokomoce a následný mírný třes a neklid. Sedace trvala 15 až 45 minut. Poté se myši opět chovaly normálně. U dalších 50 % myši ovšem došlo k předávkování. 10 až 35 minut po injekci u nich nastala hluboká anestezie, která nakonec vedla až ke kómatu a smrti zvířat.

9. Diskuze

Prvním cílem mé práce bylo zjistit neuroprotektivní účinnost zvolených neuroaktivních steroidů *in vivo*. Na základě toho byly vyselektovány účinné molekuly. Druhým cílem bylo u těchto účinných molekul prozkoumat další behaviorální účinky, které by se s ohledem na NMDA antagonismus daly očekávat (vliv na anxieta, spontánní lokomoční aktivitu, reflexy, motorickou koordinaci, anestetické účinky vysokých dávek). S tím související třetí cíl práce představovalo sestavení baterie behaviorálních testů vhodné pro testování dalších analogů Pg glu.

Zvolenými zástupci neuroaktivních steroidů byly Pg glu, Pg arg, And glu a And arg. Tyto syntetické analogy přirozeně se vyskytujícího neurosteroidu $3\alpha5\beta S$ use-dependentním mechanismem blokují NMDA receptory, jak vyplývá z výsledků studií *in vitro*. O antagonistech NMDA receptorů je přitom známo, že *in vivo* mají anxiolytické (Chojnacka-Wojcik et al 2001), antidepresivní (Engin et al 2009), neuroprotektivní a ve vyšších dávkách i anestetické (Muir & Lees 1995) účinky. Na druhou stranu ale často mají i závažné negativní dopady na chování (indukují stavy podobné psychóze, způsobují ataxii), které mnohdy představují překážku pro jejich klinické využití (Parsons 2001). S ohledem na předpokládané využití je proto třeba vyvíjet látky, které by si zachovaly neuroprotektivní účinnost bez současných nežádoucích účinků, což by podle současných poznatků mohly nejlépe splňovat právě látky blokující pouze aktivované receptory (Chen & Lipton 2006).

Výsledky experimentů prováděných dříve v naší laboratoři ukazují na neuroprotektivní účinnost a minimum nežádoucích psychotomimetických účinků Pg glu (Rambousek et al 2011). V této práci jsem se zaměřila na dopad dvou zvolených nových strukturálních modifikací molekuly Pg glu na neuroprotektivní účinnost a další behaviorální účinky u laboratorních hlodavců. První z těchto strukturálních modifikací bylo zvýšení lipofility (reprezentováno molekulami And glu a And arg), druhou pak navázání kladně nabitě skupiny na C3 (molekuly Pg arg, And arg).

V Experimentu 1 jsme prokázali neuroprotektivní účinek And glu v dávce 1 mg/kg a Pg glu v dávce 1 mg/kg v modelu bilaterálního excitotoxického poškození dorzálního hipokampu u potkana, vyvolaného lokální aplikací NMDA. Neuroprotektivní účinnost byla hodnocena na základě behaviorálního korelátu funkčních dopadů tohoto poškození, což představuje vhodnou metodu pro rychlý screening účinnosti potenciálních neuroprotektiv. Neuroprotektivní účinnost byla hodnocena pomocí úlohy AAPA, zaměřené na kognitivní

funkce zvířat. Protektivní účinky And glu (1 mg/kg) se projevily signifikantně lepším výkonem zvířat v obou hodnocených parametrech kognitivní výkonnosti (počet vstupů do zakázaného sektoru a maximální doba vyhýbání se sektoru v AAPA) ve srovnání se zvířaty, kterým po operaci neuroprotektivní látka aplikována nebyla. Efekt Pg glu (1 mg/kg) se signifikantně projevil pouze v jednom ze sledovaných parametrů (maximální doba vyhýbání se sektoru v AAPA). V případě vyšší dávky (10 mg/kg) tohoto neuroaktivního steroidu jsme zaznamenali tendenci ke zvýšení maximální doby vyhýbání se sektoru, která ovšem nedosáhla statisticky významné úrovně.

Use-dependentní antagonist NMDA receptorů memantin ve zvolené dávce (5 mg/kg) k signifikantnímu zlepšení kognitivních funkcí zvířat nevedl. V této dávce proto pravděpodobně nemá u potkana neuroprotektivní účinky, což není v rozporu s literaturou. Neuroprotektivní účinnost memantinu byla v modelech excitotoxického poškození mozku u potkana popsána při vyšších dávkách (20 mg/kg; Chen et al 1998; Creeley et al 2006). Při dávkách nižších než 20 mg/kg protektivní efekt memantinu u potkana pozorován nebyl (Creeley et al 2006). Memantin byl schválen pro léčbu Alzheimerovy choroby a v současnosti je s úspěchem používán při terapii tohoto onemocnění (Chen & Lipton 2006; Peskind et al 2006). Přesný mechanismus tohoto terapeutického efektu memantinu však není zcela jasný a kromě NMDA antagonismu a s ním spojených neuroprotektivních účinků by k němu mohl přispívat i vliv na jiné receptory (Creeley et al 2006; Chen & Lipton 2006).

