

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Anna Revayová

**AUTOMATIZOVANÉ MONITOROVÁNÍ CHOVÁNÍ JAKO NOVÉ  
PARADIGMA VE VÝZKUMU DEPRESIVNÍ CHOROBY**

**AUTOMATED MONITORING OF BEHAVIOUR AS A NEW PARADIGM IN THE RESEARCH  
OF DEPRESSIVE DISORDER**

Diplomová práce

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

Praha, 2016

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 14. 8.2016

Anna Revayová

## **Poděkování:**

Ráda bych především poděkovala svému školiteli, RNDr. Karlu Valešovi, PhD., za trpělivost, veškerou pomoc a cenné rady při vypracování této práce. Zrovna tak bych chtěla poděkovat za veškerou pomoc a cenné rady Mgr. Kristíně Holubové. Mgr. Kristíně Holubové bych dále chtěla poděkovat za provedení operace potkanů. Mé poděkování přísluší také dalším členům z Fyziologického ústavu, a to Michaele Fialové a PharmDr. Martině Škurlové, PhD., za pomoc při experimentech.

## Abstrakt

Rychle nastupující antidepressivní účinek ketaminu udává nový směr ve výzkumu depresivní poruchy, jeho efekt byl hodnocen v této práci. Hlavním zaměřením práce však jsou nové metodologické přístupy ve výzkumu depresivní poruchy. Hlavní důraz je kladen na možnost využití automatizovaného monitorování chování.

Prvním cílem této práce bylo stanovit antidepressivní účinek ketaminu v testu nuceného plavání s použitím software umožňujícího automatizované sledování chování. Druhým cílem bylo stanovit fosforylovaný Mammalian target of rapamycin (mTOR) ve vzorcích z prvního experimentu pomocí metody Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). Posledním cílem této práce bylo zavést a zhodnotit využití fenotypizačních boxů ve fenotypizaci modelu olfaktorické bulbektomie a zhodnotit efekt ketaminu v pozorovaném fenotypu. K fenotypizaci byl použit software umožňující automatizované monitorování chování.

Ketamin neprokázal antidepressivní účinek v testu nuceného plavání, toto pozorování mohlo být ovlivněno kmenem myši a zvolenou dávkou. Citlivost tohoto testu k experimentálnímu protokolu ukazuje na jeho nedostatečnou validitu. Naměřená změna hladiny fosforylovaného mTOR byla v souladu s behaviorálními výsledky. Data získaná z fenotypizačních boxů neukázaly signifikantní rozdíl mezi bulbektomizovanými a kontrolními potkany. Efekt ketaminu také nebyl patrný. Toto pozorování je ovšem patrně důsledkem nízkého počtu experimentálních zvířat. Škála získaných dat ukazuje potenciál tohoto experimentálního přístupu.

**Klíčová slova:** Depresivní porucha, ketamin, olfaktorická bulbektomie, test nuceného plavání, mTOR, Ethovision XT, chování, nové metody

## **Abstract**

The rapid antidepressant effect of ketamine changed the direction of the research of potential antidepressants and its effect was also evaluated in this thesis. However, the main focus of this thesis is a new methodological approach to the research of depressive disorder. The main interest lies with the evaluation of automated monitoring of behaviour in this research.

The first aim of this thesis was to evaluate the antidepressant effect of ketamine in the forced swimming test using software enabling automated monitoring of behaviour. The second aim was to measure the change in phosphorylated Mammalian target of rapamycin (mTOR), using Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). The last, but the most important aim of this thesis was to implement the utilization of Phenotyper boxes in the automated behavioural evaluation of the olfactory bulbectomy model of depressive disorder and also evaluate the effect of ketamine in this model.

Ketamine did not show an antidepressant effect in forced swimming test, however this observation could be influenced by chosen dose and mouse strain. Sensitivity of the test to chosen experimental protocol shows insufficient validity of this test. Observed change in level of phosphorylated mTOR corresponded with the behavioural results. Data collected from Phenotyper boxes did not show a significant difference between bulbectomized and control animals, also the effect of ketamine was not confirmed. This observation could be contributable to low amount of animals. However the range of collected data confirms good potential of this experimental approach in the research of depressive disorder.

**Key words:** Depressive disorder, ketamine, olfactory bulbectomy, forced swimming test, mTOR, Ethovision XT, behaviour, new methods

## Seznam zkratek

4E-BP	<i>4E binding protein</i>
5-HT	<i>5-hydroxytryptamin</i>
ACTH	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
Akt	<i>protein kináza B</i>
AMPA	<i><math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
BAD	<i>bcl-2-associated death promoter</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BMAL1	<i>brain and muscle ARNT-like protein 1</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CLOCK	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
CMS	<i>chronic mild stress</i>
CREB	<i>cAMP response-element binding protein</i>
CRF	<i>corticotropin-releasing factor</i>
CRY	<i>Cryptochrome</i>
DA	<i>dopamin</i>
DA- $\beta$ -Hydroxyl.	<i>DA <math>\beta</math>-hydroxylase</i>
DFP	<i>diisopropylflurofosfát</i>
DSM-5	<i>Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, 5th edition</i>
EAATs	<i>excitatory aminoacid transporters</i>
ECT	<i>electroconvulsive therapy</i>
eEF2K	<i>eukaryotic elongation factor-2 kinase</i>
EEG	<i>elektroencefalogram</i>
eIF	<i>eucaryotic initiation factor</i>
eIF4B	<i>eucaryotic initiation factor 4B</i>
eIF4E	<i>eucaryotic initiation factor 4E</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EOD	<i>early onset depression</i>

ErK	<i>extracellular response kinase</i>
FSL	Flinders senzitivní linie
FST	<i>forced swimming test</i>
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i>
GABA <sub>A</sub> R	GABA <sub>A</sub> receptor
GABA <sub>B</sub> R	GABA <sub>B</sub> receptor
Gal	galanin
GR	glukokortikoidní receptor
GSK-3	<i>glykogen syntase kinase 3</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
HPA	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
ICD-10	<i>International Classification of Diseases, 10th edition</i>
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL-6	interleukin 6
IRS-1	<i>insulin receptor substrate 1</i>
KA	kainát
KO	<i>knock-out</i>
LOD	<i>late onset depression</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
MAOA	<i>monoamine oxidase A</i>
MAOi	<i>monoaminoxidase inhibitor</i>
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MDD	<i>major depressive disorder</i>
MEK	<i>MAP kinase</i>
mGluR	metabotropní glutamátový receptor
MCH	<i>melanin-concentrating hormone</i>
MK801	dizocilpin
MR	mineralokortikoidní receptor
MT	melatonin
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>
NA	noradrenalin

NAcc	<i>Nucleus accumbens</i>
NET	<i>norepinephrine transporter</i>
NF1	neurofibromin 1
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK	neurokinin
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NPY	neuropeptid Y
NT-3	neurotrofin 3
OBX	olfaktorická bulbektomie
P-BAD	<i>phosphorylated BAD</i>
PCP	fencyklidin
PDK1	<i>phosphatidylinositol-dependent kinase 1</i>
PER	<i>Period</i>
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP2	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
PIP3	<i>phosphatidylinositol-3</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
Raf	<i>Ras associated factor</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
REM	<i>rapid eye movement</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
rpm	otáčky za minutu
Rsk	<i>ribosomal S-6 kinase</i>
RTR	receptor
S6K	p70S6 kináza
SAD	<i>seasonal affective disorder</i>
SARI	<i>serotonin antagonist and reuptake inhibitor</i>
SCN	<i>suprachiasmatic nucleus</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SERT	<i>serotonin transporter</i>
SHC	<i>src homology domain containing</i>
SNRI	<i>serotonine and noradrenaline reuptake inhibitor</i>
SOS	<i>son of sevenless</i>



SSRI	<i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>
TCA	<i>tricyclic antidepressant</i>
TRD	<i>treatment resistant depression</i>
TrkB	<i>tyrosine receptor kinase B</i>
TSC1	<i>tuberous sclerosis complex 1</i>
TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
TST	<i>tail suspension test</i>
VMAT	<i>vesicular monoamine transporter</i>
VNS	<i>vagus nerve stimulation</i>

# Obsah

<b>Úvod</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Depresivní porucha a její patofyziologie</b> .....	<b>13</b>
1.1. Typy depresivní poruchy .....	15
1.2. Role dědičnosti v depresivní poruše .....	19
1.3. Hypotéza deficiencie monoaminů .....	20
1.4. Role stresu, kortizolu a neurodegenerace .....	21
1.5. Neurotrofické faktory a depresivní porucha .....	22
1.6. Synaptická plasticita v depresivní poruše .....	25
1.7. Glutamátergní transmise a její ovlivnění v depresivní poruše .....	27
1.8. GABAergní transmise a její ovlivnění v depresivní poruše .....	30
1.9. Patofyziologie „biologických hodin“ v depresivní poruše .....	31
<b>2. Léčba depresivní poruchy a její limitace</b> .....	<b>33</b>
2.1. Tricyklická antidepresiva .....	33
2.2. Inhibitory monoaminoxidázy .....	33
2.3. Inhibitory zpětného vychytávání monoaminů .....	34
2.4. Atypická antidepresiva a nefarmakologická léčba .....	35
2.5. Nové směry ve vývoji antidepresivní léčby .....	37
2.5.1. Glutamát, GABA a BDNF .....	38
2.5.2. HPA osa a neuropeptidy .....	39
2.5.3. Další vybrané látky .....	40
<b>3. Metody a modely používané v experimentálním výzkumu</b> .....	<b>42</b>
3.1. Animální modely depresivní poruchy .....	42
3.1.1. Validita animálních modelů depresivní poruchy .....	42
3.1.2. Genetické modely .....	44
3.1.3. Modely založené na stresu .....	46
3.1.3.1. Sociální porážka .....	47
3.1.3.2. Naučená bezmocnost .....	47
3.1.3.3. Chronický mírný stres .....	48
3.1.3.4. Maternální deprivace .....	49
3.1.4. Modely získané farmakologickou či chirurgickou manipulací .....	50
3.1.4.1. Olfaktorická bulbektomie .....	50
3.1.4.2. Aplikace reserpinu .....	51

3.2.	Testy používané ve vývoji antidepresiv .....	51
3.2.1.	Test nuceného plavání .....	52
3.2.2.	Test zavěšeného ocasu .....	53
3.2.3.	Intrakraniální autostimulace a preference cukerného roztoku.....	54
3.2.4.	Test otevřeného pole.....	54
3.3.	Limitace metod využívaných v experimentálním výzkumu .....	55
<b>4.</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>59</b>
5.1.	Použitá zvířata.....	59
5.2.	Použité přístroje a software.....	59
5.3.	Použité chemikálie a léčiva .....	60
5.4.	Metodické postupy .....	61
5.4.1.	Experiment 1.....	61
5.4.2.	Experiment 2.....	62
5.4.3.	Experiment 3.....	64
5.5.	Statistické vyhodnocení .....	67
<b>6.</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>69</b>
6.1.	Experiment 1.....	69
6.2.	Experiment 2.....	72
6.3.	Experiment 3.....	73
<b>7.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>90</b>
<b>8.</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>103</b>

## Úvod

Depresivní porucha je, ve většině případů, chronické psychiatrické onemocnění, řadící se mezi poruchy afektu. Charakterizována je ztrátou potěšení a motivace, trvale zhoršenou náladou, poruchou spánkového a potravního režimu, ztrátou sexuálního libida, psychomotorickou agitací či retardací. Mezi nejzávažnější projevy patří myšlenky na smrt či pokus o sebevraždu (American Psychiatric Association, 2013). Depresivní porucha má závažný dopad na vzdělání, sociální, pracovní vztahy i finanční zázemí nemocného. Prevalence tohoto onemocnění se liší mezi jednotlivými zeměmi, obecně je však vysoká (Kessler & Bromet, 2013).

Valná část momentálně dostupné antidepresivní terapie je založená na více než 50 let staré teorii deficiencie monoaminů v depresivní poruše (Schildkraut, 1965). Dostupná antidepresivní léčba má významné limitace. 50% pacientů nereaguje na léčbu první volby. I v případě, že se účinek dostaví už u prvního zvoleného léku, léčebný efekt se dostavuje v řádu týdnů (Artigas, 2015), což je kritické období pro nemocného pacienta, neboť nemocný je v tomto mezidobí náchylnější k pokusu o sebevraždu. To, že se antidepresivní účinek může dostavit i ve velmi krátkém časovém měříku, ukázaly práce o antidepresivním účinku ketaminu. Tento se dostavil v řádu hodin již po jedné aplikaci (Berman et al., 2000). Tyto výsledky sice způsobily pokrok v chápání depresivní poruchy a rozvoji nových směrů vývoje antidepresivní léčby, v momentální chvíli bohužel však stále není dostupná uspokojivá léčba.

Pro to, aby byl pokrok ve vývoji nových antidepresivů vůbec možný, je důležité mít validní modely depresivní poruchy a také testy potenciálního antidepresivního účinku (Willner & Mitchell, 2002). Vzhledem k charakteru tohoto onemocnění i neúplnému pochopení etiologie depresivní poruchy je stále přítomná potřeba rozvoje lepších a validnějších modelů depresivní poruchy a spolehlivějších testů antidepresivního účinku, bez ohledu na mechanismus působení (Czéh et al., 2015). Ketamin, jakožto zástupce antidepresiv s jiným, než monoaminergním mechanismem účinku, v kombinaci s využitím nových technologií k získávání i vyhodnocování behaviorálních i biochemických dat, představují nové trendy, udávající další směr ve výzkumu depresivní poruchy. Z tohoto důvodu je tato práce zaměřená na nové metodologické postupy, které by umožňovaly lepší pochopení etiologie tohoto onemocnění a vývoj rychleji působících a efektivních antidepresiv.

## 1. Depresivní porucha a její patofyziologie

Depresivní porucha je závažné psychiatrické onemocnění, řadící se mezi afektivní poruchy. Poruchy afektu jsou charakterizovány narušenou emoční složkou chování jedince. V případě depresivní poruchy je touto emocí smutek, který je přítomen buď bez patrné příčiny, případně je této příčině disproporcionální. Druhým základním projevem depresivní poruchy je ztráta zájmu o dění a koníčky a ztráta potěšení z běžných denních činností, tzv. anhedonie (Paykel, 2008).

Velká depresivní porucha (*major depressive disorder*, MDD) je dle Diagnostického a Statistického manuálu Mentálních Poruch (*Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders, 5th edition*, DSM-5) charakterizována přítomností alespoň pěti dále popsanými symptomy, přičemž tyto symptomy jsou patrné po dobu delší než dva týdny. Prvním symptomem je zhoršená nálada, popřípadě pocit prázdnoty, tyto pocity přetrvávají většinu dne. Dostavuje se také ztráta zájmu o běžné činnosti, včetně činností, které dříve nemocného těšily a zajímaly. Nemocný je unavený, veškeré činnosti ho neúměrně vyčerpávají. Přítomná může být nespavost, popřípadě nadměrná spavost. Dále je patrná změna (zvýšení či snížení) chuti k jídlu, přičemž tyto symptomy jsou doprovázeny patřičnou změnou váhy. Dále je patrná ztráta sexuálního apetitu. Přítomná může být také psychomotorická retardace nebo agitace. Dalšími možnými projevy onemocnění jsou pocity méněcennosti či neopodstatněné pocity viny, snížená schopnost koncentrace a zhoršená schopnost rozhodování. Velmi závažným projevem onemocnění jsou myšlenky na smrt, touha zemřít, vedoucí k pokusům o sebevraždu, případně k dokonání sebevraždy (American Psychiatric Association, 2013).

Tyto symptomy se v různé míře a závažnosti projevují v různých formách depresivní poruchy, nejen u velké depresivní poruchy. Přítomné jsou také u depresivní epizody. Depresivní epizoda může navazovat na obtížnou a stresovou situaci v životě jedince, s vyšší pravděpodobností se ale rozvine velká depresivní porucha, neboť tato nemoc má především chronický charakter. Mnohdy až periodicky se v životě jedince střídají období remise a relapsu onemocnění, jedná se tak o celoživotní onemocnění, nepříznivě ovlivňující veškeré aspekty života nemocného (Paykel, 2008).

Prevalence onemocnění se liší mezi jednotlivými populacemi, komunitami i státy. Toto může být přičítáno heterogenitě projevů depresivní poruchy, ale i různým sociálním a kulturním rozdílům v rámci společnosti. V některých státech je prevalence vysoká, odhaduje se, že až každý pátý jedinec bude ve svém životě postižen depresivní epizodou. Například ve Spojených státech je prevalence blížící se 20% pro velkou depresivní poruchu, s dvakrát vyšší rizikovostí u žen a průměrným věkem nástupu onemocnění mezi 20. a 30. rokem života jedince (Kessler & Bromet, 2013). Tato míra prevalence je znepokojivá, pokud přihlídneme ke skutečnostem, že depresivní porucha má neblahý dopad na dosažené vzdělání nemocného, stabilitu vztahů a manželství, zaměstnanost a výkon v zaměstnání a s nimi spojenou stabilitu finančního zázemí (Kessler & Bromet, 2013). Vzhledem k tomu, že se jedná o onemocnění mentální, diagnóza pacienta stigmatizuje a nemocný se tak setkává s nepochopením diagnózy jak bezprostředním okolím, tak společností obecně (Schuklenk & Vathorst, 2015).

Podstata depresivní poruchy bohužel stále není objasněna. Depresivní porucha je do dnešního dne předmětem diskuzí a dohadů, heterogenita symptomů a komplexita poruch chování všeobecně vede k tomu, že není do dnešního dne jasně stanovena nejen definice onemocnění a kategorizace podtypů depresivní poruchy, ale ani etiologie depresivní poruchy. V etiologii depresivní poruchy byly implikovány různé vlivy – dědičnost, prostředí, jsou pozorovány neuroanatomické i imunologické změny. Patrné jsou také změny neurotransmiterových a jiných systémů, jako je například systém monoaminů, excitačních i inhibičních aminokyselin, neurotrofních faktorů, faktorů neuroplasticity, ale i tzv. biologických hodin.

Zapojení jednotlivých systémů a signálních drah v depresivní poruše bude, s ohledem na zaměření a rozsah této práce, stručně popsáno v následujících kapitolách. Hlavním cílem této kapitoly bude popsat patofyziologii daného systému, jíž je přičítán rozvoj depresivní poruchy a aplikace těchto poznatků při léčbě tohoto onemocnění. Vzhledem k funkčnímu propojení a vzájemné komunikaci jednotlivých systémů a signálních drah stále neexistuje jednotná hypotéza vzniku a rozvoje depresivního onemocnění. Soudě skutečnost, že je depresivní porucha onemocnění heterogenní, s různými příznaky v individuálních případech, i s různou mírou odpovědi

na aplikovanou léčbu, je možné, že se jedná o onemocnění různého původu s podobnou výslednou symptomatologií (Hasler, 2010).

### **1.1. Typy depresivní poruchy**

Rozdělení depresivní poruchy na jednotlivé podtypy je záležitostí problematickou a v momentální chvíli stále ještě nejednotnou. Pokud se podíváme do dvou základních diagnostických manuálů, zjistíme, že v každém jsou podtypy depresivní poruchy specifikovány rozdílně.

V Mezinárodní Klasifikaci Nemocí, 10. Vydání, od Světové zdravotnické organizace (*International Classification of Diseases, 10th edition, ICD-10*) je depresivní porucha řazena mezi afektivní poruchy společně s poruchou bipolární. Dělena je především podle chronicity onemocnění a závažnosti momentální epizody. Depresivní porucha je tak dělena na depresivní epizody s různými stupni závažnosti, přičemž nejvyšší stupeň závažnosti je ještě dále rozdělen podle prezenze či absence psychotických příznaků. Po depresivní epizodě pak ICD-10 rozeznává recidivující depresivní chorobu, která je dále dělena dle stupně závažnosti podobně, jako depresivní epizoda, a depresivní poruchu atypickou a dále nespecifikovanou. Vyjma toho se k depresivní poruše řadí další podtypy, jako je dysthymie a cyklothymie (World Health Organization, 1992).

V DSM-5 Americké Psychiatrické Společnosti připadá depresivní poruše vlastní kategorie. DSM-5 rozděluje depresivní poruchu do kvalitativně odlišných kategorií. Prvním podtypem je disruptivní porucha regulace nálady, přičemž tato diagnóza je určena především dětem a je charakterizována výbuchy vzteku a obecně vyšší iritabilitou. Dalším podtypem je již výše zmíněná MDD, o níž pojednává většina publikovaných prací a která může být dále členěna dle závažnosti symptomů, případně dle přítomností doprovodných prvků, jako je například anxieta, psychotické příznaky či katatonie. I DSM-5 rozlišuje jako podtyp dysthymii jako přetrvávající poruchu nálady, dále pak předmenstruační dysforickou poruchu, depresivní poruchu vyvolanou medikací či jiným onemocněním a další specifikovanou a nespecifikovanou depresivní poruchu (American Psychiatric Association, 2013).