Neuroprotektivní potenciál má dále i nekompetitivní antagonist NMDA receptorů MK-801, avšak za současných nežádoucích účinků, které znemožňují jeho klinické využití (Chen & Lipton 2006). V případě kompetitivního antagonisty NMDA receptorů Selfotelu (Davis et al 2000) ani antagonisty Gly_B vazebného místa gavestinelu (Sacco et al 2001) žádný protektivní efekt u pacientů s iktem prokázán nebyl.

Zjištěná neuroprotektivní účinnost Pg glu je v souladu s výsledky našich dřívějších experimentů zaměřených na testování jeho účinnosti ve stejném modelu poškození mozku. I dávková závislost účinku Pg glu byla obdobná – při podání krátce po provedení léze vedl Pg glu v dávce 1 mg/kg k neuroprotekcii, zatímco vyšší dávka (10 mg/kg) účinná nebyla (Rambousek et al 2011). Důvody této dávkové závislosti nejsou jasné. Jedním z faktorů, které je nutno brát v potaz, je možný vliv použitých neuroaktivních steroidů i na jiné receptory. Ten by mohl ovlivnit celkové účinky určitých dávek neuroaktivních steroidů na CNS. Vliv testovaných látek na další receptory však dosud nebyl dostatečně prozkoumán. Afinita použitých neuroaktivních steroidů ke GABA_A receptorům a intracelulárním steroidním receptorům je studována v současné době.

Ve zmíněné předchozí studii byly neuroprotektivní účinky Pg glu potvrzeny i na morfologické úrovni (Rambousek et al 2011). Kromě Pg glu byly neuroprotektivní účinky *in vivo* prokázány i u pregnanolon hemisukcinátu, dalšího syntetického analogu $3\alpha5\beta$ S inhibujícího NMDA receptory, a to v modelu fokální mozkové ischemie u potkana (Weaver et al 1997) a ischemie míchy u králíka (Lapchak 2004). Neuroprotektivní účinnosti pregnanolon hemisukcinátu a dalších dvou syntetických záporně nabitých neuroaktivních steroidů rovněž odvozených od $3\alpha5\beta$ S, kterými jsou pregnanolon hemioxylát a pregnanolon hemiglutarát, nasvědčují výsledky studií *in vitro* (Weaver et al 2000).

Naopak kladně nabitě neuroaktivní steroidy Pg arg ani And arg v žádné z námi testovaných dávek signifikantní neuroprotektivní účinky ani významnou tendenci k protektivní účinnosti neměly. Přítomnost kladně nabitě skupiny na C3 tak k vyšší neuroprotektivní účinnosti nevedla. Z tohoto důvodu jsme se při testování dalších účinků neuroaktivních steroidů v Experimentu 2 zaměřili pouze na Pg glu a And glu.

Testy provedené v rámci Experimentu 2 neodhalily žádné závažné negativní behaviorální účinky. U obou testovaných látek (Pg glu i And glu) v neuroprotektivně účinné dávce (1 mg/kg) nedošlo ke zjevným projevům toxicity, abnormálnímu chování ani narušení motoriky či reflexů myší, které by mohlo znemožnit další použití těchto látek.

Pg glu ani And glu v žádné ze tří použitých dávek (0,1, 1 a 10 mg/kg) nezpůsobovaly zvýšení lokomoční aktivity v OF oproti intaktním myším, které by mohlo poukazovat na nežádoucí psychotomimetické účinky, jež jsou u antagonistů NMDA receptorů poměrně časté. Tyto poznatky jsou v souladu s výsledky našich dřívějších experimentů u laboratorních potkanů (Rambousek et al 2011). U této látky navíc nebyl zjištěn negativní vliv na prepulzní inhibici úlekové reakce (Rambousek et al 2011) ani na kognitivní funkce potkanů (testované v AAPA; Vales et al 2010). Psychotomimetické účinky nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů se přitom u potkanů projevují právě změnami ve zmíněných parametrech (Moghaddam & Jackson 2003). Psychotomimetický potenciál Pg glu se proto jeví být minimální. Nepřítomnost hyperlokomoce naznačuje, že ani v případě And glu nejsou závažné psychotomimetické účinky pravděpodobné. Zároveň je známo, že ke zvýšení lokomoční aktivity nedochází ani po podání pregnanolon hemisukcinátu (v dávkách do 20 mg/kg; Sadri-Vakili et al 2003).