Toto dělení depresivní poruchy je nedostatečné pro pokrytí škály symptomů, které se mohou u pacienta trpícího depresivní poruchou vyskytnout. Příkladem necht'

je charakteristika MDD dle DSM-5. Pět z dříve uvedených symptomů by mělo být přítomno po dobu alespoň dvou týdnů, přičemž je přítomen jeden z klíčových symptomů, anhedonie nebo depresivní nálada. Další symptomy byly již popsány výše (American Psychiatric Association, 2013). Vyjma skutečnosti, že může být přítomno pět z devíti symptomů, které se mohou různě kombinovat, jedná se o symptomy, které mají často protichůdný charakter, např. výrazný úbytek či přírůstek na váze. Ve výsledku tak v klinické praxi dochází k situaci, kdy pacienti se stejnou diagnózou mohou mít velmi rozdílný klinický obraz. Z tohoto důvodu je na místě pokračující snaha depresivní poruchu, především pak MDD, dále rozdělit na další podtypy.

Dysthymie je podtyp depresivní poruchy, který je vyčleněn jak v DSM-5, tak v ICD-10. Jedná se o stav charakterizovaný přetrvávajícími depresivními symptomy, které jsou ovšem podprahového charakteru pro diagnózu MDD. Navzdory tomu, že symptomy dysthymie nedosahují takové úrovně, jako v případě MDD, onemocnění má nepříjemný dopad na život jedince. Symptomy jsou přítomny dlouhodobě, minimálně dva roky (Ishizaki & Mimura, 2011). Dysthymie má dřívější věk nástupu a mírnější symptomatologii. U nemocného ovšem často dochází v pozdějším stádiu k výskytu epizod MDD (Yang & Dunner, 2001).

Kromě členění depresivní poruchy dle DSM-5 a ICD-10, popřípadě základnímu členění na MDD a dysthymii, je opakovaná snaha dále rozčlenit především MDD na další podtypy, například dle přítomnosti jistých symptomů, doby nástupu onemocnění, průběhu onemocnění a jeho závažnosti (Rush, 2007), popřípadě dle příčiny rozvoje onemocnění (Harald & Gordon, 2012).

Při dělení MDD, založeném na přítomných symptomech, lze rozdělit MDD na psychotickou, úzkostnou, atypickou MDD a melancholii. Melancholie je často označována jako autonomní či endogenní MDD. Vyznačuje se především nereaktivní náladou a přetrvávající anhedonií, ale i rozrušením kognitivních a vegetativních funkcí a narušením psychomotoriky. Osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) je hyperaktivní a *rapid eye movement* (REM) spánek je redukován (Parker et al., 2010). Melancholie patrně dobře reaguje na elektrokonvulzivní terapii (*electroconvulsive therapy*, ECT) a na léčbu tricyklickými antidepresivy (*tricyclic antidepressant*, TCA) (Taylor & Fink, 2008). Úzkostná depresivní porucha se vyznačuje přítomností úzkostných stavů, nezdá se ovšem,



že by tento podtyp MDD reagoval lépe na specifickou antidepresivní léčbu (Russell et al., 2001). U atypické MDD je přítomná reaktivní nálada, tzv. olověná paralýza, vyšší citlivost k interpersonálním změnám, zvýšená spavost a apetit (Thase, 2007). U pacientů s atypickou MDD je patrně hypoaktivní HPA osa (Posternak, 2003) a nemocní lépe reagují na léčbu inhibitory monoaminoxidázy (*monoaminoxidase inhibitor*, MAOI) (Henkel et al., 2006). Posledním podtypem je psychotická MDD, charakterizována především přítomností psychotických příznaků, jako jsou bludy a halucinace, ale i vyšším stupněm rozrušení psychomotoriky, neúměrnými pocity viny a bezcennosti. Z neurobiologických změn se zdá, že je hyperaktivní HPA osa, kratší latence nástupu REM spánku a nižší hladina dopamin beta hydroxylázy v séru (enzym přeměňující dopamin na noradrenalin) v porovnání s depresivními pacienty bez psychotických příznaků (Lykouras & Gournellis, 2009). Léčebným zásahem bývá nejčastěji antidepresivní léčba kombinovaná s antipsychotickou (Wijkstra et al., 2013).

Z depresivní poruchy členěné na základě vzniku a rozvoje onemocnění lze jmenovat MDD reaktivní, rozvíjející se v reakci na nepříjemnou životní situaci, ovšem nejsou patrné charakteristické prvky tohoto podtypu, zrovna tak se nezdá, že by reagoval lépe na určitý typ léčby (Harald & Gordon, 2012). Trauma prožité v raném věku, jako například sexuální zneužití, může, především v kombinaci s dalšími stresovými situacemi v životě jedince, vést k rozvoji depresivní poruchy. V případě takovéto MDD je patrná senzitivizace HPA osy a také redukovaná velikost hipokampu. Vyjma toho patrně MDD rozvinutá na podkladě traumatu v raném věku reaguje dobře na psychoterapii, případně na kombinaci psychoterapie s antidepresivou (Heim et al., 2008).

Dále můžeme hovořit o reprodukčním podtypu MDD, přítomném u žen a vázaném na aktivitu reprodukčních orgánů (Soares & Zitek, 2008). Tyto stavy jsou spojovány s dramatickými výkyvy ženských hormonů (Brummelte & Galea, 2010), především pak estradiolu a progesteronu, v období předmenstruačním, poporodním (*postpartum*) a perimenopauzálním, u žen senzitivních k těmto výkyvům, přičemž chronologické propojení těchto stavů s hormonálními změnami bylo navrženo jako kritérium pro diagnózu reprodukční MDD (Payne et al., 2009). Výskyt depresivní epizody spjaté s reprodukční událostí zvyšuje pravděpodobnost výskytu depresivní epizody

u reprodukční události následující (Payne et al., 2009). Reprodukční MDD není spjatá s charakteristickou symptomatologií. Změny jsou sledovány v serotonergním systému i v biologických rytmech, především melatoninu a kortizolu (Parry et al., 2006). Pro reprodukční MDD byla navržena jako vhodná terapie kombinace antidepresiv a hormonální léčby, výsledky této terapie jsou ovšem neprůkazné (Howland, 2010).

S přihlédnutím na období života, v němž dochází k rozvoji MDD, bývá rozeznávána MDD s časným nástupem (*early onset depression*, EOD) a pozdním nástupem (*late onset depression*, LOD) v životě jedince. EOD se rozvíjí ještě před 18. rokem života pacienta (Rush, 2007), zatímco LOD se často dostavuje až mezi 45. a 65. rokem života (Herrmann et al., 2007). Tyto podtypy MDD nemají rozdílný klinický obraz (Brodaty et al., 2001), jsou však patrné odlišné neuroanatomické změny (Herrmann et al., 2008). Doposud nebyla určena léčba specificky ulevující pacientům s EOD či LOD (Rush, 2007).

Specifický nástup je také patrný u sezónní afektivní poruchy (*seasonal affective disorder*, SAD), kdy je rozvoj depresivní epizody vázán na specifickou část roku a v jiné části roku dochází k remisi onemocnění (Howland, 2009). Hyperfágie, hypersomie, snadná iritabilita a ztráta energie jsou více prominentní u SAD (Howland, 2009). Tyto symptomy se také charakteristicky vyskytují u atypické MDD, vedou se tedy diskutovat, zda je SAD skutečně podtyp MDD, nebo se pouze jedná o sezónní fluktuaci symptomů u pacientů s atypickou MDD (Hansen et al., 2008). SAD se běžně dává do spojitosti s rozrušenými cirkadiánními rytmy, výsledky v tomto směru však nejsou jednoznačné (Rohan et al., 2009). SAD dobře reaguje na světelnou terapii (Golden et al., 2005), ta ovšem funguje i u jiných podtypů MDD.

Často je také vyčleňováno, pokud MDD vzniká na podkladě onemocnění či specifické medikace (American Psychiatric Association, 2013). Mnohá onemocnění mohou vést k rozvoji komorbidní MDD, jako například Parkinsonova choroba (Mayeux et al., 1981), mrtvice (Hackett et al., 2008), revmatická artritida (Dickens et al., 2002) či roztroušená skleróza (Pucak et al., 2007). Medikace, které mohou vést k rozvoji depresivních symptomů, jsou například kortikosteroidy, interferon- $\alpha$ , interleukin-2 či agonisté gonadotropin-vyvolávajícího hormonu (Patten & Barbui, 2004), symptomatologie je však odlišná od běžné MDD. Obecně

Ize říci, že symptomy této MDD se liší dle doprovodné nemoci či léčby, a zrovna tak se liší možný farmakologický zásah.

Určování podtypů depresivní poruchy je zajisté výzvou, neboť zmíněné podtypy depresivní poruchy se mohou do jisté míry překrývat. Ovšem další členění MDD je na místě a mělo by být dále rozvíjeno a optimalizováno, a to ze dvou důvodů. V první řadě, nedostatečné členění MDD vede ke ztížené interpretaci získaných experimentálních dat snažících se odhalit etiologii tohoto onemocnění. Pozorované trendy mívají opačný charakter, což se může do určité míry přičítat různým experimentálním protokolům, ale může se to také přičítat nedostatečné typizaci MDD. Podrobnější členění MDD by mohlo vést k lepšímu pochopení průběhu onemocnění u daného pacienta, lepšímu určení prognózy a vývoje a předepsání specifické léčby pro daný podtyp onemocnění.

## **1.2. Role dědičnosti v depresivní poruše**

Vliv dědičnosti je v depresivní poruše ustálen, přičemž je odhadováno, že je z 30-40% zodpovědný za rozvoj onemocnění (Sullivan et al., 2000). Zbývajících 60-70% je možné přičítat vlivům prostředí. Velmi často se hovoří o interakci genů a prostředí, kdy k rozvoji onemocnění dojde v případě genetické náchylnosti a přítomnosti stresové situace, například sexuálnímu zneužívání, či jiné traumatizující události v životě pacienta (Sullivan et al., 2000). Hledání jednotlivých kandidátských genů zodpovědných za rozvoj tohoto onemocnění ovšem není příliš úspěšný, přičemž toto není překvapením u psychiatrických onemocnění, u nichž se předpokládá polygenní vliv a interakce genomu a prostředí. Přesto je nalezeno několik genů, které jsou dávány do souvislosti s rozvojem depresivní poruchy (Kupfer et al., 2012).

Příkladem může být funkční polymorfismus oblasti promoteru serotoninového transportéru, kdy krátká alela této oblasti je dávána do souvislosti s depresivními symptomy (Caspi et al., 2003), ačkoliv toto spojení nebylo spolehlivě prokázáno (Risch et al., 2009). Příklady dalších genů, jejichž různé varianty korelují s náchylností k rozvoji depresivní poruchy, jsou ty pro receptor glukokortikoidů (Van Rossum et al., 2006) či monoaminoxidázu A (Fan et al., 2010). Informaci o dalších genech, které by mohly hrát úlohu v depresivní poruše, lze získávat studiem genetických *knock-out* animálních modelů, o nichž bude pojednáno dále.

Jedním z účelů hledání kandidátských genů v depresivní poruše je možnost předvídat účinek antidepresivní léčby v závislosti na variantě daného genu přítomného u pacienta (Kato & Serretti, 2010). Příkladem může být již výše zmíněný polymorfismus glukokortikoidního receptoru, kdy konkrétní varianta genu, ER22/23EK, je spojována s rychlejší odpovědí na antidepresivní léčbu (Van Rossum et al., 2006). Jak již ale bylo zmíněno výše, polygenní vliv v depresivní poruše komplikuje možnou terapeutickou indikaci.

### 1.3. Hypotéza deficience monoaminů

Tato hypotéza byla první široce uznávaná hypotéza vzniku depresivní poruchy, přičemž monoaminy spojované s tímto onemocněním jsou noradrenalin (NA), dopamin (DA) a serotonin (5-hydroxytryptamin, 5-HT). Tyto molekuly jsou si v jistých ohledech podobné – NA a DA jsou katecholaminy mající stejný prekurzor, tyrozin. 5-HT je syntetizován z tryptofanu. NA, DA i 5-HT jsou čerpány do váčků pomocí vezikulárního přenašeče monoaminů (*vesicular monoamine transporter*, VMAT) a aktivita monoaminů v synapsi je ukončena aktivním zpětným vychytáváním presynaptickým neuronem nebo gliemi za pomoci Na/Cl závislých transportérů (Elhwuegi, 2004). Monoaminy mají své specifické receptory – NA odpověď je zprostředkována receptory spřaženými s G-proteiny (inhibičními i stimulačními), zrovna tak odpověď na 5-HT je spojena s G-proteiny, vyjma 5-HT<sub>3</sub> receptoru spřaženého s iontovým kanálem. DA aktivita je opět zprostředkována G-proteiny a může vést ke zvýšení i snížení adenylycyklázové aktivity. Projekce monoaminergních neuronů pak nalezneme v rozsáhlých oblastech mozku, například v retikulární formaci (NA), hipokampu (NA), limbickém systému (5-HT), kortikálních oblastí (5-HT, NA i DA) či *Nucleus accumbens* (NAcc) v případě DA (Elhwuegi, 2004).

Hypotéza deficience monoaminů byla postulována na pozorovaném antidepresivním efektu látek zvyšujících dostupnost monoaminů na synapsi, jako byl iproniazid (MAOi) či imipramin (TCA), který ovlivňuje zpětné vychytávání NA. Také reserpin, způsobující depleci monoaminů, je schopný vyvolat depresivní příznaky (Schildkraut, 1965). Valná většina dnes dostupných antidepresiv je založena na principu zvyšování dostupnosti monoaminů na synapsi, jak bude podrobněji popsáno v následující kapitole.

Vztah monoaminů a depresivní poruchy ovšem není tak jednoduchý. Jsou látky, které zvyšují dostupnost NA a DA na synapsi, ale antidepresivním účinkem neoplyvají – například kokain či amfetamin. Dále deplece tryptofanu, prekursoru serotoninu, vede k manifestaci symptomů u pacientů trpících depresivní poruchou, depresivní symptomy se ovšem nedostavují u zdravých kontrol (Neumeister et al., 2004). Mimoto antidepresiva zvyšují dostupnost monoaminů na synapsi již v rámci několika hodin, antidepresivní účinek se ale dostavuje až v řádu týdnů (Perez-Caballero et al., 2014). Tento pozorovaný efekt je možné vysvětlit tím, že akutní zvýšení hladiny monoaminů je pouze prvotním krokem v účinku antidepresivní léčby. Zvýšená dostupnost monoaminů by mohla být spouštěčem kaskády procesů, zahrnujících desenzitizaci a dlouhodobou adaptaci auto i heteroreceptorů, přičemž až tento dlouhodobý proces ústí ve výsledný pozorovaný efekt (Piñeyro & Blier, 1996).

#### **1.4. Role stresu, kortizolu a neurodegenerace**

Stres působí aktivaci HPA osy, která dále aktivuje různé procesy sloužící k vyrovnání se s daným stresem. Kortikoliberin (*corticotropin-releasing factor*, CRF) vyloučený v reakci na stres způsobí výlev adrenokortikotropního hormonu (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH) z hypofýzy, ACTH pak dále stimuluje výlev kortikosteroidů z nadledvin (Gillespie & Nemeroff, 2005). Účinek kortikosteroidů, dále členěných na glukokortikoidy a mineralokortikoidy, na cílové orgány je zprostředkován mineralokortikoidními receptory (MR) a glukokortikoidními receptory (GR). GR jsou přítomny v hipokampu, amygdale či prefrontálním kortexu. Hipokampus, hypotalamus a hypofýza jsou pak oblastmi, kde dochází k regulaci výlevu glukokortikoidů pomocí negativní zpětné vazby (Swaab et al., 2005).

Někteří depresivní pacienti prokazují hyperaktivní HPA osu v dexametasonovém testu. V tomto testu je pacientovi podán dexametason – syntetický glukokortikoid, přičemž přirozenou reakcí na tuto aplikaci je snížení aktivity HPA osy pomocí zpětnovazebné smyčky. Hyperaktivita HPA osy může být upravena antidepresivní léčbou (Nemeroff, 1996). Bylo také pozorováno zvětšení adrenálních žláz, vyšší hladiny ACTH i zvětšená hypofýza u depresivních pacientů (Nemeroff, 1996). Hladina CRH a úroveň exprese CRH receptorů byla změněna i *post-mortem* u obětí sebevraždy, přičemž hladina CRH receptorů typu 1 byla snižena a CRH hladina byla zvýšená ve frontopólním kortexu a dorzomediálním prefrontálním kortexu

(Merali et al., 2004). Rozrušení HPA osy je patrné především u těch pacientů, kteří byli v raném věku vystaveni traumatu (Heim et al., 2008) a *post-mortem* studie ukazují na změnu v regulaci glukokortikoidních receptorů, tyto jsou patrně sníženy (McGowan et al., 2009). V souvislosti s pozorovanými změnami v HPA ose byly testovány některé látky s antagonistickým účinkem na CRF receptory, konkrétně látka s označením C-154,526. Ačkoliv byl ukázán antidepresivní účinek u animálních modelů (Mansbach et al., 1997), výsledky byly heterogenní a lišily se mezi různými laboratořemi (Seymour et al., 2003), momentálně tedy žádná medikace působící skrze ovlivnění HPA osy není dostupná.

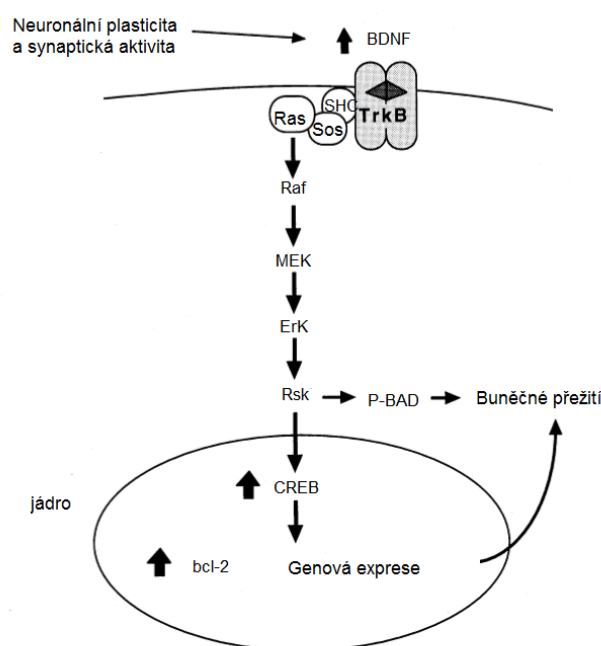
Možným vysvětlením spojitosti HPA osy a depresivní poruchy je atrofující vliv glukokortikoidů (Haynes et al., 2001). Hipokampus obsahuje velké množství MR a GR a je nepřímo součástí negativní zpětné vazby výlevu glukokortikoidů. U depresivních pacientů dochází k redukci velikosti hipokampu (MacQueen et al., 2003; Yvette et al., 2003). Je spekulováno, že vyšší výlev glukokortikoidů vede k buněčné smrti v oblasti hipokampu a tím k narušení zpětnovazebné smyčky glukokortikoidů, vyššímu výlevu glukokortikoidů a zhoršení procesu poškození hipokampu (MacQueen et al., 2003). Je ovšem také možné, že jiné mechanismy vedou k redukci velikosti hipokampu a tím k narušení negativní zpětné vazby HPA osy a její hyperaktivaci. Nutné je také upozornit, že ne všichni nemocní mají rozrušenou aktivitu HPA osy (Brunner et al., 2002). Je také mimo jiné spekulováno, že v hipokampu nedochází k redukci počtu buněk a zmenšení velikosti struktury je způsobeno ztrátou vody a elektrolytů (Swaab et al., 2005), případně může být velikost hipokampu způsobena jinými mechanismy, například vlivem neurotrofických faktorů, jak bude pojednáno dále (Duman & Monteggia, 2006).

## **1.5. Neurotrofické faktory a depresivní porucha**

Neurotrofické faktory jsou rozhodující pro vývoj a přežití neuronů, bez jejich přítomnosti podstupují neurony programovanou buněčnou smrt, apoptózu. Vysvětlení mechanismu tohoto jevu jsou různá, například závislost na neurosynaptickém spojení neuronů s cílovou buňkou či dalšími neurony (Goldberg & Barres, 2000). Vyšší počet synaptických spojení a vyšší aktivita může vést k vyšší expresi neurotrofických faktorů, přičemž exprese závislá na buněčné aktivitě je k vidění i v jiných systémech. Vyšší

míra synaptických spojení může také vést k vyššímu zásobování neurotrofickými faktory presynaptickou buňkou (Goldberg & Barres, 2000).

Neurotrofický faktor, který bych především zmínila v této kapitole, je *brain derived neurotrophic factor* (BDNF). BDNF pravděpodobně zajišťuje přežití neuronů inhibicí programované buněčné smrti, ne skrze poskytování trofické podpory, jak bylo původně předpokládáno (Duman et al., 2000). Signální dráha spojená s aktivací BDNF receptoru a zapojení v neuronální plasticitě a synaptické aktivitě je předmětem obrázku 1.