Naopak po podání nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801 (0,3 mg/kg) jsme pozorovali zvýšení lokomoční aktivity. Z literatury jsou tyto hyperlokomoční (Engin et al 2009; Vales et al 2010) i další psychotomimetické účinky MK-801 u laboratorních hlodavců (Moghaddam & Jackson 2003) dobře známy. Nekompetitivní antagonisté NMDA

receptorů se dokonce používají k modelování schizofrenii podobného chování u potkanů a následnému výzkumu podstaty tohoto onemocnění a vývoji antipsychotik (Moghaddam & Jackson 2003).

Důvody absence psychotomimetických účinků Pg glu jsou výzvou k dalšímu studiu. Možným vysvětlením je use-dependentní mechanismus inhibice receptoru. Pg glu blokuje pouze NMDA receptory předtím aktivované agonistou, podobně jako tomu je u přirozeně se vyskytujícího $3\alpha5\beta S$ (Rambousek et al 2011). Účinek látek s takovýmto mechanismem vazby na receptor je nejvyšší za přítomnosti patologicky nadměrného množství glutamátu, kdy je aktivováno velké množství NMDA receptorů. Za této situace mohou zmíněné látky přispívat k neuroprotekcí. Naopak za normální koncentrace glutamátu (při synaptickém přenosu) je efekt takovýchto látek nižší. Fyziologická funkce NMDA receptorů nutná pro normální činnost CNS tak není příliš omezena, tudíž nedochází k výrazným nežádoucím účinkům (Chen & Lipton 2006). Ty jsou typické hlavně pro nekompetitivní antagonisty, kteří blokují NMDA receptory nezávisle na jejich předchozí aktivaci. Use-dependentní mechanismus účinku má kromě námi testovaných neuroaktivních steroidů i memantin. Jde přitom o látku úspěšně používanou v klinické praxi (Vales et al 2010) s minimem nežádoucích účinků u pacientů (Peskind et al 2006).

Výsledky testu lokomoční aktivity v OF dále ukázaly, že po podání vyšší dávky (10 mg/kg) Pg glu došlo ke snížení lokomoční aktivity oproti intaktním myším i kontrolním myším s aplikovaným roztokem CDX, který sloužil k rozpouštění steroidů. To poukazuje na možné mírné sedativní účinky této dávky Pg glu u myší. Ve dříve provedeném experimentu s potkany však po podání této dávky Pg glu sedativní efekt pozorován nebyl (Rambousek et al 2011). Jedním z možných vysvětlení je rozdílná citlivost potkana a myši k sedativním účinkům Pg glu.

Analýza dráhy myši v jednotlivých časových úsecích experimentu odhalila, že nejvýraznější snížení lokomoční aktivity (takřka k nulovým hodnotám) se dostavilo po 20. minutě po aplikaci Pg glu (10 mg/kg) a u většiny myši trvalo až do konce experimentu. Časová latence nástupu účinku naznačuje, že Pg glu pravděpodobně proniká do mozku myši poměrně rychle, podobně jako tomu je u potkana. Je známo, že maximální koncentrace Pg glu v mozku potkana je dosaženo 60 minut po intraperitoneální aplikaci (Rambousek et al 2011).

Dále jsme se v této práci zaměřili na vliv Pg glu a And glu na úzkost, hodnocenou v EPM u myši. Tento test byl zařazen s ohledem na anxiolytické účinky vyskytující se u zástupců různých farmakologických skupin antagonistů NMDA receptorů (Kotlinska & Liljequist 1998; Chojnacka-Wojcik et al 2001; Engin et al 2009).

Anxiolytické účinky jsme prokázali po podání vyšší zkoumané dávky Pg glu (10 mg/kg) a nižší dávky And glu (1 mg/kg). Anxiolytické účinky těchto dávek Pg glu a And glu se projeví v obou sledovaných parametrech anxiety (počet vstupů do otevřených ramen EPM a celková doba zde strávená). Po podání vyšší dávky And glu (10 mg/kg) byla ovlivněna pouze celková doba strávená v otevřených ramenech EPM v porovnání s intaktními zvířaty.

U ketaminu jsme ve zvolené dávce (10 mg/kg) potlačení úzkosti u myši v EPM nepozorovali. Z literatury je přitom známo, že použitá dávka ketaminu nepůsobí anxiolyticky ani ve stejném testu úzkosti u potkana a anxiolytické účinky se dostávají až při vyšších dávkách (Engin et al 2009).

Anxiolytické účinky v různých animálních modelech úzkosti jsou známy i u dalšího nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801, dále u některých kompetitivních antagonistů včetně D-2-amino-7-fosfonoheptanoátu (Chojnacka-Wojcik et al 2001) a D-2-amino-5-fosfonoheptanoátu (Nascimento Hackl & Carobrez 2007) i u antagonisty Gly_B vazebného místa NMDA receptoru L701,324 (Kotlinska & Liljequist 1998). Potlačení úzkosti u laboratorních zvířat bylo zjištěno i po dlouhodobém podávání vysokých dávek memantinu (Minkeviciene et al 2008). U některých jiných antagonistů Gly_B vazebného místa však výrazné anxiolytické účinky pozorovány nebyly (Chojnacka-Wojcik et al 2001).