Obr. 1 – Model kaskády regulace buněčného přežití, závislého na BDNF. Exprese těchto faktorů může být indukována synaptickou aktivitou, vliv neurotrofických faktorů je zprostředkován aktivací kaskády mitogen-activated protein (MAP) kinázy. Aktivace receptoru tyrosine receptor kinase B (TrkB) vede k aktivaci kaskády MAP kinázy skrze mnohé mezikroky, zahrnující mimo jiné aktivaci proteinu rat sarcoma (Ras), což dále vede k aktivaci serin/threonin kináz. Tyto zahrnují Ras associated factor (Raf), MAP kinase (MEK) či extracellllar response kinase (ErK). Jedním ze substrátů je ribosomal S-6 kinase (Rsk), která ovlivňuje buněčné přežití (alespoň) dvěma způsoby. Rsk fosforyluje cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response-element binding proteinu (CREB), a tím zvyšuje expresi anti-apoptického faktoru B-cell

*lymphoma 2 (bcl-2), popřípadě fosforyluje a tím inaktivuje proapoptický faktor Bcl-2-associated death promoter (BAD). SOS, son of sevenless; P-BAD, phosphorylated BAD; SHC, src homology domain containing (Upraveno dle Duman et al., 2000).*

Součástí aktivace této signální dráhy je mimo jiné zvýšení exprese CREB, což je transkripční faktor mnohých genů, například *bcl-2* důležitého v regulaci buněčné smrti. Bylo pozorováno snížení hladiny CREB ve srovnání se zdravou kontrolou, přičemž antidepressivní léčba nejprve hladinu CREB zvyšuje a posléze upravuje na stejnou úroveň jako u zdravé kontroly (Young et al., 1998). BDNF je také v depresivní poruše ovlivněno – hladina BDNF je u depresivních pacientů snižena (Sen et al., 2008) a léčba tento deficit normalizuje (Shimizu et al., 2003). Podobný trend je pozorován také u jiného trofického faktoru, neurotrofinu 3 (NT-3). Deficit patrný v depresivní poruše je opět normalizován antidepressivní léčbou (Karege et al., 2005). Preklinický výzkum také poukazuje na potenciální antidepressivní účinek BDNF v depresivní poruše: přímá aplikace BDNF do gyru dentata má antidepressivní účinek v různých animálních modelech (Shirayama et al., 2015; Shirayama, et al., 2002), nutno ovšem dodat, že BDNF genetický *knock-out* se nemanifestuje depresivní chorobě podobným chováním, tento myší model se vyznačuje spíše agresivním chováním, excesivním příjmem potravy a příbytkem na váze (Lyons et al., 1999).

Deficit BDNF a neurotrofických faktorů v depresivní poruše bývá spojován s redukcí počtu neuronů a velikosti hipokampu pozorovaných u této nemoci (Rajkowska et al., 1999; Sahay & Hen, 2007; Sheline et al., 1996; Sheline et al., 2003). Tuto hypotézu podporuje také neurogeneze sledovaná především v gyru dentatu při aplikaci antidepressivní léčby s různým mechanismem účinku (Malberg et al., 2000). Prodleva mezi aplikací antidepressivní léčby a nástupem účinku této léčby také podporuje důležitost neurotrofie pro pozorovaný efekt.

Nutno ovšem dodat, že změny hladin neurotrofinů nejsou specifické pouze pro depresivní pacienty, ale i pro pacienty se schizofrenií, anxiétou, Alzheimerovou chorobou či alkoholovou závislostí (Karege et al., 2005). Změny hladiny BDNF mohou být příčinou, ale také následkem jiných patologických změn u depresivní poruchy (Shimizu et al., 2003). Důležitým faktorem je také místo změny BDNF, neboť

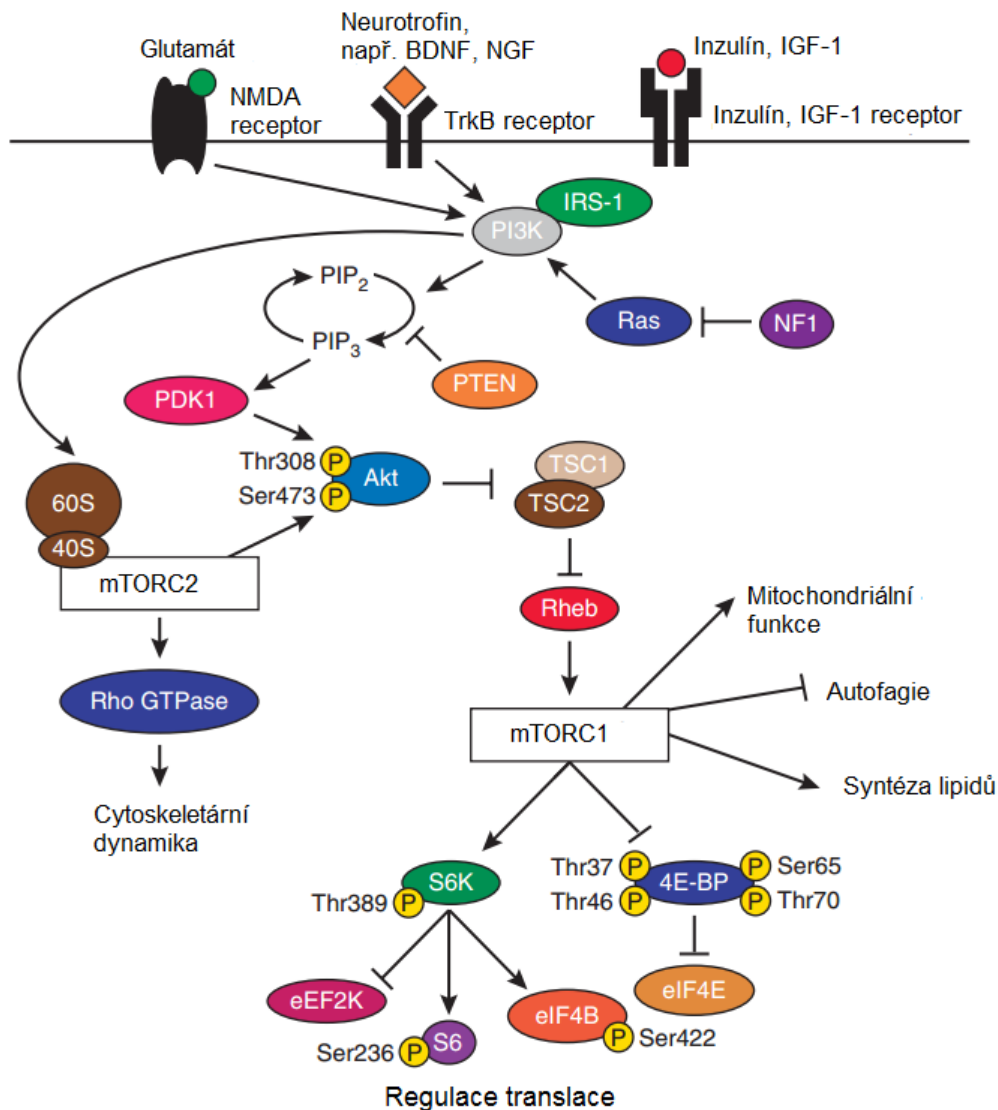


regionální má BDNF rozdílný efekt: v oblasti hipokampu značí vyšší hladina BDNF antidepresivní odpověď, zatímco na úrovni ventrální tegmentální oblasti a NAcc je vyšší hladina spojována s efektem prodepresivním (Eisch et al., 2003). Vyšší hladina BDNF může být také spojena se zánětlivým poškozením u pokusných zvířat (de Pablos et al., 2006).

## 1.6. Synaptická plasticita v depresivní poruše

Synaptická plasticita je definována jako změna síly synapsí v průběhu času v závislosti na změně aktivity daných synapsí. Dlouhodobé změny v synaptické síle se označují jako *long-term potentiation* (LTP) v případě potenciace synaptického spojení. Intracelulární kaskády neuronální plasticity a buněčného přežívání se v jistých prvcích překrývají – jak buněčná aktivita, tak plasticita tedy mohou být nezbytné pro buněčné přežívání, například již výše zmíněným propojením se signální dráhou neurotrofinů (Duman et al., 2000).

Synaptická plasticita je spojená se syntézou nových proteinů, přičemž signální dráhy jsou stále předmětem výzkumu. Pro iniciaci translace jsou obecně potřebné rozpustné proteiny označované jako *eucaryotic initiation factor* (eIF), příkladem může být *eucaryotic initiation factor 4E* (eIF4E). Aktivita těchto proteinů je regulována rozličnými protein kinázami (Klann et al., 2004), jako je například *Mammalian target of rapamycin* (mTOR) kináza. mTOR kináza reguluje iniciaci translace a může být inhibována rapamycinem. Aplikace rapamycinu může zablokovat pozdní fázi LTP, závisající na syntéze nových proteinů (Tang et al., 2002), což demonstruje důležitost mTOR kinázy v tomto procesu. mTOR kináza je ovlivňována aktivací rozličných receptorů (Hoeffler & Klann, 2010), například N-methyl-D-aspartátovým (NMDA) receptorem, BDNF receptorem,  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA) receptorem a metabotropním glutamátovým receptorem (mGluR), ale i různými signálními dráhami, zahrnujícími *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) nebo protein kinázu B (Akt) (Hoeffler & Klann, 2010). mTOR a jeho zapojení ve vybraných signálních drahách je předmětem obrázku 2.



Obr. 2 – Regulace mTOR signální dráhy v mozku. mTOR complex 1 (mTORC1) je aktivován skrze PI3K-Akt signální dráhu. Efektory jsou 4E binding protein (4E-BP) a p70S6 kináza (S6K), která fosforyluje ribozomální protein S6, eucaryotic initiation factor 4B (eIF4B) a eucaryotic elongation factor-2 kinase (eEF2K), čímž je její aktivita snižována. mTORC1 reguluje proteosyntézu, zatímco mTOR complex 2 (mTORC2) reguluje dynamiku aktinového cytosketu skrze Rho guanosine triphosphate (GTP) hydrolázu (Rho GTPázu). NGF, nerve growth factor; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IRS-1, insulin receptor substrate 1; NF1, neurofibromin 1; PIP<sub>3</sub>, phosphatidylinositol 3-kinase; PIP<sub>2</sub>, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; Rheb, Ras homolog enriched in brain; PDK1, phosphatidylinositol-dependent kinase 1; PTEN, phosphatase and tensin homolog; TSC1; tuberous sclerosis complex 1; TSC2; tuberous sclerosis complex 2; (Upraveno dle Costa-Mattioli & Monteggia, 2013).

Antidepresivní účinek ketaminu, o němž bude více pojednáno dále, může být zprostředkován skrze regulaci eEF2 (Monteggia et al., 2013), mTOR aktivace se nicméně zdá být krucální v tomto účinku (Li et al., 2010), ačkoliv toto nebylo potvrzeno všemi pracemi (Autry et al., 2011). Exprese mTORu je patrně snižena v oblasti prefrontálního kortexu u depresivních pacientů (Jernigan et al., 2011). mTOR kináza je ovšem deregulována i v jiných onemocněních (Hoeffler & Klann, 2010).

Již dříve zmíněná kináza PI3K je také zapojena v modulaci synaptické aktivity, buněčné proliferace a plasticity a je mimo jiné regulována skrze BDNF. Její aktivace vede k fosforylaci kinázy Akt a tato fosforyluje glykogen syntázu kinázu 3 (*glykogen syntase kinase 3*, GSK-3). Fosforylace GSK-3 vede k inhibici této kinázy (Leibrock et al., 2013). Model myši s vyřazeným Akt2 genem se projevuje vyšší anxiétou a prodepresivním chováním (Leibrock et al., 2013) a tento efekt je mimo jiné spekulován jako možný důsledek upregulace GSK-3. GSK-3 také reguluje širokou škálu procesů od genové exprese, neurogeneze po neuronální smrt a synaptickou plasticitu. Funkce této kinázy je specifická tím, že dříve, než je substrát fosforylován GSK-3 kinázou, bývá často fosforylován kinázou jinou (Li & Jope, 2010). GSK-3 je předmětem zájmu u afektivních poruch, neboť patrně Lithium, lék u bipolární poruchy, mimo jiné ovlivňuje aktivitu této kinázy (Padiath et al., 2004). GSK-3 má patrně svůj úlohu i v regulaci cirkadiánních rytmů (Padiath et al., 2004) a hladina fosforylace této kinázy je zvyšována administrací antidepresiv v animálním modelu (Li et al., 2004).

Signální dráhy zapojené do regulace synaptické plasticity jsou komplexní a vzhledem k jejich propojenosti s dalšími signálními dráhami, především s dráhami neurotrofickými, není žádným překvapením, že můžeme najít deregulaci těchto drah v depresivní poruše. To, zda narušení těchto drah je příčinou rozvoje depresivní poruchy, či důsledkem narušení jiných systémů, je otázka, která by mohla být zodpovězena dalším výzkumem kladoucím si za cíl lepší pochopení těchto signálních drah.

### **1.7. Glutamátergní transmise a její ovlivnění v depresivní poruše**

Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem centrálního nervového systému. Glutamát je syntetizován z glukózy a čerpán do synaptických váček pomocí vezikulárního glutamátového transportéru. Po výlevu glutamátu do synaptické štěrby

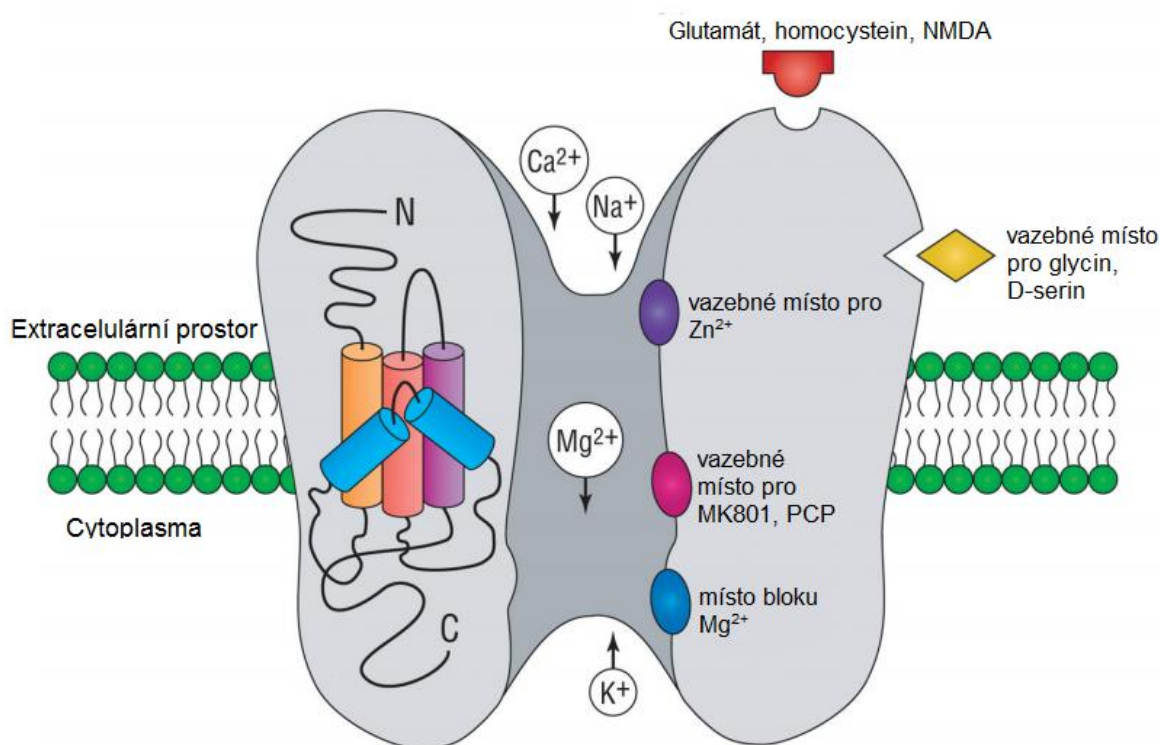
dochází k aktivaci glutamátových receptorů a následně vychytávání glutamátu v tzv. tripartitní synapsi tvořené presynaptickým, postsynaptickým neuronem a astrocytem. Glutamát je vychytáván transportéry excitačních aminokyselin (*excitatory aminoacid transporters*, EAATs). Rozeznáváme dva základní typy glutamátových receptorů, ionotropní a metabotropní receptory. U ionotropních pak hovoříme o NMDA, AMPA a kainátových (KA) receptorech, přičemž AMPA a KA receptory zajišťují rychlý influx především sodných iontů, zatímco NMDA zprostředkovávají zpožděnou a pomalejší excitaci, společně s influxem vápníkových iontů. U mGluR je známo 8 různých podtypů receptorů spřažených s G-proteiny (Niciu et al., 2013).

Změny v glutamátergní transmissi byly opakovaně sledovány v depresivní poruše. Byly zjištěny vyšší plazmatické hladiny glutamátu (Altamura et al., 1995), vyšší hladiny byly také naměřeny pomocí spektroskopické magnetické rezonance ve středním cingulárním kortexu u depresivních pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami (Grimm et al., 2012). V depresivní poruše byly také sledovány gliální změny na úrovni hipokampu (Choudary et al., 2005; Müller et al., 2001), s nimiž může být dáována do souvislosti pozorovaná snížená exprese vysokoafinních transportérů glutamátu vychytávajících glutamát ze synaptické štěrbiny (Choudary et al., 2005). Zvýšené hladiny glutamátu společně s nedostatečným zpětným vychytáváním glutamátu ze synaptické štěrbiny mohou být zodpovědné za jev zvaný excitotoxicita (Choudary et al., 2005).

Tento jev vzniká následkem zvýšené koncentrace vápníku v buňce, vedoucího k aktivaci programované buněčné smrti. Vápníkové ionty jsou důležitým druhým poslem, přičemž jeho hladina v buňce je udržována na velmi nízké hladině. V případě nadměrného influxu vápníkových iontů, který již nemůže být regulován patřičnými mechanismy, dochází k aktivaci proteáz, lipáz, endonukleáz i fosfatáz a dochází jak k produkci kyslíkových radikálů, tak k přímé degradaci buňky a následně její smrti (Arundine & Tymianski, 2003). Aktivace glutamátergních receptorů, zvláště pak NMDA receptoru, vede ke zvýšenému influxu vápníkových iontů, tedy patologicky zvýšená glutamátergní transmise může vést k rozvoji tohoto jevu a smrti neuronu. Patologicky zvýšená glutamátergní aktivita a s ní spojený jev excitotoxicity je dáván do souvislosti s hypoxickým poškozením mozku a neurodegenerací. Z toho důvodu jsou antagonisté

glutamatergních receptorů ve středu zájmu, jako potenciální prevence neuronální smrti (Arundine & Tymianski, 2003). Zvláštní pozornost je pak věnována NMDA receptoru, jež má zajímavé farmakologické vlastnosti.

NMDA receptor je heterotetramerní iontový kanál tvořen podjednotkami NR1-3, přičemž NR1 podjednotka je vždy přítomna, NR3 se nemusí v receptoru vyskytovat. Podjednotkové složení receptoru ovlivňuje vodivost, a možnost farmakologického ovlivnění a exprese receptoru s různými podjednotkami se liší jak v průběhu vývoje, tak regionálně v mozku (Chen & Lipton, 2006). Pro aktivaci receptoru je třeba navázání dvou molekul glycinu a dvou molekul glutamátu a také je potřebná změna membránového potenciálu, nutného k odstranění bloku kanálu hořečnatým iontem (Chen & Lipton, 2006). Vyjma vazebných míst pro glutamát a glycin oplývá tento receptor mnohými vazebnými místy modulujícími jeho aktivitu.



Obr. 3 – Schématický diagram NMDA receptoru. Tento receptor má mnoho vazebných a regulačních míst a umožňuje vstup vápníkových, sodných a hořečnatých iontů do nitra buňky a naopak draslíkových iontů ven z buňky. PCP, fencyklidin; MK801, dizocilpin (upraveno dle Smith, 2002).

NMDA může být modulován tricyklickými antidepresivy (Reynolds & Miller, 1988) a jeho antagonistou je také ketamin, látka využívaná především ve veterinární a pediatrické anestezii a analgezií. Studie posledních let ukázaly rychle nastupující antidepresivní účinek ketaminu u depresivních pacientů (Berman et al., 2000; Murrough et al., 2013; Zarate Jr. et al., 2006a). Antidepresivní účinek ketaminu vedl ke změně směru vývoje nových antidepresiv, jak bude pojednáno v následující části, a také k vyšší pozornosti ke glutamatergní transmissi v patofyziologii depresivní poruchy. Nutno ovšem dodat, že rozsah glutamatergní transmise v centrální nervové soustavě komplikuje možnost terapeutického ovlivnění se současným dosažením požadované specifity účinku.

### **1.8. GABAergní transmise a její ovlivnění v depresivní poruše**

Kyselina  $\gamma$ -aminomáselná ( *$\gamma$ -aminobutyric acid*, GABA) je hlavní neurotransmitter zprostředkovávající neuronální inhibici v mozku. GABA neurony jsou přítomné v celém mozku a regulují svojí inhibiční aktivitou rozličné neuronální systémy a projekce, včetně těch cholinergních či monoaminergních. GABAergní transmise je zprostředkována dvěma typy receptorů: ionotropními GABA<sub>A</sub> receptory (GABA<sub>A</sub>R) a metabotropními GABA<sub>B</sub> receptory (GABA<sub>B</sub>R). GABA<sub>A</sub>R jsou heteropentamerní kanály umožňující průtok chloridových iontů, přičemž složení podjednotek určuje vodivost i farmakologické vlastnosti GABA<sub>A</sub>R. GABA<sub>B</sub>R jsou receptory spřažené s G-proteiny (Luscher et al., 2011).

Při měření GABA v plazmě u depresivních pacientů bylo ukázáno, že její hladiny jsou nižší v porovnání s kontrolami (Petty & Sherman, 1984). Při měření hladin GABA přímo v mozku depresivních pacientů pomocí protonové magnetické rezonance byla také pozorována nižší hladina GABA (Sanacora et al., 1999), je ovšem nutno dodat, že tyto hladiny byly měřeny v okcipitálním kortexu, který nebývá běžně dáván do souvislosti s depresivní poruchou. Nicméně opakované pokusy pomocí této metody ukázaly snížené hladiny GABA v prefrontálním kortexu, který již s depresivní poruchou bývá spojován (Hasler et al., 2007). Pozorovány byly také změny v expresi určitých podjednotek GABA<sub>A</sub>R, konkrétně  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ , and  $\delta$ , ve frontopolárním kortexu depresivních pacientů (Merali et al., 2004). Sledovány byly také změny ve velikosti a denzitě GABA neuronů v dorzolaterálním prefrontálním kortexu (Rajkowska et al., 2007). Inhibiční neurotransmise může být prostřednictvím GABA

receptorů ovlivněna také neuroaktivními steroidy, což jsou endogenní modulátory syntetizované v mozku, adrenálních žlázách, vaječnicích i varlatech. Neuroaktivní steroidy mají modulační efekt na GABA receptory, ten může být inhibiční i excitační. Tato skupina látek je zkoumána v souvislosti s procesy jako je neuronální vývoj, neurodegenerativní poškození, HPA osa, ale i schizofrenie a depresivní porucha (Morrow, 2007). Hladiny neuroaktivních steroidů jsou také změněny v depresivní poruše i premenstruační dysforické poruše, přičemž tyto změny je možné upravit antidepresivní léčbou (Girdler, et al., 2001; Ströhle et al., 1999).

Vzhledem k modulační funkci GABA neuronů u mnohých neurotransmiterových systémů, včetně transmise monoaminergní (Luscher et al., 2011), se dá předpokládat, že poškození GABA neuronů bude mít dopad na ostatní neurotransmiterové systémy. Narušení inhibiční transmise v mozku má také vliv na transmissi excitační a může tak vést k rozvoji excitotoxicity, jak je již popsáno výše. Změny GABA transmise ovšem nejsou specificky přítomny pouze u depresivní poruchy, ale také u anxiety, alkoholismu či schizofrenie (Brambill et al., 2003). Také je stále otevřená otázka prvotní příčiny úbytku GABA neuronů (Luscher et al., 2011).

### **1.9. Patofyziologie „biologických hodin“ v depresivní poruše**

Denní rytmicita je patrná u mnoha tělesných procesů, jako je spánek a bdění, endokrinní funkce, změna tělesné teploty, ale i pozornost a nálada. Centrem „biologických hodin“ je suprachiasmatické jádro (*suprachiasmatic nucleus*, SCN) hypotalamu. V tomto jádře se nachází transkripční zpětnovazebná smyčka hodinových genů, jež cykluje s periodou přibližně 24 hodin (cirkadiánní smyčka). Aktivátorem je dimer tvořený *circadian locomotor output cycles kaput* (CLOCK) proteinem a *brain and muscle ARNT-like* proteinem 1 (BMAL1). Dimer se váže na E-box sekvence v promotorech mnohých genů, mimo jiné genů *Period* (PER) a *Cryptochrome* (CRY). PER a CRY jsou transportovány do cytoplazmy, kde je mimo jiné fosforyluje GSK-3. Fosforylace ovlivňuje stabilitu PER a CRY a jejich vstup do jádra. PER a CRY v jádře potlačují aktivitu dimeru BMAL1/CLOCK a tím tvoří zpětnovazebnou smyčku. Vyjma toho PER, CRY, BMAL1 i CLOCK ovlivňují expresi mnoha dalších genů (McClung, 2007).

Rozrušení cirkadiánní exprese genů je pozorováno u animálních modelů depresivní poruchy, například Per2 genu v různých oblastech spojených s regulací nálady (Landgraf et al., 2015). Změny cirkadiánních rytmů tělesné teploty, hladiny kortizolu či melatoninu jsou pozorovány i u depresivních pacientů. Hlavní pozorovanou anomálií je redukce amplitudy, přičemž tato redukce je úměrná hodnotě depresivních symptomů a je korigována antidepresivní léčbou (Souétre et al., 1989). Při měření transkripční aktivity mnohých genů *post mortem* je také sledována rozrušená rytmicita této aktivity (Li et al., 2013). Nepravidelnost denních cyklů, způsobená například prací na směny, ovlivňuje zdravotní stav a může vést i k rozvoji depresivních symptomů (Scott, 2000).

Jistou formou depresivní poruchy, která bývá dávána do souvislosti s „biologickými hodinami“, je SAD. Její projev je spjatý s určitou částí roku a je možné, že toto souvisí se změnou v hladině melatoninu v rámci ročního období, která informuje tělo o daném ročním období. Patrná změna hladiny melatoninu v závislosti na ročním období byla pozorována u zdravých jedinců, ne ovšem u depresivních pacientů (Morera & Abreu, 2006). Nutno ovšem dodat, že v tomto se práce ne vždy shodují, někdy je naopak změna v hladině melatoninu patrná u depresivních pacientů, ale ne u zdravých kontrol (Wehr et al., 2001). Důležitými parametry se zdá být metodika získávání vzorků, ale i zeměpisná šířka, kde jsou studie prováděny (Morera & Abreu, 2006).

Spánková deprivace a její terapeutický efekt u depresivní poruchy je další možný spojovatel cirkadiánních rytmů s etiologií depresivní poruchy (Bunney & Bunney, 2013). Spánková deprivace pomáhá u recidivující depresivní poruchy, na druhou stranu může spustit manickou nebo hypomanickou epizodu u náchylných osob. Mechanismus spánkové deprivace je nejasný, dává se ale do souvislosti s ovlivněním serotonergní, dopaminergní, ale i adenosinové transmise. Může se však také jednat o záležitost deregulovaných cirkadiánních rytmů (Giedke & Schwäzler, 2002). Závěrem je také vhodné zmínit, že momentálně dostupná antidepresiva upravují cirkadiánní rytmy (McClung, 2007) a také je již k dispozici agomelatin, antidepresivum, jež je agonistou melatoninových receptorů (Maclsaac et al., 2014).



## **2. Léčba depresivní poruchy a její limitace**

### **2.1. Tricyklická antidepresiva**

Tato antidepresiva mají tricyklickou planární strukturu podobnou fenothiazinům, což je skupina látek často vykazující antipsychotický účinek (Ciraulo et al., 2011). Imipramin byl také zprvu testován pro svůj potenciální antipsychotický účinek, který se neprokázal, zato byl ale ukázán účinek antidepresivní, zvláště v případě endogenní depresivní poruchy s přítomností pro toto onemocnění typických příznaků (Kuhn, 1958). TCA, která ovlivňují serotonergní a noradrenergní transmissi, byla první předepisovaná antidepresiva, a jejich efektivita patrně předčí novou generaci inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (Anderson, 2000). TCA mají ovšem poměrně nespecifický účinek na mnohých receptorech a jsou proto hůře tolerována vzhledem k rozličným vedlejším účinkům, postupně tak byla v praxi nahrazena novější třídou antidepresiv (Anderson, 2000). Mezi nežádoucí účinky, které se dostavují při léčbě TCA, patří sucho v ústech, konstipace, nevolnosti, rozmazané vidění. Tyto a další nežádoucí účinky bývají důvodem přerušení léčby TCA (Trindade et al., 1998).

### **2.2. Inhibitory monoaminoxidázy**

Antidepresivní účinek iproniazidu byl objeven náhodou v padesátých letech, u pacientů s tuberkulózou. Později bylo odhaleno, že tato látka je inhibitorem ireverzibilní monoaminoxidázy, což je enzym, který metabolizuje serotonin, ale i noradrenalin a dopamin. Objevení mechanismu účinku iproniazidu společně s mechanismem účinku tricyklických antidepresiv vedlo k formování hypotézy deficiencie monoaminů. Postupně byly vyvíjeny další látky s inhibitorním účinkem na monoaminoxidázu, zatímco iproniazid byl stažen z trhu pro hepatotoxicitu (Shulman et al., 2013).

Další generace těchto látek se řadí do skupiny reverzibilních MAOi, jako je například selegilin. Reverzibilní MAOi mají dobrý efekt u atypické depresivní poruchy (Henkel et al., 2006). Ovšem vzhledem k vedlejším účinkům, o kterých budu hovořit dále, postupně klesalo předepisování této třídy antidepresiv, takže ačkoliv jsou v dnešní době k dispozici nové třídy MAOi, lékaři nemají s použitím této třídy antidepresiv zkušenost a tedy je moc nepředepisují (Shulman et al., 2013).

Důležitou limitací použití MAOi je jejich interakce s potravinami obsahujícími aminokyselinu tyramin (například zralé sýry, solené či uzené maso, ale i přezrálé avokádo a banán) nebo sympatomimetiky. Tato interakce vede k rozvoji hypertenzní krize. Z tohoto důvodu je důležitá speciální dieta a podchyzení všech kontraindikací, které použití této kategorie antidepresiv v klinické praxi komplikují. V případě různých způsobů podání a předepsání novějších generací těchto antidepresiv je však ke zvážení použití této třídy antidepresiv v určitých případech nevyloučit (Flockhart, 2012).

### **2.3. Inhibitory zpětného vychytávání monoaminů**

Tato nejmladší třída antidepresiv je opět založená na monoaminergní teorii depresivní poruchy. V osmdesátých letech byly uvedeny selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (*selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI), jako je fluoxetin, paroxetin a sertralin. Novější třída pak inhibuje zpětné vychytávání jak serotoninu, tak noradrenalinu (*serotonine and noradrenaline reuptake inhibitor*, SNRI). Do této kategorie patří například venlafaxin (Schechter et al., 2005).

Typickým zástupcem třídy SSRI je fluoxetin, známý především jako Prozac®. První in-vitro studie ukázaly, že fluoxetin blokuje zpětné vychytávání, především serotoninu, do synaptosomů. Toto bylo potvrzeno také *in vivo* studiemi. Maximální inhibice je dosaženo po 4 hodinách po administraci, efekt přetrvává až 48 hodin po podání. Fluoxetin má silnou afinitu k 5-HT transportéru. Klinické studie přičetly fluoxetinu podobný antidepresivní potenciál jako TCA, ale s lepším profilem vedlejších účinků. Ovšem přibližně pouhá polovina nemocných reaguje na tuto léčbu, přičemž je patrná dlouhá latence nástupu účinku (Perez-Caballero et al., 2014). Venlafaxin je hlavním zástupcem SNRI, jeho struktura je poměrně odlišná ve srovnání s SSRI, TCA či MAOi. Venlafaxin působí přes inhibici zpětného vychytávání jak serotoninu, tak noradrenalinu, a zvyšuje tak extracelulární koncentraci obou neurotransmiterů. Některé studie ukazují, že míra remise u venlafaxinu je nižší než u SSRI a latence nástupu účinku je kratší, ovšem míra nežádoucích účinků je podobná (Baca Baldomero et al., 2005). Nevýhodou Venlafaxinu je jeho mírně vyšší toxicita než u jiných SNRI i SSRI. S porovnáním Venlafaxinu se SSRI je patrně přítomná vyšší mortalita při předávkování a také kardiotoxicita, což vede k obezřetnosti lékařů při jeho

předepisování. Tyto pozorování však nebyly prokázány všemi studii (Taylor et al., 2013).

Komplikací u SSRI i SNRI je jejich vliv na sexuální funkce. Jak bylo ukázáno, SSRI i SNRI způsobují sexuální dysfunkci. Tímto vedlejším účinkem trpí třetina až polovina pacientů léčených SSRI nebo SNRI (Clayton et al., 2002), přičemž to se dá do určité míry řešit předepsáním escitalopramu. V případě užívání escitalopramu jsou potřebné nižší léčebné dávky, což je doprovázeno snížením doprovodné sexuální dysfunkce (Ashton et al., 2005). Jednou z největších nevýhod SSRI a SNRI je fakt, že pouze 50% pacientů reaguje na léčbu a remise je dosaženo pouze u 30% pacientů. Může být také vyžadována modulace lithiem, popřípadě atypickými antipsychotiky. Druhou nevýhodou je pomalý nástup účinku. Může trvat i 6-8 týdnů, než je účinek SSRI či SNRI patrný (Artigas, 2015).

#### **2.4. Atypická antidepresiva a nefarmakologická léčba**

Látky a metody, o nichž pojednám níže, jsou zpravidla druhou volbou v případě pacientů nereagujících na léčbu první volby, jež je ve většině případů SSRI.

Jedním příkladem atypických antidepresiv je bupropion. Tato látka není strukturně příbuzná žádné z předchozích tříd antidepresiv. Bupropion patrně zvyšuje noradrenergní aktivitu a je také slabým inhibítozem zpětného vychytávání dopaminu. Vedlejší příznaky užívání bupropionu mohou zahrnovat sucho v ústech, nespavost, zácpu či bolesti hlavy, může se vyskytnout i motorický záchvat. Toto antidepresivum ovšem nezpůsobuje sexuální dysfunkci či příbytek na váze (Settle et al., 1999). Dalším atypickým antidepresivem je Mirtazapin. Tato látka zvyšuje dostupnost serotoninu skrze  $\alpha_2$  adrenergní autoreceptory a heteroreceptory, ale také postsynaptickou bloádou 5-HT<sub>2</sub> a 5HT<sub>3</sub> receptorů. Profil nežádoucích příznaků je podobný tomu u SSRI, je však více patrné nabírání na váze. Zdá se však, že míra remise onemocnění u pacientů léčených Mirtazapinem je vyšší, než u jiných antidepresiv. Je také dobře tolerován staršími pacienty a má dobrý efekt na úpravu spánkového režimu (Holm & Markham, 1999). Trazodon je další příklad atypického antidepresiva. Působí přes antagonismus 5-HT<sub>2A</sub> a inhibici zpětného vychytávání serotoninu, noradrenalinu nebo dopaminu (*serotonin antagonist and reuptake inhibitor*, SARI). Profil nežádoucích příznaků je podobný Mirtazapinu, není však tak patrné přibírání

na váze, ale může se dostavit ortostatická hypotenze. Tato látka není používána pouze v léčbě depresivní poruchy, ale také bulimie, nespavosti, či úzkosti. Trazodon je schopen kontrolovat široké spektrum symptomů depresivní poruchy bez negativního vlivu na spánek (Fagiolini et al., 2012). Agomelatin je antidepresivum s velmi rozdílným mechanismem účinku. Jedná se o agonistu melatoninových (MT) receptorů, MT<sub>1</sub> a MT<sub>2</sub>. Látka má také patrně afinitu pro 5-HT<sub>2C</sub> receptory. Agomelatin upravuje cirkadiánní rytmy a také nepřímo zvyšuje hladiny dopaminu a noradrenalinu v prefrontálním kortexu (Maclsaac et al., 2014). Antidepresivní efekt se dostavuje rychleji než u standardních antidepresiv (Papp et al., 2003), agomelatin také upravuje spánkový režim. Profil nežádoucích účinků je příznivější než u tradičních antidepresiv, nicméně jsou přítomny zvýšené jaterní enzymy, patrně ve spojitosti s biodegradací agomelatinu (Maclsaac et al., 2014).

Existují i nefarmakologické intervence aplikované především u depresivní poruchy, která nereaguje na léčbu farmakologickou, tzv. *treatment resistant depression* (TRD). Příkladem může být ECT, kdy je v pacientovi v anestezii aplikován elektrický pulz na lebku za účelem vyvolat záchvat. Patrné by měly být typické tonicko-klonické křeče a specifický záznam na elektroencefalogramu (EEG) (Rau et al., 2007). Mechanismus účinku ECT není objasněn, ovlivněno je ovšem patrně mnoho neurotransmitterových systémů, včetně serotonergního, glutamatergního či dopaminergního, ovlivněny jsou také hladiny BDNF či GABA (Kato, 2009). V případě ECT některé studie naznačují vyšší efektivitu v porovnání se zásahem farmakologickým. ECT má dopad na poruchy paměti a kognice, tento efekt je ovšem přechodného charakteru (The UK ECT Review Group, 2003). Dalším možným zákrokem je stimulace bloudivého nervu (*vagus nerve stimulation*, VNS). VNS vyžaduje chirurgický zákrok, při němž jsou pacientovi implantovány elektrody v oblasti vzestupných vláken levého krčního bloudivého nervu a neurostimulátor k jejich ovládní (Rau et al., 2007). Mechanismus účinku VNS opět není objasněn, pravděpodobný je vliv na rozličné neurotransmitterové systémy (Mohr et al., 2011). Účinek se dostavuje po delší časové prodlevě, v řádu týdnů až měsíců. Nejčastějším nežádoucím účinkem je chrapot a bolesti, není patrný vliv na kognitivní funkce či spánkový režim (Mohr et al., 2011). Podobným neurochirurgickým zákrokem aplikovaným u depresivní poruchy může být hluboká mozková stimulace, kdy jsou opět pacientovi aplikovány elektrody, většinou do oblasti subgenuálního cingulárního

závitu, nebo i NAcc. Doba do nástupu účinku zákroku má interindividuální variabilitu, obecně však nastupuje rychleji než v případě VNS (Puigdemont et al., 2012).

## **2.5. Nové směry ve vývoji antidepresivní léčby**

Jak je patrné z předchozích kapitol, převážná většina dostupných antidepresiv je založená na zvyšování dostupnosti jednoho nebo více monoaminů v synaptické štěrbině. SSRI, která jsou pravděpodobně nejčastější třídou předepisovaných antidepresiv, mají sice poměrně příznivý profil nežádoucích účinků ve srovnání se svými předchůdci, nicméně efektivitou je nepředčí (Anderson, 2000). Odhaduje se, že až 50% nemocných léčba první volby neuleví (Fava, 2003). Problematická je taky skutečnost, že latence nástupu účinku antidepresivní léčby může být v řádu několika týdnů, což je pro pacienta kritické období, v němž může dojít k pokusu o sebevraždu (Fergusson et al., 2005). Jedním z vysvětlení pro tento zpožděný nástup je změna v neuroplasticitě, což je proces dlouhodobý, jiným vysvětlením je pak aktivace inhibičních 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptorů přítomných na těle neuronů, což vede k opětovnému snížení serotonergní transmise. Řešení se nabízí v podobě koadministrace antagonisty těchto autoreceptorů, čímž se naruší tato nežádoucí zpětnovazebná smyčka. Příkladem takového antagonisty je pindolol, jehož administrace společně s antidepresivou zkracuje latenci nástupu účinku antidepresiv (Portella et al., 2009). Nutno ovšem dodat, že toto stále není optimální řešení, neboť vyšší počet administrovaných léčiv znamená vyšší míru nežádoucích účinků.

V posledních letech bylo však ukázáno, že náladu je možné regulovat s kratší latencí. Příkladem může být spánková deprivace, která má rychle nastupující, ač transientní antidepresivní efekt (Bunney & Bunney, 2013), dalším příkladem téměř instantně nastupujícího antidepresivního účinku je aplikace ketaminu (Berman et al., 2000). Tyto poznatky odstartovaly hledání antidepresivní léčby založené na jiném mechanismu účinku, než je ovlivnění monoaminergní transmise. Snahou je vyvinout rychleji působící antidepresiva, s lepším profilem nežádoucích účinků a vyšší mírou remise. Směry, kterými se vývoj nových antidepresiv ubírá, se pokusím nastínit na následujících stránkách.

### 2.5.1. Glutamát, GABA a BDNF

Již skoro před dvaceti lety byl ukázán antidepresivní účinek ketaminu (Berman et al., 2000). Tento efekt byl prokázán mnoha studiemi, a to v případě jednorázové aplikace (Berman et al., 2000; Murrough et al., 2013; Zarate Jr. et al., 2006a), tak aplikací opakovaných (aan het Rot et al., 2010), kdy byla zachována bezpečnost a účinnost aplikace, efekt však výrazně prodloužen nebyl (aan het Rot et al., 2010). Použití ketaminu je v praxi komplikováno mnohými faktory, jako jsou jeho psychotomimetické účinky, transientní antidepresivní efekt, ale také možnost zneužití jako rekreační drogy. Většina studií byla prováděna s aplikací intravenózní, neboť orální administrace je spojena s nepříjemnými doprovodnými jevy, tento způsob administrace je ovšem pro klinickou praxi nevhodný. Zkoušen byl i intranazální způsob aplikace, který by byl v praxi použitelný, při tomto způsobu administrace ovšem klesá efektivita léčby (Lapidus et al., 2014). Ketamin by však mohl být využit v případě nutnosti okamžité intervence (Coyle & Laws, 2015).