Zjištěné anxiolytické účinky Pg glu v dávce 10 mg/kg u myši jsou v souladu s výsledky experimentů dříve provedených v naší laboratoři, při kterých byl prokázán anxiolytický účinek této dávky Pg glu v EPM u potkana. Potlačení úzkosti se tedy dostavuje po podání spíše vyšších dávek Pg glu a není vyloučeno, že kromě NMDA antagonismu v něm hraje roli potenciační vliv na GABA_A receptory (Vales et al 2012). Anxiolytické účinky v EPM byly dále zjištěny i po podání pregnanolon hemisukcinátu myším (v dávce 10 a 20 mg/kg; Finn et al 2003). Možný výskyt těchto účinků by se proto dal očekávat i u dalších neuroaktivních steroidů blokujících NMDA receptory. Antagonisté NMDA receptorů včetně těch steroidních by mohli být v budoucnu využitelní pro terapii úzkostných poruch.

Pro orientační zjištění bezpečného dávkového rozmezí a prozkoumání možných anestetických účinků neuroaktivních steroidů jsme zařadili test účinků vysokých dávek (100 mg/kg) těchto látek. Podání Pg glu vyvolalo u všech zvířat anestezii. Její nástup byl rychlý, délka dostatečná (průměrně 4 hod), nedošlo k mortalitě a po probuzení jsme nepozorovali žádné abnormální chování. Oproti tomu po aplikaci And glu nastala u poloviny zvířat silná sedace, trvající 15 až 45 minut. U druhé poloviny zvířat však došlo k předávkování. Zvolená dávka se v případě And glu evidentně již nacházela mimo bezpečné dávkové rozmezí. Pozorované toxické účinky však nepředstavují překážku pro případné

využití And glu jako neuroprotektiva vzhledem ke značnému rozdílu mezi účinnou a toxickou dávkou.

Jedním z možných vysvětlení silnějších účinků And glu oproti Pg glu jsou jeho odlišné farmakokinetické vlastnosti, konkrétně vyšší průnik do mozku. Je známo, že po intraperitoneálním podání dosahuje And glu vyšší maximální koncentrace v mozku ve srovnání s Pg glu. And glu zároveň disponuje vyšší afinitou k NMDA receptorům než Pg glu (dosud nepublikované výsledky získané během projektu studia biologických vlastností neuroaktivních steroidů).

Anestetické účinky antagonistů NMDA receptorů jsou známy a v případě ketaminu i klinicky využívány (Muir & Lees 1995). Anestezie pozorovaná po podání Pg glu není proto překvapivá. Rychle nastupující sedativní účinky, které jsme pozorovali u And glu, byly doloženy i u pregnanolon hemisukcinátu (již v dávkách od 25 mg/kg; Weaver et al 1997). Není však jasné, proč jeden z námi testovaných neuroaktivních steroidů způsobil anestezii, zatímco druhý vyvolal sedaci. K alespoň částečnému objasnění situace by mohly přispět výsledky vazebných studií zabývajících se vlivem testovaných látek na GABA_A receptory, které v současné době probíhají.

Ze čtyř testovaných steroidů byl neuroprotektivní účinek prokázán u And glu a Pg glu. Zároveň And glu ani Pg glu v neuroprotektivních dávkách nemá nežádoucí vliv na reflexy, motoriku, spontánní lokomoční aktivitu a nezpůsobuje zjevné behaviorální abnormality. Tyto poznatky jsou příznivé a svědčí pro potenciální budoucí využitelnost zástupců use-dependentních inhibitorů NMDA receptorů na bázi neuroaktivních steroidů při vývoji farmak pro terapii patologických stavů spojených s excesivním působením glutamátu.

Pro budoucí vývoj těchto potenciálně klinicky významných molekul je klíčové hlubší pochopení vztahu struktury molekuly steroidů a jejich biologických účinků. Ke zjištění strukturálních vlastností neuroaktivních steroidů spojených s co možná nejvyšší neuroprotektivní účinností *in vivo* a přijatelným poměrem risk/benefit by mohl napomoci screening biologické účinnosti různých strukturálních modifikací neuroaktivních steroidů.

U neuroaktivních steroidů s kladně nabitou skupinou připojenou na C3 nebyla v našem experimentu zjištěna významná neuroprotektivní účinnost.

Naopak zvýšení lipofility se u molekuly nesoucí záporný náboj ukázalo být přínosné a dokonce bylo spojeno s výraznější neuroprotektivní účinností. Je známo, že tato námi testovaná molekula (And glu) má ve srovnání s Pg glu vedle vyšší lipofility i vyšší afinitu k NMDA receptoru, více proniká do mozku a míra jím způsobené inhibice NMDA receptorů je vyšší.

Dalším cílem mé práce bylo sestavení baterie behaviorálních testů, která bude použitelná pro screening biologických účinků dalších neuroaktivních steroidů blokujících NMDA receptory.