Výsledky získané ohledně antidepresivního účinku ketaminu vzbudily naděje v oblasti výzkumu depresivní poruchy a obrátily zvláštní pozornost ke glutamátergnímu systému v depresivní poruše. Testovány byly i další NMDA antagonisté, příkladem je memantin, ten ovšem neprokázal jednoznačně antidepresivní účinek (Ferguson & Shingleton, 2007; Zarate et al., 2006b), nebo látka s označením AZD6765, jejíž antidepresivní účinek přetrvává pouze po dobu 2 hodin. Další látka působící přes NMDA receptor je GLYX-13, částečný agonista glycinového místa. Antidepresivní účinek byl prokázán v preklinickém výzkumu (Burgdorf et al., 2013) a momentálně probíhá 3. fáze klinického výzkumu (Preskorn et al., 2015). Také mGluR jsou zkoumány v souvislosti depresivní poruchou (Pilc et al., 2013).

Kromě glutamátergního systému je pozornost zaměřená i na jiné systémy, již dříve popsané. Příkladem může být přímá aplikace BDNF (Shirayama et al., 2002), popřípadě syntetických agonistů a antagonistů jeho receptoru, jež může mít, v závislosti na oblasti aplikace, antidepresivní účinek (Shirayama et al., 2015). Nutno ovšem dodat, že syntéza a aplikace látek podobných BDNF je ztížena vzhledem k povaze této molekuly a také rozdílnému efektu BDNF v různých mozkových oblastech (Eisch et al., 2003). GABA receptory jsou také implikovány v depresivní

poruše, i zde probíhají preklinické studie s cílem stanovit možný antidepressivní účinek látek působících na tuto transmissi (Khisti et al., 2000; Molina-Hernández et al., 2005). Jedním z příkladů může být látka  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát testovaná na Fyziologickém Ústavu Akademie věd, která sice neprokázala antidepressivní účinek v testu nuceného plavání *per se*, ale došlo k prodloužení latence do první imobility zvířete, což naznačuje pozitivní efekt. Je třeba ovšem dodat, že tato látka patrně nepůsobí pouze přes GABA receptory, ovlivňuje také AMPA a NMDA receptory (Holubova et al., 2014).

### 2.5.2. HPA osa a neuropeptidy

Stresová osa, která je také v patofyziologii depresivní poruchy zapojena, byla logicky cílem potenciální antidepressivní léčby. Příkladem mohou být různí antagonisté  $CRF_1$  receptoru vykazující antidepressivní účinek v animálním modelu (Hodgson et al., 2007; Nielsen et al., 2004), antidepressiva s tímto mechanismem účinku se však do klinické praxe uvést nepodařilo (Binneman et al., 2008; Schule et al., 2009).

Vasopresinové receptory, které jsou zodpovědné za homeostázu tekutin, jsou také funkčně propojeny s HPA osou a jsou tedy také cíleny potenciálními antidepressivy. Antagonista vasopresinového receptoru s označením SSR149415 prokázal antidepressivní účinek v animálním modelu (Griebel et al., 2002; Hodgson et al., 2007), klinické výsledky již bohužel tak slibné nejsou (Griebel et al., 2012). Stresová osa může být také modulována neuropeptidy, což jsou malé peptidické molekuly produkované neurony za účelem vzájemné komunikace. Neuropeptidy mohou také vyjma stresové reakce modulovat monoaminergní transmissi. Mezi tyto molekuly řadíme například neuropeptid Y (NPY), Substanci P, oxytocin, galanin (Gal), *melanin-concentrating hormone* (MCH), ale také již výše zmíněný vasopresin a CRF (Catena-Dell'Osso et al., 2013).

Aktivita Substance P je zprostředkován skrze neurokininový (NK) receptor, přičemž ze tří známých NK receptorů ( $NK_1$ ,  $NK_2$  a  $NK_3$ ) je afinita Substance P nejvyšší pro  $NK_1$ . U depresivních pacientů byla pozorována zvýšená hladina Substance P, společně se sníženou denzitou  $NK_1$  receptorů (Geraciotti et al., 2006). Z toho důvodu byly preklinicky testovány rozličné látky s antagonistickým účinkem na  $NK_1$  receptor

(Varty et al., 2003), klinické studie ovšem slibné výsledky nepřinesly (Ratti et al., 2011). NPY a jeho  $Y_1$ - $Y_5$  receptory tvoří komplexní systém, kdy aktivace různých typů receptorů reguluje různé fyziologické funkce a jejich exprese se liší regionálně v mozku (Beyer & Hughes, 2007; Morales-Medina et al., 2012). NPY a především receptory  $Y_1$  a  $Y_2$  jsou dávány do souvislosti s anxiétou (Bacchi et al., 2006), ale NPY hladiny jsou sníženy také v depresivní poruše (Widerlöv et al., 1988). I zde je snaha vyvíjet antagonisty receptoru pro NPY a testovat jejich potenciální antidepresivní efekt, například  $Y_2$  receptoru (Morales-Medina et al., 2012), nebo  $Y_5$  receptoru (Walker et al., 2009), data z klinických studií však nejsou slibná.

MCH, působící přes dva receptory spřažené s G-proteiny,  $MCH_1$  a  $MCH_2$  (Borowsky et al., 2002), je především zkoumán pro svojí roli v regulaci příjmy potravy a tělesné váhy. Patrně má však svojí úlohu i v regulaci nálady (Antal-Zimanyi & Khawaja, 2009). Antagonisté  $MCH_1$  receptorů ukázaly antidepresivní, anorexigenní a anxiolytický účinek (Borowsky et al., 2002; Chaki et al., 2015), tento však nebyl potvrzen všemi studiemi (Basso et al., 2006). Nutno dodat, že uvedení  $MCH_1$  antagonistů do klinické praxe by mohlo být komplikováno potenciálním profilem nežádoucích účinků (Méndez-Andino & Wos, 2007). Regulace potravního režimu, spánku a bdělosti, ale i systému odměny se účastní další neuropeptid orexin (Mieda & Sakurai, 2012). Vzhledem k narušení těchto systémů v depresivní poruše se jeví logické, že je o tuto molekulu zájem. Nedávné studie ukazují potenciál antagonistů orexinových receptorů (Fitch et al., 2014; Nollet et al., 2011) a orexin patrně také hraje roli v antidepresivním účinku kalorické restrikce (Lutter et al., 2008). Dalším regulátorem příjmu potravy je ghrelin, přičemž jeho signalizace je pravděpodobně propojena s HPA osou (Spencer et al., 2012). Ghrelin je také dáván do spojitosti s regulací neurogeneze v mozku a jeví se tak jako dalším potenciálním terčem výzkumu nových antidepresiv (Walker et al., 2015).

### **2.5.3. Další vybrané látky**

Opioidní receptory, jež mimo jiné modulují aktivitu dopaminergních neuronů, mají patrně také svojí roli v regulaci nálady. Rozeznáváme  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\kappa$  opioidní receptory, přičemž naděje je vkládána do antagonistů  $\kappa$  receptorů (Lutz & Kieffer, 2013). Antagonisté  $\kappa$  receptorů ukazují potenciální antidepresivní účinek



(Carlezon et al., 2009; Carr et al., 2009) a některé tyto látky jsou předmětem klinických studií.  $\mu$  agonisté, jako například buprenorfin, také vykazují jistý antidepresivní efekt (Bodkin et al., 1995), v případě  $\mu$  agonistů je však třeba zvážit riziko jejich zneužití. Patrně endokanabinoidní systém má také jistou modulační úlohu ve výlevu dopaminu (Oleson & Cheer, 2012). Známe dva typy kanabinoidních receptorů,  $CB_1$  a  $CB_2$ , jedná se opět o receptory spřažené s G-proteiny, jejichž aktivace vede k inhibici adenylylcyklázy, přičemž tyto receptory jsou hojně zastoupeny v mozku, především presynapticky, ale i na buňkách tukových, cévních a imunitních (Gorzalka & Hill, 2011). Endokanabinoidní signalizace je dávana do souvislosti s účinkem antidepresiv a sledované neurogeneze (Fogaça et al., 2013). Také patrně zvýšení  $CB_1$  signalizace administrací agonisty má antidepresivní účinek (Hill & Gorzalka, 2005). Při dalším vývoji těchto látek je nutné ovšem zvážit možný psychotomimetický efekt navozený agonismem  $CB_1$  receptoru (Vidal et al., 2011).

Také signalizace zprostředkovaná puriny neunikla pozornosti. Příkladem může být adenosintrifosfát (*adenosine triphosphate*, ATP), které plní také signální funkci. Tato signalizace je zprostředkována P2X ionotropními receptory a P2Y metabotropními receptory spřaženými s G-proteiny (Abbracchio & Burnstock, 1994). Patrně různé genové varianty P2X receptorů je možné dát do souvislosti s poruchami nálady (Sperlagh et al., 2012) a v případě chybějícího P2X<sub>7</sub> receptoru u myši je patrný antidepresivní fenotyp (Boucher et al., 2011). Vyjma toho se zdá, že antagonisté P2X<sub>7</sub> vykazují antidepresivní účinek (Wilkinson et al., 2014). Další purinergní signalizací, která vzbudila zájem, je adenosinová signalizace, zprostředkovaná A<sub>1</sub>, A<sub>2A-B</sub> a A<sub>3</sub> receptory, spřaženými s G-proteiny. Adenosinová signalizace patrně hraje svojí úlohu v antidepresivním účinku spánkové deprivace (Welberg, 2013) a v případě vyřazeného A<sub>2A</sub> receptoru u myši, případně po aplikaci antagonistů A<sub>2A</sub> receptoru, je přítomen antidepresivní efekt (El Yacoubi et al., 2001). Istradefyllin je příkladem antagonisty A<sub>2A</sub> receptoru, který ukázal antidepresivní účinek v animálním modelu a vzhledem ke svému potenciálu zlepšovat motorické funkce by mohl být vhodnou léčbou pro komorbidní depresivní poruchu patrnou u pacientů s Parkinsonovou chorobou (Yamada et al., 2014).

Zablokování acetylcholinesterázy, zodpovědné za zastavení aktivity acetylcholinu na synapsi skrze jeho rozklad, má prodepresivní účinek. Tento efekt může být vyrušen

podáním antagonisty acetylcholinového receptoru, což ukazuje na potenciální roli cholinergní transmise v depresivní poruše (Mineur et al., 2013). Rozeznáváme dva typy cholinergních receptorů, ionotropní (též nazývány nikotinové) a metabotropní (muskarinové), spřažené s G-proteiny. Podání skopolaminu, antagonisty muskarinových receptorů, vyvolává rychlou úlevu u depresivních pacientů již po první dávce (Furey & Drevets, 2006). Preklinické studie naznačují, že pro tento účinek jsou rozhodující  $M_1$  a  $M_2$  receptory (Witkin et al., 2014), skopolamin také patrně ovlivňuje mTOR signální dráhu, podobně jako ketamin (Voleti et al., 2013). Nutno ovšem říci, že klinické využití skopolaminu není prakticky možné vzhledem k doprovodnému pocitu deliria a zmatenosti (Furey & Drevets, 2006).

Pocity deliria, halucinací a zmatenosti po požití skopolaminu nejsou ničím neznámým (Freye, 2010), zajímavé je však pozorování, kolik látek s touto charakteristikou patrně oplývá antidepresivním účinkem. Vyjma skopolaminu je jím i zmíněný ketamin, antidepresivním účinkem možná oplývají i halucinogeny, jejichž efekt je zprostředkován ovlivněním serotonergní transmise (Baumeister et al., 2014) či harmin, alkaloid ve známém halucinogenním nápoji *Ayahuasca* (Osório et al., 2015). Využití halucinogenů v klinické praxi je ztíženo jednak pocity, které tyto látky vyvolávají, tak možností zneužití této třídy látek, vzhledem k jejich rekreačnímu využívání za účelem navození změněných stavů mysli. Nabízí se ovšem otázka, jaký může být mechanismus propojení změněných stavů mysli s patofyziologií depresivní poruchy a další zkoumání halucinogenů by mohlo pomoci tuto otázku zodpovědět (Baumeister et al., 2014).

### **3. Metody a modely používané v experimentálním výzkumu**

#### **3.1. Animální modely depresivní poruchy**

##### **3.1.1. Validita animálních modelů depresivní poruchy**

Potřeba animálního modelu depresivní poruchy byla patrná již před 50 lety. Již v té době bylo pozorováno a rozeznáváno depresi podobné chování u zvířat, především v separačních pokusech, při nichž docházelo například k oddělení matek od mláďat. Autoři McKinney & Bunney se v roce 1969 obšírně zabývali nároky kladenými na animální modely depresivní choroby. Dle nich by měl dobrý model depresivní poruchy splňovat pět základních kritérií: sledované symptomy by měly být

analogní těm, které jsou k vidění u depresivních pacientů a sledované behaviorální změny by měly být objektivně zhodnotitelné. Nezávislí pozorovatelé by se pak měli shodnout na pozorovaných změnách a modely by měly být reprodukovatelné mezi jednotlivými laboratoři. Konečně, navozené behaviorální změny by měly být upravitelné stejnou léčbou, jež je využívána k léčbě depresivní poruchy. McKinney & Bunney přikládali důležitost znalosti základního chování sledovaného zvířete a nabádali k volbě zvířat sociálních, kde narušení sociálních interakcí vede k biochemickým a behaviorálním změnám, které jsou měřitelné. Ostatně, u pacientů je často rozvoj depresivní poruchy také spjat se změnou postavení ve společnosti či v sociálních vazbách (McKinney & Bunney, 1969).

Willner se v roce 1984 zabýval animálními modely s tím, že i on vyložil svojí představu kritérií, které by měl dobrý animální model depresivní poruchy splňovat. Etiologická validita není zahrnuta v jeho podmínkách kladených na animální modely, neboť ta je předmětem diskuzí a dohadů (Willner, 1984). Dle Willnera, animální model by měl být validní fenomenologicky, prediktivně a konstruktivně. Model splňuje fenomenologickou validitu v případě, že se antidepresivní účinek u modelu dostavuje v případě chronické aplikace, viditelné projevy u zvířat jsou srovnatelné s těmi u lidí a přítomná je specifická symptomatologie. Neměly by být patrné symptomy, které se běžně nevyskytují u depresivních pacientů. Konstruktivní validita je pak charakterizována tím, že prvky chování pozorované u modelu a prvky chování pozorované u depresivních pacientů mohou být jednoznačně interpretovány a jsou homologické. Dále je modelována vlastnost založená na teoretické či empirické znalosti něčeho, co je pozorováno u depresivní poruchy. Prediktivní validitou se rozumí, když model správně identifikuje léčbu založenou na různých mechanismech účinku bez toho, aby byla některá možná terapie opomenuta, případně falešně pozitivní. Dále by také pozorovaný účinek u animálního modelu měl být srovnatelný s tím pozorovaným v klinické praxi (Willner, 1984).

Animální modely, o nichž bude pojednáno na následujících stránkách, zřídka splňují všechna kritéria validity, které byly vysloveny v některé s těchto stěžejních prací pojednávajících o validitě animálních modelů depresivní poruchy. V případě testů antidepresivního účinku není výjimkou, že pouze jedno kritérium je splněno, přičemž i to je často zpochybňováno. Závěrem této kapitoly bych pak nastínila limitace

momentálně dostupných modelů, a kam by bylo žádoucí vývoj nových animálních modelů směřovat.

### 3.1.2. Genetické modely

Genetické animální modely mohou být získány selektivním křížením, přičemž jsou vybírána zvířata s požadovanou charakteristikou v průběhu několika generací. Často se jedná o inbrední kmeny, které jsou žádané kvůli podobnosti mezi jednotlivými zvířaty. Příkladem kmene získaného selektivním křížením, využívaného jako animálního modelu depresivní poruchy, může být Flinders senzitivní linie (FSL) potkanů. Původním záměrem tvorby tohoto kmene bylo vytvořit potkany resistantní k diisopropylfluorofosfátu (DFP), což je látka s anticholinesterázovou aktivitou. Původní záměr splněn nebyl, naopak nově vytvořený kmen potkanů byl DFP sensitivní. FSL potkani vykazují vyšší podíl spánkové REM fáze a zvýšenou imobilitu v testu nuceného plavání, dále je patrná cholinergní senzitivita a snížená pohybová aktivita, ale nebyla prokázána anhedonie v případě nepřítomnosti stresu. Jak zvýšená imobilita, tak zvýšený podíl REM fáze mohou být upraveny běžnou antidepressivní medikací (Overstreet & Wegener, 2013). Overstreet přičítá tomuto kmeni fenomenologickou, konstruktivní, i prediktivní validitu (Overstreet, 1993).

Nověji se genetické animální modely získávají především vyřazením žádaného genu (*knock-out*), popřípadě vložením nadbytečných kopií sledovaného genu, čímž dochází k posílení jeho exprese. Často se jedná o gen specifické molekuly nebo receptoru, u něhož se předpokládá, že hraje roli v depresivní poruše. Tvorba nových genetických modelů probíhá konstantně a k dispozici jsou různé *knock-out* modely, například pro 5-HT transportér, adrenergní receptory, noradrenalinové transportéry, CRF receptory, ale i BDNF (Barkus, 2013). Tabulka 1 obsahuje příklady genetických modelů, které byly v posledních letech vytvořeny.

*Knock-out* modely jsou výborným prostředkem, který pomáhá určit klíčové geny v patofyziologii depresivní poruchy. Nedá se ovšem předpokládat, že vyřazení jednoho genu, které je v momentální chvíli technologicky zvládnutelné, by bylo dostatečné k rozvoji tohoto onemocnění. Reálná situace pravděpodobně sestává z genetické predispozice kombinované s vlivem faktorů prostředí (Sullivan et al., 2000). *Knock-out* modely si také nesou poškozenou DNA od počátku ve svém genomu, poškození tedy

není vázané regionálně či na určitou vývojovou periodu (Urani et al., 2005). Aktivaci či deaktivaci určitého genu v požadovaném období vývoje či regionálně však umožňuje optogenetika, jejíž popularita je nyní na vzestupu (Sidor, 2012).

<b>Shrnutí neuroendokrinních a behaviorálních změn pozorovaných u rozdílných transgenních myších linií</b>								
	Úzkost		Zoufalství		Depresivní chování		HPA osa	
Lidská depresivní porucha	↑		↑		↑		↑	
	Oč.	Poz.	Oč.	Poz.	Oč.	Poz.	Oč.	Poz.
<b>Hypotéza deficience monoaminů</b>								
SERT KO	↓	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↑
5-HT <sub>1A</sub> RTR KO	↑	↑	↑	↓	↑	–	↑	↓
5-HT <sub>1B</sub> RTR KO	↓	↓	↓	↔	↓	–	↓	↔
NET KO	↓	–	↓	↓	↓	–	↓	–
α <sub>2A</sub> RTR KO	–	↑	↑	↑	↑	–	–	–
α <sub>2C</sub> RTR KO	–	–	–	↓	–	–	–	↓
α <sub>2C</sub> RTR overex.	–	↔	–	↑	–	–	–	↑
DA-β-Hydroxyl. KO	↑	–	↑	↔	↑	–	↑	–
MAOA KO	↓	↔	↓	↓	↓	–	↓	–
<b>Neurotrofická hypotéza</b>								
CREBαΔ KO	↑	↑	↑	↓	↑	–	↑	↔
CREB decreas.	↑	↔	↑	↓	↑	↓	↑	–
CREB overex.	↓	–	↓	↑	↓	↑	↓	–
BDNF+/-	↑	↔	↑	↔	↑	↔	↑	↔
Cond. BDNF KO	↑	↑	↑	–	↑	–	↑	–
Cond. TrkB KO	↑	↔	↑	↔	↑	–	↑	↔
<b>Hypotéza narušené HPA osy</b>								
CRF overex.	↑	↑	↑	↔	↑	–	↑	↑
CRF KO	↓	↔	↓	–	↓	–	↓	↓
CRF RTR <sub>1</sub> KO	↓	↓	↓	–	↓	–	↓	↓

Cond. CRF RTR <sub>1</sub> KO	↓	↓	↓	–	↓	–	↔	↔
CRF RTR <sub>2</sub> KO	↑	↑	↑	↑	↑	–	↑	↑
CRF RTR <sub>1+2</sub> KO	–	↓	–	–	–	–	–	↓
GR KO	↓	–	↑	–	↑	–	↑	↑
GR+/-	↑	↔	↑	↔	↑	↑	↑	↑
GR antisense	↑	↓	↑	↓	↑	–	↑	↔
GR overexpr.	↓	↔	↓	↔	↓	↓	↓	↓
Cond. GR overex.	–	↑	–	–	–	–	↓	↔
MR KO	↑	↑	↑	–	↑	–	↑	↑
Ostatní hypotézy								
NK <sub>1</sub> RTR KO	↓	↓	↓	↓	↓	–	↓	↓
NPY KO	↑	↑	↑	–	↑	–	↓	↔
NPY overex.	↓	↓	↓	–	↓	–	↑	–
NPY RTR <sub>1</sub> KO	↑	–	↑	–	↑	–	–	↔
NPY RTR <sub>2</sub> KO	↓	↓	↔	↓	↔	–	–	↓
IL-6 KO	↓	↑	↓	↔	↓	↓	↓	↓

*Tabulka 1 - přehled některých genetických modelů. Snížení exprese daného genu lze dosáhnout vyřazením genu (knock-out, KO) či vložením DNA komplementární k cílové DNA (antisense). Případně může být funkce genu zásahem do genomu snížena (decreas.). Dalšími možnostmi jsou zvýšení exprese (overex.) vložením dalších kopií genu. Tyto změny mohou být taky navozeny podmíněčně (Cond.). Vytvořeny mohou být také heterozygoti s jednou funkční a jednou nefunkční alelou genu (+/-). Význam značení: ↓: zmírnění či inhibice, ↑: zvýraznění či aktivace, ↔: není patrný efekt, –: nebylo testováno. Oč.: očekávané, poz.: pozorované, RTR: receptor. SERT, serotonin transporter; NET, norepinephrine transporter; DA-β-Hydroxyl., DA β-hydroxylase; MAOA, monoamine oxidase A; IL-6, Interleukin 6 (upraveno dle Urani et al., 2005).*

### 3.1.3. Modely založené na stresu

Existuje široká škála animálních modelů založená na expozici zvířete určité formě stresové situace. Tyto modely jsou založené na pozorování z klinické praxe, neboť

často dochází k rozvoji depresivní epizody právě na podkladě stresové události v životě pacienta (Kessler, 1997). Předmětem následujících stránek budou nejdůležitější, na stresu založené, modely depresivní poruchy.

### **3.1.3.1. Sociální porážka**

V případě sociální porážky je využito sociálního konfliktu mezi jedinci stejného živočišného druhu, při němž dochází ke vzniku emočního a psychologického stresu. V modelu sociální porážky je zvíře (vetřelec) umístěno do společného výběru s dominantním, agresivnějším zvířetem (rezident). Dominantní zvíře rychle pokoří vetřelce, přičemž následně dochází k fyzickému oddělení zvířat, je však zvolena takový druh separace, aby mohlo nadále docházet k nepřímému (optickému, čichovému, sluchovému) kontaktu mezi zvířaty. Rezident může být před umístěním vetřelce chován samostatně, popřípadě vetřelec může nahrazovat rezidentovu samici (Hollis & Kabbaj, 2014).

Delší vystavení tomuto sociálnímu stresoru vede k rozvoji podobných příznaků, které jsou k vidění u depresivních pacientů. Dochází ke snížení lokomoční a explorační aktivity, změnám v cirkadiánní rytmitiče či snížení příjmu potravy a s tím spojené tělesné váhy. Tyto změny jsou doprovázené neurochemickými změnami v mozku, zahrnujícími transmise serotoninu, katecholaminů i neuropeptidů, přítomné je také zvětšení adrenálních žláz (Huhman, 2006). V případě měření míry anhedonie testem preference cukerného roztoku a míry zoufalství pomocí testu nuceného plavání je patrná zvýšená míra těchto symptomů (Rygula et al., 2005), tyto parametry však nejsou měřeny konzistentně mezi jednotlivými pracemi (Hollis et al., 2010), což lze přičítat odlišnému experimentálnímu protokolu, ale možná také problematice těchto testů. Co se týče reakce na antidepressivní léčbu, behaviorální deficit může být upraven léčbou SSRI (Rygula et al., 2006). Mnohými autory je tomuto modelu přičítána dobrá fenomenologická, etiologická, konstruktivní i prediktivní validita (Huhman, 2006).

### **3.1.3.2. Naučená bezmocnost**

Protokol naučené bezmocnosti (*learned helplessness*) byl vyvíjen a zkoušen již od druhé poloviny 20. století na psech. V tomto protokolu je zvíře prvně vystaveno nepředvídatelným elektrickým *stimuli* bez možnosti jejich kontroly. Později má zvíře

možnost nepříjemnému *stimuli* uniknout provedením specifického úkonu, například stisknutím páčky, zvíře se o to však již ani nepokouší (Overmier & Seligman, 1967). Takto vytvořený animální model se projevuje sníženou lokomoční aktivitou, sníženou motivací a agresí, ztrátou apetitu a úbytkem na váze (Willner, 1984). Antidepresivní léčba by měla vylepšit tyto projevy a také zlepšit výkon zvířete v počtu úniků averzivnímu *stimuli*, tento efekt je pozorován při administraci TCA (Takamori et al., 2001), SSRI (Malberg & Duman, 2003) i agomelatinu (Bertaina-Anglade et al., 2006).

U tohoto modelu je důležité správné experimentální nastavení. V případě, že jsou *stimuli* aplikovány do končetin, zvíře může vyvinout adaptivní chování, jímž se bude aplikaci *stimuli* vyhýbat. Toto je řešitelné administrací *stimuli* do ocásku (Drugan et al., 1997). Mohou se také vyskytnout jedinci, u nichž míra úniku averzivnímu *stimuli* naznačuje rozvoj naučené bezmocnosti, ve skutečnosti se však může jednat o zhoršenou schopnost učení, kdy se experimentální zvíře není schopné naučit úlohu. Výsledky se také liší mezi jednotlivými kmeny potkanů (Drugan et al., 1997). Je důležité také zvolit správnou velikost boxů, zamezující pasivnímu unikání nepříjemnému *stimuli* i správnou intenzitu a délku elektrického *stimuli* (Vollmayr & Henn, 2001). Je odhadováno, že 30% experimentálních zvířat vystavených tomuto protokolu bude vykazovat naučenou bezmocnost (Chourbaji et al., 2005), důležitost je přikládána i různému prahu bolesti u individuálních zvířat. Ačkoliv tomu tak není u všech autorů (Willner, 1984), z velké části je tento model oceňován pro fenomenologickou, konstruktivní i prediktivní validitu (Czéh et al., 2015).

### **3.1.3.3. Chronický mírný stres**

Protokol chronického mírného stresu (*chronic mild stress*, CMS) byl použit poprvé v roce 1981. Potkani byli vystavováni sérii stresorů po dobu tří týdnů. Stresory byly různého charakteru a v různém pořadí. Potkani byli vystaveni potravní deprivaci, teplotnímu stresu, změně spolubydlícího potkana či obrácení světelného režimu. Zvířata byla poté vystavena elektrokonvulzivní terapii (Katz, 1981). V pozdějším experimentu byla zvířata vystavena sérii mírných stresorů po dobu pěti až devíti týdnů (Willner et al., 1987). Rozvinutý model CMS se projevuje sníženou sexuální a explorativní odpovědí, úbytkem na váze, rozrušeným spánkovým režimem, sníženou



lokomoční aktivitou a obecně zvýšenou anhedonií reprezentovanou sníženým motivačním chováním (Willner, 1997). Tyto deficity mohou být upraveny léčbou SSRI, atypickými antidepresivy (Mutlu et al., 2012), TCA (Monleon et al., 1995) i MAOI (Willner, 1984).

Míra anhedonie u tohoto modelu byla často stanovována pomocí testu preference cukerného roztoku, přičemž preference cukerného roztoku byla snižena u rozvinutého modelu (Ayensu et al., 1995). Tento způsob měření míry anhedonie byl kritizován některými autory a dáván spíše do spojitosti s potravní deprivací, která je součástí protokolu CMS (Forbes et al., 1996), tato domněnka však nebyla spolehlivě potvrzena (Willner, 1997).

Tento model je spojován s dobrou fenomenologickou, konstruktivní i prediktivní validitou (Willner, 1997), je však nutno vzít v potaz, že tvorba tohoto modelu je časově náročná a komplexní a špatně reprodukovatelná mezi jednotlivými laboratořemi (Porsolt, 2000).

#### **3.1.3.4. Maternální deprivace**

Již v první kapitole byla ukázána spojitost brzkého traumatu s vyšší pravděpodobností rozvoje depresivní poruchy v pozdějším věku (Heim et al., 2008). Toto spojení je patrné i u zvířecích modelů a bylo zevrubně pozorováno a popsáno před více než 50 lety (McKinney & Bunney, 1969) a je na něm postaven model maternální deprivace, základní z tzv. *early life models* (modely brzkého věku). Tento model spočívá v oddělení mláděte od matky v raném věku, což u mláděte vede v prvotní fázi k agitaci, nespavosti a hledáním matky, postupně ovšem aktivita zvířete upadá, dojde také k poklesu apetitu, sociálních interakcí a k rozvoji celkové „skleslosti“ mláděte, přičemž po návratu k matce dochází k normalizaci chování, ne ovšem u všech mláďat (McKinney & Bunney, 1969).

Maternální deprivace vede k neurochemickým a neuroendokrinním změnám v oblasti HPA osy (Rice et al., 2008) i redukci velikosti hipokampu v dospělosti zvířete (Naninck et al., 2015), přičemž léčba SSRI tlumí následky tohoto zásahu (El Khoury et al., 2006).

Maternální deprivace je hodnocená jako model s konstruktivní a prediktivní validitou (Vetulani, 2013). V případě maternální deprivace je ovšem důležitá volba správného kmene a také správného experimentálního protokolu, přičemž používaných protokolů je široká škála (Schmidt et al., 2011). K vidění jsou nekonzistentní výsledky této manipulace mezi jednotlivými laboratořemi, což je pravděpodobně možné dát za vinu především rozdílným protokolům na různých pracovištích (Lehmann & Feldon, 2000).

### **3.1.4. Modely získané farmakologickou či chirurgickou manipulací**

#### **3.1.4.1. Olfaktorická bulbektomie**

Olfaktorická bulbektomie (OBX) je zákrok, při němž jsou odebrány čichové bulby. První práce, která naznačuje možnost využití bulbektomizovaného potkana k testování antidepresivního účinku vybraných látek, vyšla v roce 1976 (van Riezen et al., 1976). Čichové bulby hrají u potkana důležitou roli nejen v příjmu čichových podnětů, ale disponují také četnými eferentními spojeními s mezokortikálními i subkortikálními oblastmi a buňky jsou v kontaktu i s posteriorním pyriformním kortexem či amygdalou, dá se tedy očekávat, že jejich odebrání povede k extenzivním změnám v nervových okruzích. Změny po olfaktorické bulbektomii jsou rázu imunologického, endokrinního, postiženy jsou také neurotransmitterové systémy noradrenalinové, serotoninové, glutamátergní, ale i cholinergní.

Co se týče změn behaviorálních, bulbektomizovaná zvířata více explorují v testu otevřeného pole, přičemž tato explorace nesouvisí s anosmií jako takovou, neboť podobné chování není patrné v případě ztráty čichu navozené zásahem periferním. Potkani také vykazují vyšší noční aktivitu, přítomny jsou také deficity v prostorovém učení (Song & Leonard, 2005). S přihlédnutím na fenotypový projev tohoto zákroku, je obtížné srovnávat přítomnou symptomatologii s tou patrnou u depresivního pacienta. Model neoplývá fenomenologickou validitou (Willner & Mitchell, 2002). Nicméně, pozorovaný deficit chování je možné upravit léčbou SSRI (Hasegawa et al., 2005; Roche et al., 2007), TCA (Kelly & Leonard, 1996), ale i agomelatinem (Norman et al., 2012). Lze tak říci, že tento model má dobrou prediktivní validitu. Zajímavé je také pozorování, že preference cukerného roztoku, jeden z testů používaných k určení míry anhedonie, byla snižena

u bulbektomizovaných samic, ne ovšem samců. Olfaktorická bulbektomie by tak mohla být jeden z animálních modelů depresivní poruchy s rozdílnou manifestací v závislosti na pohlaví (Stock et al., 2000).

#### **3.1.4.2. Aplikace reserpinu**

Aplikaci reserpinu lze bezpochyby řadit k nejznámějším farmakologicky navozeným animálním modelům depresivní poruchy. Reserpin je látka antihypertenzního charakteru, která způsobuje úplnou depleci monoaminů ze synapse, což vede k rozvoji anhedonických příznaků, snížené teplotě i snížené lokomoci u zvířete (Schildkraut, 1965). Podobný dysforický efekt je pozorován i u pacientů, kterým byl podán reserpin, je zde tedy jistý předpoklad, že navozený stav u zvířete a pacienta má podobný podklad (Bein, 1978).

Efekt aplikace reserpinu může být eliminován podáním TCA i MAOi a Willner přičítá tomuto modelu validitu prediktivní i fenomenologickou s určitou limitací falešně negativních výsledků v případě novelních antidepresiv (Willner, 1984). Aplikace reserpinu jako animální model depresivní poruchy není zcela podporován novějšími pracemi, které si kladou otázku, zda je skutečně modelována depresivní porucha, či je pozorovaný jev pouze akutním projevem poklesu nálady (O'Neil & Moore, 2003). Byla vyslovena i myšlenka, zda aplikace reserpinu lépe nemodeluje depresivní poruchu spjatou s Parkinsonovou chorobou (Skalisz, 2002).

### **3.2. Testy používané ve vývoji antidepresiv**

V literatuře není vždy jednoznačně určen rozdíl mezi modelem depresivní poruchy a testem určeným ke stanovení potenciálního antidepresivního účinku dané látky. Obecně lze však říci, že model zahrnuje jak nezávislou proměnnou danou prvotní manipulací, tak závislou proměnnou danou určitou behaviorální či neurochemickou změnou, kterou je možné měřit či sledovat. Test oproti tomu sestává pouze ze sledování určité behaviorální či neurochemické změny (Slattery & Cryan, 2014). Následující kapitola bude věnována testům, jež jsou široce využívány k měření potenciálního antidepresivního účinku zkoumané látky.

### 3.2.1. Test nuceného plavání

Test nuceného plavání (*forced swimming test*, FST), nebo také Porsoltův test, je jedním z nejrozšířenějších testů ke stanovení možného antidepresivního účinku skrze změnu imobility u zvířete. Tento test byl vyvinut Porsoltem et al. v roce 1977. Test je založen na pozorování, že potkan nebo myš, pokud je nucen plavat bez možnosti úniku, po chvíli zvýšené aktivity přechází do stavu imobility, kdy vykonává pouze pohyby nutné k udržení se nad vodou. Autoři přisuzují tento fenotyp tzv. *behavioral despair* (zoufalství podobné chování) a tuto hypotézu podporují tím, že imobilita je snížena látkami se známým antidepresivním účinkem, popřípadě elektrokonvulzivní léčbou (Porsolt et al., 1977).

Willner přisoudil tomuto testu jistou míru fenomenologické, konstruktivní i prediktivní validity (Willner, 1984). FST má dobrou validitu pro TCA, MAOi i SSRI, přičemž dávka použitá v testu koreluje s dávkou klinicky používanou (Kulkarni & Dhir, 2007). SSRI původně vykazovaly falešně negativní výsledky ve FST, úprava metody a volba jiného způsobu vyhodnocení sledovaných parametrů ovšem zvýšily citlivost FST k této skupině látek (Lucki, 1997). FST patrně nereaguje na atypická antidepresiva (Kulkarni & Dhir, 2007).

Validita FST bývá zpochybňována. V případě FST je často sledován efekt jednorázové dávky administrované 30 minut před zahájením testu, přičemž v klinické praxi je často antidepresivní efekt zaznamenán až po několika týdnech. Nutno ovšem podotknout, že i chronické aplikace FST potvrzují antidepresivní účinek s nárůstem efektu, odpovídajícímu dlouhodobé aplikaci (Detke et al., 1997). Problematický je také falešně pozitivní výsledek tohoto testu, spojený s látkami způsobujícími hyperlokomoci, v takovém případě je třeba prověřit zvíře v dalším testu měřícím lokomoční aktivitu (Cryan, et al., 2002). Bývá také namítáno, zda imobilita pozorovaná ve FST je skutečně projev bezmocnosti, nebo zda se ve skutečnosti nejedná o vliv hypotermie či mechanismus úspory energie (West, 1990). Pozorovaný efekt může být také ovlivněn volbou kmene myši, vzhledem k různé citlivosti vůči podané látce (David et al., 2003). Experimentální nastavení, včetně rozměrů použitého válce, teploty vody, způsobu vyhodnocení může mít také efekt na validitu tohoto testu u různých skupin antidepresiv (Cryan et al., 2005b). Navzdory těmto pochybnostem

se tento test těší oblibě, vzhledem ke své snadné proveditelnosti a reprodukovatelnosti mezi různými laboratoři.

### 3.2.2. Test zavěšeného ocasu

Tento test (*tail suspension test*, TST) měří dobu agitace a imobility, přičemž imobilita je vykládána jako pasivní vyrovnávání se se stresem, zoufalství podobné chování, podobně jako v případě FST. Zvíře je páskou zavěšeno vzhůru nohama za ocásek bez možnosti úniku z této nepohodlné pozice po dobu šesti minut a střídají se u něj periody, kdy se snaží ze zavěšení vymanit a periody, kdy pouze pasivně visí. V testu se měří doba, kdy je zvíře imobilní a pasivně visí a poté ovlivnění této doby různými farmaky (Cryan et al., 2005a).

Prediktivní validita tohoto testu je dobrá v případě antidepresiv ovlivňujících monoaminergní transmissi (Berrocoso et al., 2013), ale není citlivá k atypickým antidepresivům, podobně jako FST (Kulkarni & Dhir, 2007).

TST je přičítána stejná validita jako FST, ale také čelí podobné kritice. I v případě TST je běžně používána akutní aplikace antidepresiva 30 minut před zahájením testu, přičemž chronická aplikace, na rozdíl od FST, patrně nemá vliv na imobilitu (Steru et al., 1985). Také účinná dávka nekoreluje s dávkou použitou v klinické praxi a i tento test je zatížen falešně pozitivními výsledky (Cryan et al., 2005a). V případě TST je také důležité zhodnotit volbu vhodného kmene myši, kdy různé kmeny vykazují různou citlivost v TST (Ripoll et al., 2003). Kmen C57BL/6 je k tomuto testu nevhodný a v testu vykazuje falešně negativní výsledky (Mayorga & Lucki, 2001). Výhodou tohoto testu v porovnání s FST může být jiná metodologie, kdy zvíře není ponořeno do vody, čímž je odstraněn možný efekt hypotermie na sledovanou imobilitu (Steru et al., 1985).

Závěrem by bylo vhodné dodat, že navzdory podobnostem v TST a FST se zdá, že mechanismus ovlivnění míry imobility je u těchto testů rozdílný. I v případě aplikace stejných antidepresiv ve stejných dávkách u stejných kmenů myši se liší hladiny různých neurotransmiterů v mozku pokusných zvířat (Renard et al., 2003).

### **3.2.3. Intrakraniální autostimulace a preference cukerného roztoku**

Dalším často sledovaným parametrem ve výzkumu depresivní poruchy je míra anhedonie. Anhedonie je klíčovým symptomem, patrným u pacientů a modelovatelným u zvířat například již dříve zmíněným chronickým mírným stresem (Forbes et al., 1996). Test, který umožňuje stanovení míry anhedonie, je test intrakraniální autostimulace (*intracranial self stimulation*). Tento test vychází z pokusu, kdy byly potkanům implantovány elektrody do určitých částí mozku. Potkani pak byli umístěni do Skinnerových boxů a měli možnost stimulovat vybrané mozkové oblasti stiskem páčky. Potkani tak činili frekventovaně, čímž bylo ukázáno, že existují oblasti mozku, kde má elektrická stimulace charakter odměny (Olds & Milner, 1954).

Pokles frekvence autostimulace je interpretována jako přítomnost anhedonie u pokusného zvířete (Vogel et al., 1990) a zvýšení autostimulace může být dosaženo antidepressivní léčbou (Moreau et al., 1992). Ačkoliv Willner přisuzuje tomuto testu fenomenologickou, prediktivní, i konstruktivní validitu (Willner, 1984), intrakraniální autostimulace také čelí rozdílným výsledkům v závislosti na různých faktorech. Patrná je interindividuální variabilita a také závislost výsledků na volbě kmene (Kurre Nielsen et al., 2000).

Obdobně preference cukerného roztoku je testem stanovujícím míru anhedonie u animálního modelu depresivní poruchy. Test vychází ze skutečnosti, že hlodavci preferují v případě dostupnosti sladký cukerný roztok ve srovnání s jinými tekutinami. Pokles této preference je hodnocen jako rozvoj anhedonie a tento deficit by měl být opět upraven antidepressivní léčbou (Willner et al., 1987). V případě preference cukerného roztoku, jakožto testu míry anhedonie, jsou přítomné různé výsledky mezi laboratořemi i jednotlivými kmeny pokusných zvířat, validita tohoto testu tedy bývá zpochybňována (Forbes et al., 1996; Kurre Nielsen et al., 2000; Matthews et al., 1995).

### **3.2.4. Test otevřeného pole**

Na závěr by bylo vhodné krátce zmínit test otevřeného pole, protože se jedná o široce používaný behaviorální test, nejen ve výzkumu depresivní poruchy. Byl poprvé vyvinut Hallem et al. v roce 1932 (Hall & Ballachey, 1932). Test sestává z arény ohraničené stěnami, přičemž se mnohdy liší rozměr i tvar arény, osvětlení,

objekty v aréně, ale i doba umístění zvířete do arény. Měří se parametry jako panáčkování, čištění, pohyb zvířete po aréně, vstup do jednotlivých sektorů arény. Test se používá ke stanovování lokomočního a anxiolytického účinku vybraných látek, ale i emocionality zvířat. Test je velmi oblíbený pro svojí jednoduchost, rychlé měření široké škály vybraných parametrů i citlivost k širokému spektru farmakologických zásahů (Valvassori et al., 2013).