Tato baterie testů bude sloužit k odhalení možných nežádoucích účinků a zjištění případných dalších behaviorálních účinků, které by se na základě farmakologie těchto látek (NMDA antagonismus) daly předpokládat. S ohledem na potenciální budoucí klinický význam těchto látek bude následovat test neuroprotektivní účinnosti, a to v modelu excitotoxického poškození hipokampu u potkana.

Baterie behaviorálních testů by měla být použitelná ke screeningu účinků většího počtu nových látek. Proto byl při výběru konkrétních metod k testování vlivu látek na jednotlivé výše zmíněné okruhy chování kladen důraz na dobrý poměr vypovídací hodnoty a proveditelnosti. Pokud by některá z nich odhalila nečekané výsledky, které by vyžadovaly bližší prozkoumání, mohli bychom posléze zařadit další speciální testy na tyto projevy zaměřené. K takové situaci však nedošlo.

Pro testování nežádoucích účinků jsme použili testy vybraných reflexů a dále behaviorální úlohy beam walking a OF u myši. Dále byl zařazen i test účinku vysokých dávek studovaných látek. Vliv látek na anxieta byl testován v EPM.

Ke zjištění neuroprotektivní účinnosti bude i u dalších neuroaktivních steroidů sloužit excitotoxické poškození dorzálního hipokampu u potkana, vyvolané lokální aplikací NMDA, a následný test kognitivních funkcí v úloze AAPA. Sledování behaviorálních korelátů funkčních důsledků excesivního působení glutamátu představuje jednu z metod vhodných pro screening účinnosti potenciálně neuroprotektivních látek u laboratorních zvířat. Tato metoda byla již dříve v naší laboratoři praktikována s dobrými výsledky (Rambousek et al 2011).

Námi sestavená behaviorální baterie byla v současnosti rozšířena o další dvě behaviorální úlohy. Prvním z nich je úloha pasivního vyhýbání u potkana, která slouží ke zjištění vlivu studovaných látek na paměť intaktních zvířat. Druhou nově zařazenou úlohou je test nuceného plavání (forced swim test, FST) u myši, pomocí kterého jsou testovány možné antidepressivní účinky. Vzhledem ke známým antidepressivním účinkům antagonistů NMDA receptorů a negativnímu vlivu některých těchto látek na kognitivní funkce má zařazení obou nových testů do naší behaviorální baterie své opodstatnění.

10. Závěr

V této práci jsem se zabývala vlivem strukturálních modifikací molekuly neuroaktivního steroidu Pg glu na biologické účinky. První zvolenou strukturální modifikací bylo zvýšení lipofility, druhou přidání kladně nabitě skupiny na C3. Všechny čtyři testované neuroaktivní steroidy jsou use-dependentními inhibitory NMDA receptorů.

Neuroprotektivní účinky neuroaktivních steroidů byly sledovány v modelu excitotoxického poškození dorzálního hipokampu u laboratorního potkana, vyvolaného lokální aplikací NMDA. Neuroprotektivní účinnost byla hodnocena na základě testu kognitivních funkcí zvířat, jejichž narušení je jedním z funkčních důsledků poškození hipokampu.

V tomto modelu excesivního působení glutamátu jsme prokázali neuroprotektivní účinek Pg glu a And glu. Systémová aplikace těchto neuroaktivních steroidů, provedená ihned po zákroku, snížila následný kognitivní deficit zvířat. Neuroprotektivní efekt byl výraznější v případě And glu. Naopak u kladně nabitých neuroaktivních steroidů (Pg arg a And arg) se signifikantní neuroprotektivní účinky neprojevíly.

V druhé části práce jsem se zaměřila na zjištění možných anxiolytických, sedativních a některých nežádoucích behaviorálních účinků Pg glu a And glu u myší. Nezaznamenali jsme, že by podání těchto látek v neuroprotektivní dávce (1 mg/kg) mělo negativní vliv na motoriku a reflexy, indukovalo viditelně abnormální chování nebo v porovnání s intaktními zvířaty signifikantně ovlivňovalo spontánní lokomoční aktivitu. Neuroprotektce tedy pravděpodobně lze dosáhnout bez současných závažných nežádoucích behaviorálních účinků, které jindy silně limitují až znemožňují využití mnoha antagonistů NMDA receptorů.

Tyto příznivé výsledky naznačují potenciální budoucí využití neuroaktivních steroidů use-dependentně inhibujících NMDA receptory při terapii akutních či chronických stavů spojených s excitotoxicitou a poukazují na význam jejich dalšího výzkumu a vývoje.

Dále jsme prokázali anxiolytické účinky And glu (1 a 10 mg/kg) i Pg glu (10 mg/kg) v EPM, které by rovněž mohly být klinicky významné.

Po aplikaci velmi vysoké dávky And glu (100 mg/kg) jsme pozorovali silné sedativní účinky. U poloviny testovaných zvířat došlo k předávkování. Stejná dávka Pg glu vyvolala anestezii a k předávkování nedošlo.

Provedením experimentů jsme zároveň úspěšně zavedli baterii behaviorálních testů, použitelnou ke screeningu žádoucích i základních nežádoucích behaviorálních účinků nových

neuroaktivních steroidů blokujících NMDA receptory. Jednotlivé testy, z nichž se baterie skládá, byly voleny s ohledem na předpokládané využití neuroaktivních steroidů blokujících NMDA receptory jako neuroprotektiv a na známé behaviorální účinky antagonistů NMDA receptorů.

11. Seznam použité literatury

- Arundine M, Tymianski M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-37.
- Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JNP, Bannerman DM. 2010. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol* 626:49-56.
- Baulieu EE. 1998. Neurosteroids: a novel function of the brain. *Psychoneuroendocrinology* 23:963-87.
- Beal MF, Swartz KJ, Finn SF, Mazurek MF, Kowall NW. 1991. Neurochemical characterization of excitotoxin lesions in the cerebral cortex. *J Neurosci* 11:147-58.
- Becker A, Peters B, Schroeder H, Mann T, Huether G, Grecksch G. 2003. Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:687-700.
- Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-56.
- Bourin M, Petit-Demouliere B, Dhonnchadha BN, Hascoet M. 2007. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 21:567-74.
- Bristow LJ, Flatman KL, Hutson PH, Kulagowski JJ, Leeson PD, Young L, Tricklebank MD. 1996. The atypical neuroleptic profile of the glycine/N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, L-701,324, in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 277:578-85.
- Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14515-20.
- Compagnone NA, Mellon SH. 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol* 21:1-56.
- Contestabile A. 2000. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 32:476-509.
- Corpechot C, Robel P, Axelson M, Sjovall J, Baulieu EE. 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4704-7.
- Creeley C, Wozniak DF, Labruyere J, Taylor GT, Olney JW. 2006. Low doses of memantine disrupt memory in adult rats. *J Neurosci* 26:3923-32.

- Davis SM, Lees KR, Albers GW, Diener HC, Markabi S, Karlsson G, Norris J. 2000. Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke* 31:347-54.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Dubrovsy BO. 2005. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:169-92.
- Engin E, Treit D, Dickson CT. 2009. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. *Neuroscience* 161:359-69.
- Finn DA, Roberts AJ, Long S, Tanchuck M, Phillips TJ. 2003. Neurosteroid consumption has anxiolytic effects in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 76:451-62.
- Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE. 2009. The open field test. In: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests (Neuromethods)*, Gould TD (ed.). Humana Press, New Jersey. 1-20.
- Grotta J, Clark W, Coull B, Pettigrew LC, Mackay B, Goldstein LB, Meissner I, Murphy D, LaRue L. 1995. Safety and tolerability of the glutamate antagonist CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke. Results of a phase IIa randomized trial. *Stroke* 26:602-5.
- Guscott MR, Clarke HF, Murray F, Grimwood S, Bristow LJ, Hutson PH. 2003. The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol* 476:193-9.
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5:405-14.
- Harrison NL, Simmonds MA. 1984. Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res* 323:287-92.
- Horak M, Vlcek K, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2006. Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* 137:93-102.
- Hynie S. 2001. *Farmakologie v kostce*. 2. vydání. TRITON, Praha. 21.
- Chen HS, Lipton SA. 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97:1611-26.

- Chen HS, Wang YF, Rayudu PV, Edgecomb P, Neill JC, Segal MM, Lipton SA, Jensen FE. 1998. Neuroprotective concentrations of the N-methyl-D-aspartate open-channel blocker memantine are effective without cytoplasmic vacuolation following post-ischemic administration and do not block maze learning or long-term potentiation. *Neuroscience* 86:1121-32.
- Chojnacka-Wojcik E, Klodzinska A, Pilec A. 2001. Glutamate receptor ligands as anxiolytics. *Curr Opin Investig Drugs* 2:1112-9.
- Church J, Zeman S, Lodge D. 1988. The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology* 69:702-9.
- Jarrard LE. 2002. Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: update. *Hippocampus* 12:405-14.
- Kapur S, Seeman P. 2002. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors-implications for models of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:837-44.
- Kemp JA, McKernan RM. 2002. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5, suppl.:1039-42.
- Kew JNC, Kemp JA. 2005. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* 179:4-29.
- Khisti RT, Chopde CT, Jain SP. 2000. Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnan-20-one in mice forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 67:137-43.
- Koolman J, Roehm KH. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd edition. Thieme, Stuttgart. 54-56.
- Korinek M, Kapras V, Vyklicky V, Adamusova E, Borovska J, Vales K, Stuchlik A, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2011. Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects. *Steroids* 76:1409-18.
- Kotlinska J, Liljequist S. 1998. A characterization of anxiolytic-like actions induced by the novel NMDA/glycine site antagonist, L-701,324. *Psychopharmacology (Berl)* 135:175-81.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS. 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.