### **3.3. Limitace metod využívaných v experimentálním výzkumu**

Nedostatečnost momentálně dostupné antidepresivní léčby si žádá nejen vývoje nových antidepresiv, ale také nových experimentálních přístupů, animálních modelů a testů antidepresivního účinku, které by napomáhaly efektivně a spolehlivě určovat potenciální antidepresivní účinek vyvíjených látek. Zároveň by měly být tyto metody snadno proveditelné a jednotlivé proměnné snadno měřitelné.

Momentálně dostupné modely či testy splňují některá, ale nikdy ne všechna kritéria, která jsou na ně kladena (McKinney & Bunney, 1969; Willner, 1984), což není překvapením, vezme-li se v úvahu heterogenita sledovaného onemocnění.

Modely, jako je naučená bezmocnost, chronický mírný stres a sociální porážka, splňují mnoho kritérií kladených na validitu animálního modelu, jsou však náročné na provedení a reprodukovatelnost výsledků mezi jednotlivými laboratořemi, neboť do produkce tohoto modelu je zapojeno mnoho proměnných (Porsolt, 2000). Olfaktorická bulbektomie sice splňuje méně kritérií kladených na validitu animálních modelů, přesto se jedná o model zajímavý a skýtající jisté možnosti, jako je například rozdílná reakce na antidepresivní léčbu v závislosti na pohlaví. Genetické modely depresivní poruchy byly v minulosti limitovány technologicky, v této oblasti ovšem dochází k rychlému pokroku (Sidor, 2012).

Vytvoření ideálního animálního modelu je komplikováno mnohými faktory. Depresivní porucha je komplexní stav s velkou diverzitou projevů, přičemž některé projevy není prakticky možné modelovat. Dostupné modely se soustředí na určité projevy chování, které jsou do jisté míry měřitelné a tento přístup má sice svoje nedostatky, ale také je to momentálně jediný možný prostředek napomáhající odhalení etiologie depresivní poruchy. Bohužel ne vždy mohou být získané poznatky, vzhledem k určitému zjednodušení u animálních modelů, aplikovány v klinické praxi

(Slattery & Cryan, 2014). Nutno také říci, že většina dostupných animálních modelů byla vyvinuta před desítkami let a postavena na účinku monoaminergních antidepresiv. S implikací nových systémů a vývojem antidepresiv s jiným mechanismem účinku dochází ke zpochybňování modelů založených na této teorii a jejich citlivosti k těmto antidepresivům (Berton et al., 2012).

Testy antidepresivního účinku různých látek se těší rozpolceným názorům v dostupné literatuře. Jak je patrné z předchozích stránek, mnohým testům je vyčítáno mnoho nedostatků, jako je jejich rozdílná citlivost u různých kmenů zvířat, přítomnost falešně negativních i falešně pozitivních výsledků a také citlivost výsledků k experimentálnímu protokolu. Intrakraniální autostimulace je příkladem testu, jež splňuje vícero kritérií validity (Willner, 1984), je ovšem metodologicky náročnější vzhledem k nutnosti operativního zásahu. V testech, jako je FST a TST jsou většinou zdravá zvířata vystavena nepřírozené situaci, kdy je měřena akutní aplikace látky, která má ovšem často v klinické praxi účinek až po několika týdnech. V mnoha případech také chybí informace o hladině těchto látek v mozku a krvi, což ztěžuje interpretaci sledovaného efektu. Momentálně dostupné modely a testy také často opomíjejí sledování kognitivních funkcí, které jsou také v depresivní poruše narušeny.

Přesto je zde patrný pokrok a s postupem technologie se otevírají nové možnosti modelování depresivní poruchy a testování antidepresivního účinku různých látek. Optogenetika může být mocným prostředkem v modelování různých poruch, vzhledem ke svému potenciálu imitovat různé situace ve vývoji neuronálních okruhů (Sidor, 2012). V kombinaci s vlivem prostředí by pak mohlo být možné modelovat validní animální modely depresivní poruchy. Limitací tohoto přístupu je ovšem nedostatečná znalost etiologie depresivní poruchy, kterou by bylo možné modelovat. Také kombinace náročné metodologie ve snaze navodit interakci gen vs. prostředí může vést k vysoké heterogenitě výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. Dále je nutné dodat, že ve výsledku jsou sledované prvky chování často měřeny krátkodobě, což se v případě chronického onemocnění, jímž depresivní choroba každopádně je, nezdá jako nejlepší experimentální přístup. Dlouhodobé měření požadovaného prvku chování je ovšem spojeno s nárůstem náročnosti a proveditelnosti měření, což ztěžuje interpretaci získaných dat a zvyšuje riziko heterogenity mezi jednotlivými laboratořemi.



Jako varianta k momentálně využívaným testům antidepresivního účinku u animálních modelů depresivní poruchy se nabízí automatizované monitorování chování, kdy by bylo prováděno dlouhodobé sledování zvolených parametrů u experimentálních zvířat. V dnešní době jsou již dostupné systémy a software, umožňující automatické sledování zvířete ve zvoleném prostředí a dochází k vývoji a vylepšování těchto technologií. Tento metodologický přístup umožňuje sledování různých parametrů, jakými mohou být cirkadiánní cykly, pohybová aktivita, režim spánku a bdění, příjem potravy a tekutin či interakce s ostatními zvířaty. Výstupem mohou být komplexní data s možností měření a sledování velké škály proměnných, což by ve svém důsledku mohlo vést k získání nových, zajímavých poznatků o depresivní poruše (Castelhano-Carlos & Costa, 2014).

## 4. Cíle práce

S ohledem na limitace momentálně používaných metod ve výzkumu depresivní poruchy je snahou zavést nové metody s lepší proveditelností a interpretací. Cílem této práce bylo zavést nové metodologické přístupy v laboratoři Neurofyziologie paměti, konkrétně automatizované monitorování chování u modelu depresivní poruchy a také v testu antidepresivního účinku vybrané látky. Zvolenou látkou byl ketamin, podaný v různých dávkách. Pro analýzu behaviorálních dat byl použit software Ethovision XT v kombinaci s hardware od společnosti Noldus. Vyjma toho bylo cílem zhodnotit vliv ketaminu na hladinu fosforylovaného mTOR v mozковém homogenátu. Byly navrženy celkem tři experimenty, které by měly mít žádaný výstup. Konkrétní cíle jednotlivých experimentů byly:

1. Zhodnotit antidepresivní účinek ketaminu v testu nuceného plavání pomocí analýzy behaviorálních dat skrze Ethovision XT software (Experiment 1),
2. Stanovit hladinu fosforylovaného mTOR v mozковém homogenátu (Experiment 2),
3. Zavést fenotypizační boxy jako novou metodu určenou k automatizovanému monitorování chování v modelu olfaktorické bulbektomie a ověřit, zda má aplikace ketaminu antidepresivní účinek (Experiment 3).

## 5. Materiál a metody

### 5.1. Použitá zvířata

V experimentu 1 byli použiti samci dospělé myši kmene ICR (30-38 g, stáří 2 měsíce, původ Anlab, s.r.o., Praha, Česká Republika). Myši byly dodány 7 dní před začátkem experimentu a chovány byly průhledných plastových boxech o rozměrech 36 x 20 x 15 cm v počtu 5 myši na 1 box. Chovné zařízení bylo klimatizované s 12 hodinovým světelným režimem (světla se zapínala ráno v 6:00) a přístup k potravě a vodě byl umožněn *ad libitum*. Experimenty vždy probíhaly ve světlé části dne.

V experimentu 2 byly použity levé mozkové hemisféry myši použitých v experimentu 1. Jednu hodinu po aplikaci vybrané látky byly myši usmrceny, mozek byl vyňat, rozebrán na levou a pravou hemisféru, pečlivě zvážen a zamražen při - 80°C.

V experimentu 3 byli použiti dospělí samci (350-450g, 3 měsíce) laboratorního potkana kmene Long-Evans. Potkani pocházeli z chovů Fyziologického ústavu Akademie věd. Zvířata byla chována v průhledných plastových boxech o rozměrech 40 x 30 x 25 cm, vždy v počtu 2 potkani na 1 box. Potkani byli chováni při 12 hodinovém světelném režimu (světla se zapínala ráno v 6:00). Zvířata měla volný přístup k potravě i vodě. Pokus probíhal dlouhodobě, přičemž začátek behaviorální části experimentu a aplikace látek probíhaly ve světlé části dne (v 12:00).

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

### 5.2. Použité přístroje a software

V experimentu 1 byly k testu nuceného plavání použity průhledné plastové válce o výšce 25 cm a průměru 13,5 cm. Hladina vody končila 5 cm pod okrajem válce a teplota vody byla 25°C. Test byl natáčen kamerou (Panasonic, WV-BP330 IGE), získaný záznam byl uchován pro pozdější analýzu. Vždy byly zároveň natáčeny 3 myši, jednotlivé válce byly od sebe odděleny černým plastovým rozdělovačem

o rozměrech 20 x 14 cm k zabránění vizuálního kontaktu mezi zvířaty. Pro analýzu testu nuceného plavání byl využit software Ethovision XT, verze 10.

V experimentu 2 byl pro homogenizaci vzorků využit skleněný i přístrojový homogenizátor (IKA, Ultra Turrax T25), výkyvná třepačka (Heidolph, Duomax 1030) a centrifuga (Hettich, mikro 220R). Při Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) stanovení byly používány jednokanálové pipety (Thermo Scientific, Finnpiquette™), repetitivní pipeta (Brand®, HandyStep® S), vortex (Scientific Industries, Genie K550-GE), třepačka (IKA, KS 130) a čtečka absorbance (BioTek Instruments, ELx808). Při stanovování absorbance ve vzorku byl použit software KC4, verze 3.

V experimentu 3 byl použit během odstranění čichových bulbů/sham operace stereotaktický aparát (č. 430005-GR-GP/K, TSE System) a mikrovrtáčka (Dremel). Pro následný experiment byly použity PhenoTyper observační boxy (PhenoTyper 4500, Noldus, obr. 4) v kombinaci se softwarem Ethovision XT, verze 10. Videozáznam z observačních boxů byl uchován pro pozdější analýzu. Pro následnou analýzu chování potkanů ve PhenoTyper boxech byl použit software Ethovision XT, verze 10.

### **5.3. Použité chemikálie a léčiva**

V experimentu 1 byl myším aplikován ketamin (Vétoquinol) v dávkách 3 mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg, popřípadě fyziologický roztok jako kontrola (B Braun).

Pro homogenizaci vzorků v experimentu 2 byl použit Ripa pufr (Sigma-Aldrich®), inhibitor fosfatáz (Sigma-Aldrich®), inhibitor proteáz (Sigma-Aldrich®) a metylalkohol (Penta). Pro stanovení hladiny fosforylovaného mTOR byl použit mTOR ELISA kit, jehož součástí byla 96 jamková destička s již přítomnou protilátkou proti mTOR fosforylovanému na pSer2448, 10X vymývací pufr, 10X blokující pufr, 10X mTOR primární protilátka, 10X HRP sekundární značení, TMP vyvolávající činidlo a stop činidlo (abcam®, ab168538).

V experimentu 3, při operaci odstranění čichových bulbů (popřípadě sham operaci) byly použity následující chemikálie a léčiva: Isofluran (č. B306, Abbott laboratories) k anestezii, 0.5 ml mesocaine (1%, Zentiva), Vidisic oční gel (Bausch + Lomb), lokální antibiotikum Framykoin (Zentiva) a analgetikum Nurofen

(Reckitt Benckiser). V průběhu behaviorální části experimentu byl potkanům aplikován buď ketamin (Vétoquinol) v dávce 10mg/kg, nebo fyziologický roztok (B Braun). Požadovaná koncentrace ketaminu v experimentech 1 a 3 byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml a zředěna ve fyziologickém roztoku (B Braun).

## **5.4. Metodické postupy**

### **5.4.1. Experiment 1**

Před zahájením experimentu bylo nejprve upraveno místo natáčení. Z důvodu nutnosti vytvořit co nejvyšší kontrast zvířete oproti pozadí byly válce umístěny na černou podložku a za válce byla umístěna černá látka. Bylo zvoleno bodové osvětlení směřované ke stropu, vytvářející osvětlení o intenzitě 28 luxů, což způsobilo rovnoměrné osvětlení prostoru natáčení a minimalizovalo tvorbu odlesků. Mezi jednotlivými natáčeními bylo nutné setřít kapky vody z povrchu podložky i válců, aby se zamezilo tvorbě odlesků.

Následně byly zváženy myši a na základě vážení byl určen příslušný objem ketaminu, popřípadě fyziologického roztoku jako kontroly, k aplikaci. Látka byla následně aplikována intraperitoneálně. 30 minut po aplikaci byl zahájen test nuceného plavání. Zvíře bylo umístěno do plastového válce s vodou a natáčeno po dobu 7 minut. Videozáznam byl uchován pro pozdější analýzu, následně byla zvířata usmrcena a mozkové hemisféry byly vyňaty a uchovány při -80°C pro účely dalšího experimentu.

Analyzována byla 2. - 6. minuta videozáznamu, vyjma parametru latence, jejíž určení probíhalo od začátku záznamu. Analýzy byly prováděné v programu Ethovision XT. Sledované parametry a jejich definice v rámci Ethovision XT jsou v tabulce 2.

Analýzy byly prováděné v programu Ethovision XT, příklad nastavení detekce je předmětem obrázku 5.

Název	Dle Ethovision XT	Měřená veličina
„immobility“	Imobilita. Změna méně než 15% pixelů mezi jednotlivými snímky.	Doba (s)
„not moving“	Stav, kdy se myš pohybuje rychlostí nižší než 1,75 cm/s.	Doba (s)
„distance moved“	Uplavaná vzdálenost	Vzdálenost (cm)
Latence	Doba od začátku záznamu po první stav imobility trvající déle než 4s (dle aktogramu)	Doba (s)

*Tabulka 2 – sledované parametry, jejich definice v rámci programu Ethovision XT a výsledná měřená veličina.*

#### **5.4.2. Experiment 2**

Prvně bylo třeba homogenizovat požadované hemisféry. Byly zvoleny levé hemisféry. Před zahájením homogenizace byly nejprve důkladně promyty pinzety a skleněné homogenizátory. Přístrojový homogenizátor byl promýván po dobu 15 minut studeným metylalkoholem. Poté byly z mrazáku vyňaty vzorky a umístěny na suchý led pro další zpracování. K extrakci vzorků byl zvolen Ripa pufr, který byl obohacen o 1ml inhibitorů proteáz a 1 ml inhibitorů fosfatáz na každých použitých 100 ml. Každý vzorek byl nejprve smíchán s 1 ml Ripa pufru a přemístěn do homogenizační zkumavky. Následně byl přidán další 1 ml Ripa pufru. Vzorek byl homogenizován po dobu 2 minut skleněným homogenizátorem. Poté byl homogenizován další 2 minuty homogenizátorem přístrojovým a následně byl vzorek umístěn na běžný led. Po homogenizaci všech vzorků byly vzorky umístěny na orbitální třepačku na dobu 2 hodiny při teplotě 4°C. Po uplynutí doby byly vzorky při teplotě 4°C a 12 000 otáčkách centrifugovány po dobu 20 minut. Poté bylo odebráno definované množství supernatantu, který byl zamražen opět při -80°C pro další použití. Mezi tvorbou homogenátu a vlastním stanovováním neuběhla doba delší než 1 týden.

Pro kvantitativní stanovení množství fosforylovaného mTOR byl použit ELISA kit od společnosti abcam®. Postup byl v souladu s návodem výrobce. Nejprve byla

připravena činidla v požadovaných koncentracích ze zásobních roztoků, které byly součástí kitu. 1X vymývací pufr byl připraven přidáním 40 ml 10X vymývacího pufru do 360 ml deionizované vody. 1X ředěný inkubační pufr byl připraven přidáním 4 ml 10X blokovacího pufru do 36 ml 1X vymývacího pufru, dále byl také přidán inhibitor proteáz a fosfatáz. 1X inkubační pufr byl připraven přidáním 2 ml 10X blokovacího pufru do 18 ml 1X vymývacího pufru. Následně byly rozmrazeny vzorky a naředěny 1:40 v 1X ředěném inkubačním pufru.

Součástí kitu byla 96 jamková destička s navázanou protilátkou proti fosforylovanému mTOR. Do každé jamky bylo napipetováno 50  $\mu$ l naředěného vzorku. Poté byla destička inkubována po dobu 2 hodin za pokojové teploty na třepačce při 400 otáčkách za minutu (rpm). Těsně před uplynutím této doby byla připravena 1X mTOR primární protilátka, zředěním 1:10 dodané 10X mTOR primární protilátky v 1X ředěném inkubačním pufru. Pro každých 8 jamek bylo připraveno 500  $\mu$ l detekční protilátky. Po uplynutí 2 hodin byly jamky třikrát promyty 300  $\mu$ l 1X vymývacím pufrům a po důkladném vymytí a vysušení bylo do každé jamky napipetováno 50  $\mu$ l 1X mTOR primární protilátky. Poté byla destička inkubována po dobu 1 hodiny za pokojové teploty na třepačce při 400rpm.

Před uplynutím 1 hodiny bylo připraveno 1X HRP sekundární značení. 1X HRP značení bylo připraveno zředěním 1:10 dodaného 10X HRP sekundárního značení v 1X inkubačním pufru. Pro každých 8 jamek bylo připraveno 500  $\mu$ l roztoku. Po uplynutí 1 hodiny byla destička třikrát promyta 300  $\mu$ l 1X vymývacího pufru a po důkladném vymytí a vysušení destičky bylo do každé jamky napipetováno 50  $\mu$ l 1X HRP značení. Destička byla opět inkubována po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě na třepačce při 400rpm. Po uplynutí této doby byla destička opět třikrát promyta 300  $\mu$ l 1X vymývacího pufru a jamky byly důkladně vysušeny. Následně bylo do každé jamky napipetováno 100  $\mu$ l TMP vyvolávacího roztoku, citlivého na světlo. Destička byla následně zakryta tmavou folií a inkubována po dobu 30 minut při pokojové teplotě na třepačce při 200rpm. Po uplynutí této doby bylo do každé jamky napipetováno 100  $\mu$ l stop roztoku a vzápětí byla změřena absorbance vzorků při 450nm. Změřené hodnoty absorbancí byly vztaženy k průměru naměřených absorbancí pro kontrolní myši, čímž byly získány výsledné hodnoty pro statistickou analýzu.

### 5.4.3. Experiment 3

Tři týdny před zahájením behaviorální části experimentu byla provedena operace za účelem odstranění čichových bulbů. Operace byla provedena postupem popsáním v práci Holubové et al. z roku 2016 (Holubova et al., 2016). Potkani byli uvedeni do anestezie za pomoci isofluranu v přípravné komoře (3% isofluran) a poté umístěni do stereotaktického aparátu. Úroveň isofluranové anestezie byla udržována na 2% během operace. Oči byly ošetřovány Vidisic očním gelem. Pro lokální anestezii před řezem bylo použito 0,5 ml mesocainu. Řez byl proveden do lebky nad čichovými bulby. Dvě 2 mm díry byly provedeny mikrovrtáčkou – 8 mm AP a  $\pm 2$ mm od bregmy. Čichové bulby byly odstraněny tupou podkožní jehlou spojenou s vodní pumpou (provedeno dle van der Stelt et al., 2005). Poté bylo zastaveno krvácení a řez byl zašit za použití absorbovatelného materiálu. Řezy byly ošetřeny lokálním antibiotikem. Kontrolní operace (sham) byly provedeny stejným postupem, nedošlo ovšem k odstranění čichových bulbů. Po operaci bylo intraperitoneálně aplikováno 2,5 ml sterilní vody a do pitné vody bylo přidáno analgetikum.