- Labrie F, Belanger A, Cusan L, Gomez JL, Candas B. 1997. Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2396-402.
- Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA. 1995. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13:9-19.
- Lapchak PA. 2004. The neuroactive steroid 3-alpha-ol-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia. *Brain Res* 997:152-8.
- Liu Y, Zhang J. 2000. Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J (Engl)* 113:948-56.
- Luong TN, Carlisle HJ, Southwell A, Patterson PH. 2011. Assessment of motor balance and coordination in mice using the balance beam. *J Vis Exp* (49):2376.
- Lynch MA. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.
- Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A. 1996. NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 14:301-7.
- Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, Brown WD, Hacin-Bey L. 2001. Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1813-24.
- Marx CE, Keefe RS, Buchanan RW, Hamer RM, Kilts JD, Bradford DW, Strauss JL, Naylor JC, Payne VM, Lieberman JA, Savitz AJ, Leimone LA, Dunn L, Porcu P, Morrow AL, Shampine LJ. 2009. Proof-of-concept trial with the neurosteroid pregnenolone targeting cognitive and negative symptoms in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34:1885-903.
- Marx CE, Shampine LJ, Duncan GE, VanDoren MJ, Grobin AC, Massing MW, Madison RD, Bradford DW, Butterfield MI, Lieberman JA, Morrow AL. 2006a. Clozapine markedly elevates pregnenolone in rat hippocampus, cerebral cortex, and serum: candidate mechanism for superior efficacy? *Pharmacol Biochem Behav* 84:598-608.
- Marx CE, Stevens RD, Shampine LJ, Uzunova V, Trost WT, Butterfield MI, Massing MW, Hamer RM, Morrow AL, Lieberman JA. 2006b. Neuroactive steroids are altered in schizophrenia and bipolar disorder: relevance to pathophysiology and therapeutics. *Neuropsychopharmacology* 31:1249-63.

- Marx CE, VanDoren MJ, Duncan GE, Lieberman JA, Morrow AL. 2003. Olanzapine and clozapine increase the GABAergic neuroactive steroid allopregnanolone in rodents. *Neuropsychopharmacology* 28:1-13.
- McEwen BS. 1991. Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends Pharmacol Sci* 12:141-7.
- Minkeviciene R, Banerjee P, Tanila H. 2008. Cognition-enhancing and anxiolytic effects of memantine. *Neuropharmacology* 54:1079-85.
- Moghaddam B, Jackson ME. 2003. Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003:131-7.
- Morris RG. 1989. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. *J Neurosci* 9:3040-57.
- Muir KW, Lees KR. 1995. Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* 26:503-13.
- Nascimento Hackl LP, Carobrez AP. 2007. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. *Neurobiol Learn Mem* 88:177-85.
- Nin MS, Salles FB, Azeredo LA, Frazon AP, Gomez R, Barros HM. 2008. Antidepressant effect and changes of GABAA receptor gamma2 subunit mRNA after hippocampal administration of allopregnanolone in rats. *J Psychopharmacol* 22:477-85.
- Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA. 1991. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254:1515-8.
- Paoletti P. 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33:1351-65.
- Parsons CG. 2001. NMDA receptors as targets for drug action in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429:71-8.
- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. 2006. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141-4.
- Patchev VK, Shoaib M, Holsboer F, Almeida OF. 1994. The neurosteroid tetrahydroprogesterone counteracts corticotropin-releasing hormone-induced anxiety and alters the release and gene expression of corticotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus. *Neuroscience* 62:265-71.
- Paul SM, Purdy RH. 1992. Neuroactive steroids. *FASEB J* 6:2311-22.

- Peskind ER, Potkin SG, Pomara N, Ott BR, Graham SM, Olin JT, McDonald S. 2006. Memantine treatment in mild to moderate Alzheimer disease: a 24-week randomized, controlled trial. *Am J Geriatr Psychiatry* 14:704-15.
- Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ. 1994. Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci* 14:667-96.
- Petrasek T, Benkovicova K, Vales K, Stuchlik A. 2009. Navigační úloha aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA): užitečná metoda pro hodnocení prostorové kognice a chování laboratorních zvířat. *Psychiatrie* 13:195-200.
- Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2005. 20-oxo-5beta-pregnan-3alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci* 25:8439-50.
- Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW. 2008. An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 28:631-7.
- Price RB, Nock MK, Charney DS, Mathew SJ. 2009. Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry* 66:522-6.
- Przegalinski E, Tatarczyńska E, Deren-Wesolek A, Chojnacka-Wojcik E. 1997. Antidepressant-like effects of a partial agonist at strychnine-insensitive glycine receptors and a competitive NMDA receptor antagonist. *Neuropharmacology* 36:31-7.
- Rambousek L, Bubenikova-Valesova V, Kacer P, Syslova K, Kenney J, Holubova K, Najmanova V, Zach P, Svoboda J, Stuchlik A, Chodounska H, Kapras V, Adamusova E, Borovska J, Vyklicky L, Vales K. 2011. Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3alpha5beta-pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology* 61:61-8.
- Reus GZ, Stringari RB, Kirsch TR, Fries GR, Kapczinski F, Roesler R, Quevedo J. 2010. Neurochemical and behavioural effects of acute and chronic memantine administration in rats: Further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? *Brain Res Bull* 81:585-9.
- Romeo E, Strohle A, Spalletta G, di Michele F, Hermann B, Holsboer F, Pasini A, Rupprecht R. 1998. Effects of antidepressant treatment on neuroactive steroids in major depression. *Am J Psychiatry* 155:910-3.

- Sacco RL, DeRosa JT, Haley EC, Jr., Levin B, Ordroneau P, Phillips SJ, Rundek T, Snipes RG, Thompson JL. 2001. Glycine antagonist in neuroprotection for patients with acute stroke: GAIN Americas: a randomized controlled trial. *JAMA* 285:1719-28.
- Sacktor TC. 2012. Memory maintenance by PKMzeta - an evolutionary perspective. *Mol Brain* 5:31.
- Sadri-Vakili G, Johnson DW, Janis GC, Gibbs TT, Pierce RC, Farb DH. 2003. Inhibition of NMDA-induced striatal dopamine release and behavioral activation by the neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5beta-pregnan-20-one hemisuccinate. *J Neurochem* 86:92-101.
- Sedlacek M, Korinek M, Petrovic M, Cais O, Adamusova E, Chodounska H, Vyklicky L, Jr. 2008. Neurosteroid modulation of ionotropic glutamate receptors and excitatory synaptic. *Physiol Res* 57,suppl.3:S49-57.
- Selye H. 1941. Anesthetic effect of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* 46:116-121.
- Silvestre JS, Nadal R, Pallares M, Ferre N. 1997. Acute effects of ketamine in the holeboard, the elevated-plus maze, and the social interaction test in Wistar rats. *Depress Anxiety* 5:29-33.
- Smith DH, Okiyama K, Thomas MJ, McIntosh TK. 1993. Effects of the excitatory amino acid receptor antagonists kynurenate and indole-2-carboxylic acid on behavioral and neurochemical outcome following experimental brain injury. *J Neurosci* 13:5383-92.
- Staay FJ van der, Rutten K, Erb C, Blokland A. 2011. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behav Brain Res* 220:215-229.
- Strohle A, Romeo E, Hermann B, Pasini A, Spalletta G, di Michele F, Holsboer F, Rupprecht R. 1999. Concentrations of 3 alpha-reduced neuroactive steroids and their precursors in plasma of patients with major depression and after clinical recovery. *Biol Psychiatry* 45:274-7.
- Strohle A, Romeo E, Michele F di, Pasini A, Hermann B, Gajewsky G, Holsboer F, Rupprecht R. 2003. Induced panic attacks shift gamma-aminobutyric acid type A receptor modulatory neuroactive steroid composition in patients with panic disorder: preliminary results. *Arch Gen Psychiatry* 60:161-8.
- Strous RD, Maayan R, Lapidus R, Stryjer R, Lustig M, Kotler M, Weizman A. 2003. Dehydroepiandrosterone augmentation in the management of negative, depressive, and anxiety symptoms in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 60:133-41.

- Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. 2008. Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behav Brain Res* 189:139-44.
- Vales K, Rambousek L, Holubova K, Svoboda J, Bubenikova-Valesova V, Chodounska H, Vyklicky L, Stuchlik A. 2012. 3alpha5beta-Pregnanolone glutamate, a use-dependent NMDA antagonist, reversed spatial learning deficit in an animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res* 235:82-8.
- Vales K, Rambousek L, Stuchlik A, Chodounska H, Vyklicky L. 2010. Srovnání vlivu systémové aplikace non-kompetitivních a use-dependentních NMDA antagonistů na lokomoční aktivitu a kognitivní funkce u laboratorního potkana. *Psychiatrie* 14,suppl.2/2010:26-30.
- Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH. 2000. Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 293:747-54.
- Weaver CE, Jr., Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. 1997. Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10450-4.
- Weill-Engerer S, David JP, Szadovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y. 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5138-43.
- Wenke M, Mraz M, Hynie S. 1983. *Farmakologie pro lékaře*. 1. vydání. Avicenum, Praha. 72-75.
- Wesierska M, Dockery C, Fenton AA. 2005. Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J Neurosci* 25:2413-9.
- Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313:1093-7.
- Wu FS, Gibbs TT, Farb DH. 1991. Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 40:333-6.
- Zorumski CF, Paul SM, Izumi Y, Covey DF, Mennerick S. 2013. Neurosteroids, stress and depression: potential therapeutic opportunities. *Neurosci Biobehav Rev* 37:109-22.