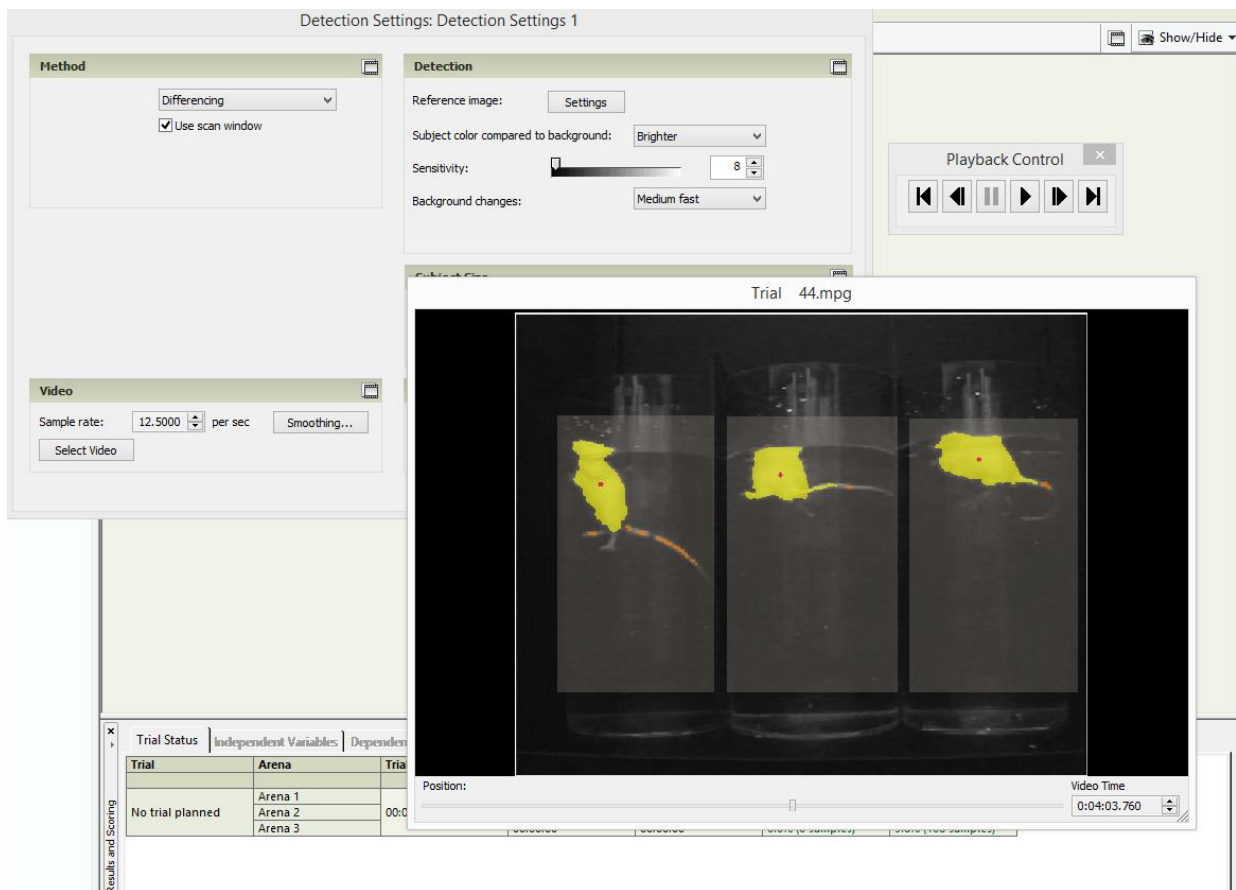
Behaviorální část experimentu byla zahájena 3 týdny po operaci. Potkani byli umístěni vždy po jednom zvířeti do jednoho boxu PhenoTyper. Měření sledovaných hodnot softwarem Ethovision XT bylo zahájeno v poledne (12:00). 24 hodin po umístění do boxů byl potkanům intraperitoneálně aplikován buď ketamin v dávce 10 mg/kg, nebo fyziologický roztok. Sledování zvířete softwarem pokračovalo nepřerušeně dalších 9 dní, celkem měření požadovaných parametrů probíhalo po dobu přesně 240 hodin.

Měřené parametry v průběhu experimentu byly uběhnutá vzdálenost, doba strávená v běhacím kolečku, doba strávená v domečku, frekvence návštěvy krmítka, počet otoček kolečka a vypité množství vody, přičemž tyto parametry byly hodnoceny ve zvolených časových úsecích – po 24 hodinách, po 6 hodinách a ve vybraných hodinách v průběhu dne: hodinu po poledni (12:00-13:00), hodinu po zhasnutí (18:00-19:00), hodinu po půlnoci (00:00-1:00) a hodinu po rozsvícení (6:00-7:00). Sledování zvířete i následná analýza byly prováděny pomocí softwaru Ethovision XT. Příklad nastavení zón pro měření sledovaných parametrů znázorňuje obrázek 6.

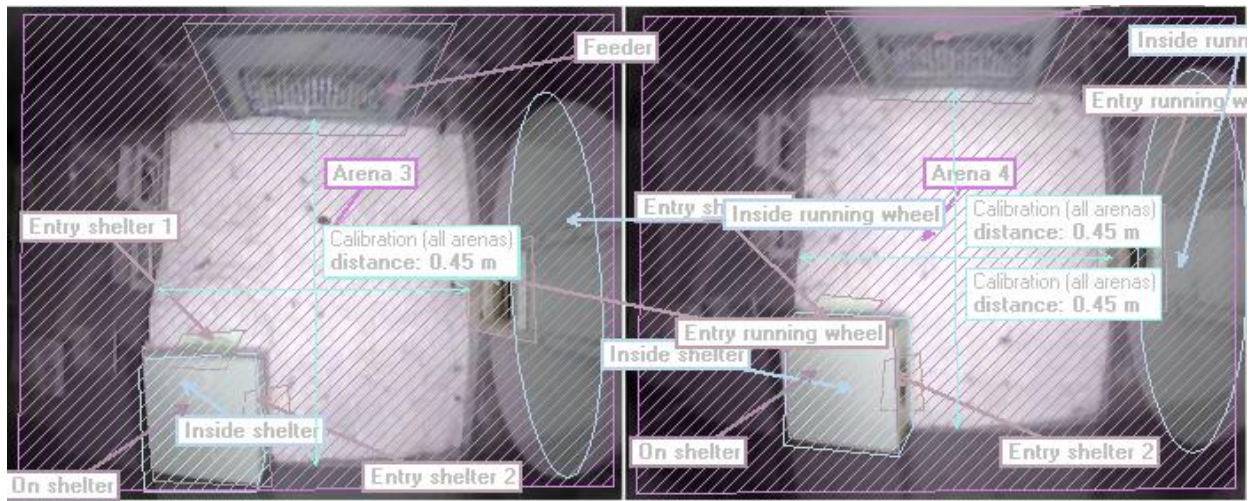




Obr. 4 - Phenotyper Box. Rozměry boxu jsou 45 x 45 x 55 cm, vyroben je z průhledného plastu. Aktivita zvířete byla snímána kamerou ve vrchním dílu (Phenotyper top unit, PT-T10.3/P, Noldus). Box je vybaven běhacím kolečkem o průměru 35,8 cm a šířce 9,5 cm (Activity Wheel, ENV-042-NP, Noldus), jehož aktivita je snímána sčítačem otáček (Phenocount, PTCN-0010, Noldus). Vyjma toho je box vybaven lahví na vodu o objemu 250 ml (objem vypité vody je měřen Lick-O-metrem, PTLM-0010). V boxu je úkryt pro zvíře o rozměru 14,5 x 14,5 x 12 cm. Vnitřní prostor boxu je přístupný skrze otvor, který je určen k zavěšení krmítka. Otvor má rozměry 17,5 x 11 cm. Obrázek je převzat z webových stránek společnosti Noldus (<http://www.noldus.com/PhenoTyper/activity-wheel>).



Obr. 5: Nastavení detekce v programu Ethovision XT. Detekované oblasti zvířete jsou označeny žlutou barvou, červený bod značí střed těla. Stínované obdélníky představují oblast arény, v níž je zvíře detekováno. Nastavuje se také počet snímků za vteřinu, nastavení probíhá dle použitého experimentálního zvířete. V případě myši bylo sledováno 12,5 snímků za vteřinu, v případě potkana je to 5 snímků za vteřinu. Byla zvolena metoda detekování „diferencing“, vhodná pro rychle se měnící prostředí.



Obr. 6: Fialové zóny jsou standardní zóny, kdy je měřena doba, kdy je zvíře detekováno v dané zóně (např. On shelter – na domečku). Žluté zóny jsou vstupní zóny (např. Entry shelter – vstup do domečku) do modrých zón, což jsou zóny skryté (např. Inside shelter – uvnitř domečku). Pokud je zvíře detekováno ve žluté (vstupní) zóně a následně není možné ho detekovat, program vyhodnotí, že je zvíře ve skryté zóně.

## 5.5. Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení všech experimentů bylo provedeno v programu GraphPad Prism, verze 5. Rozdíl byl považován za signifikantní při  $p < 0,05$ . Grafy zobrazují průměry a standardní chybu průměru (*standard error of the mean, SEM*). Spojnicové grafy nevyobrazují SEM z důvodu přehlednosti.

Jednocestná analýza rozptylu (*analysis of variance, ANOVA*) s následným Tukey Post hoc testem byla použita ke statistickému vyhodnocení dat z experimentu 1 a 2. Grubbsův test byl použit k určení odlehlých hodnot u experimentu 1, 2 a 3. U experimentu 1, 2 a 3 byl použit Kolmogorov-Smirnov test k ověření normality sledovaného souboru.

Ke statistickému vyhodnocení dat v experimentu 3 byla použita širší škála statistických testů. Pro analýzy parametrů hodnocených v rámci prvních 24 hodin byl použit t-test. V jednom případě, kdy neměla data normální rozložení, Mann-Whitney (neparametrický t-test) test byl použit ke statistické analýze. Jednocestná ANOVA s následným Tukey Post hoc testem byla použita ke statistickému vyhodnocení parametrů hodnocených v následujících 24 hodinách a také pro parametry naměřené

za celkovou dobu experimentu (celých 10 dní experimentu). Dvoucestná ANOVA s opakováním byla použita pro statistické vyhodnocení parametru hodnocených po vybraných časových úsecích (po jednotlivých dnech, po 6 hodinách a ve vybraných hodinách dne). Dvoucestná ANOVA s opakováním sloužila k určení signifikance změny mezi jednotlivými časovými úseky (*time*,  $p_T$ ), vlivu zákroku na průběh změny mezi jednotlivými časovými úseky (interakce,  $p_I$ ) a vlivu zákroku na rozdíl naměřených hodnot mezi jednotlivými skupinami (*column*,  $p_C$ ).

## 6. Výsledky

### 6.1. Experiment 1

V testu nuceného plavání bylo do každé skupiny zařazeno 10 zvířat (kontrolní skupina - NaCl, Ketamin 3 mg/kg, Ketamin 10 mg/kg, Ketamin 20 mg/kg). Celkem byla získána k analýze data ze 40 zvířat. V případě sledovaného parametru latence byla z výsledného souboru prvních dvou skupin (fyziologický roztok a ketamin 3mg/kg) vyloučena vždy jedna odlehlá hodnota, v případě tohoto parametru a těchto dvou skupin byla tedy k výsledné analýze použita data z 9 zvířat.

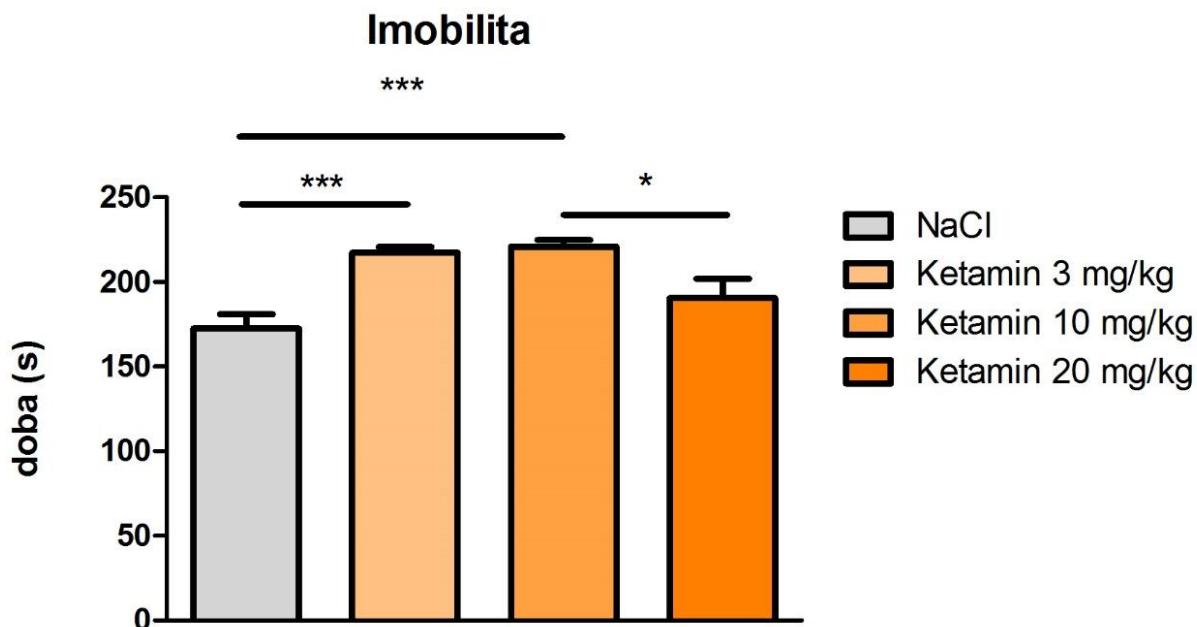
Imobilita myší, která by v testu nuceného plavání měla vyjadřovat *behavioral despair*, byla výrazně zvýšená ( $p = 0,0001$ ) oproti kontrole v případě aplikace ketaminu v dávce 3 mg/kg a 10 mg/kg. Dále je patrné signifikantní snížení imobility u aplikace ketaminu v dávce 20 mg/kg ve srovnání s aplikací ketaminu v dávce 10 mg/kg.

Po aplikaci ketaminu v dávce 3 mg/kg a 10 mg/kg došlo k signifikantnímu zvýšení ( $p = 0,0012$ ) doby, kdy myš přetrvávala ve stavu „not moving“, ve srovnání s kontrolou. Nebyla patrná změna v případě aplikace ketaminu v dávce 20 mg/kg oproti kontrole.

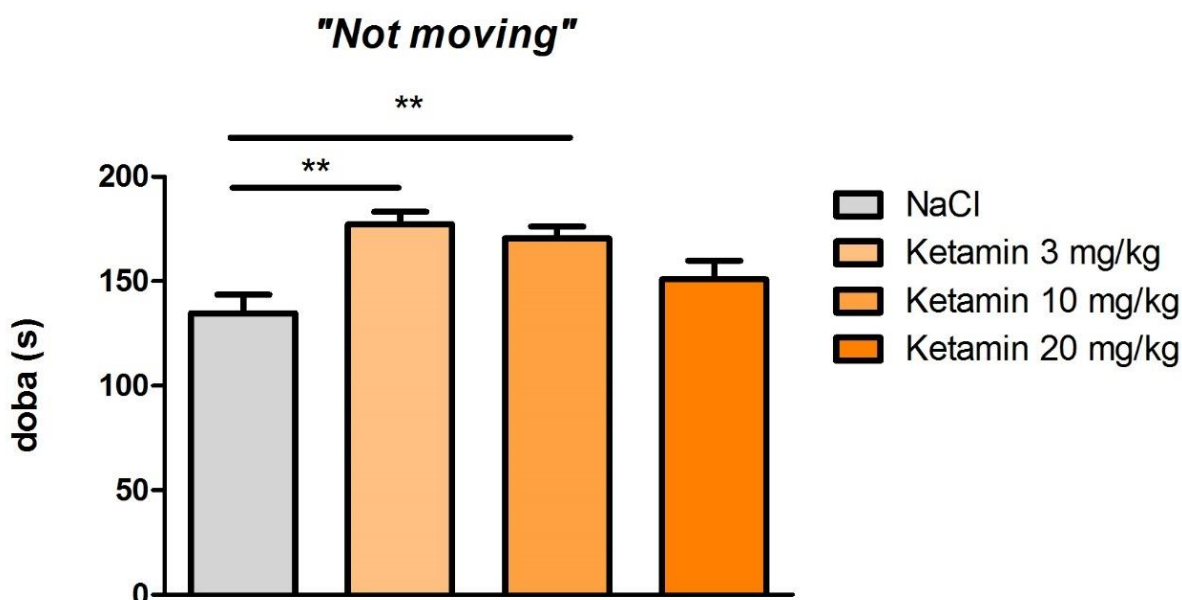
Celková uplavaná vzdálenost byla signifikantně snižena ( $p = 0,0150$ ) po aplikaci ketaminu v dávce 3mg/kg oproti kontrole. V ostatních dávkách nebyla patrná signifikantní změna uplavené vzdálenosti oproti kontrole.

Poslední sledovaný parametr byl latence. Latence byla signifikantně zvýšená ( $p = 0,0029$ ) po aplikaci ketaminu v dávce 20 mg/kg oproti kontrole i oproti aplikaci ketaminu v dávce 10 mg/kg.

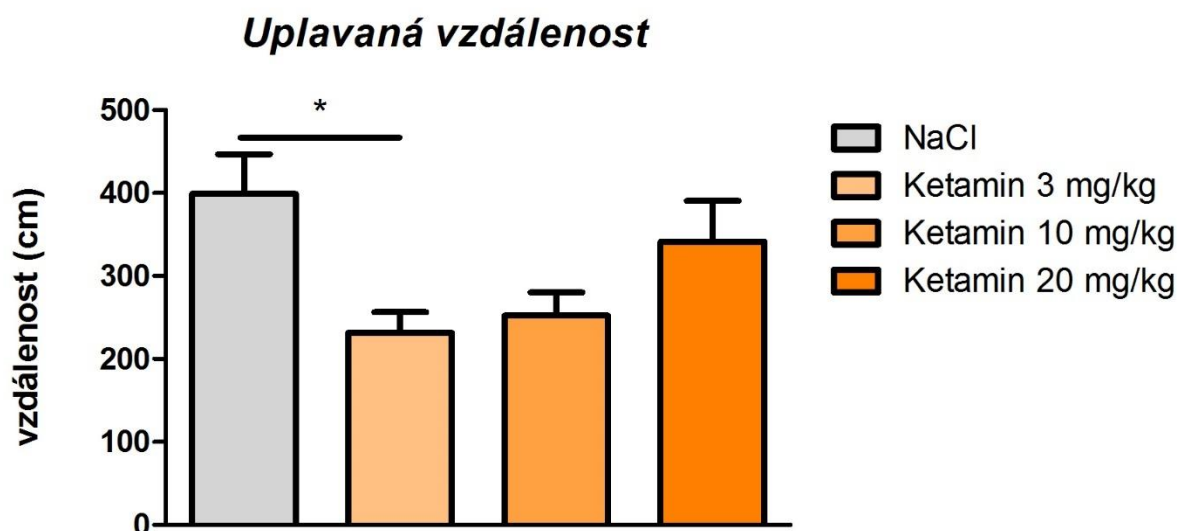
Grafy imobility, stavu „not moving“, uplavené vzdálenosti a doby latence jsou předmětem obrázku 7,8,9 a 10.



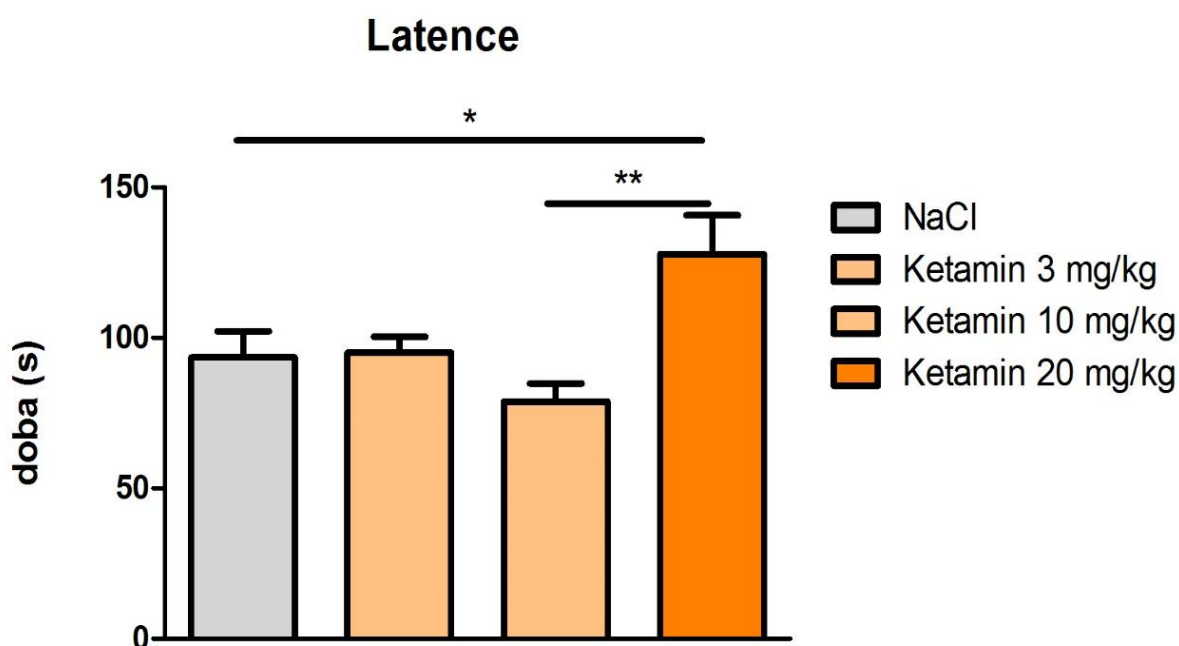
Obr. 7 – Imobilita v testu nuceného plavání. U myší došlo k signifikantnímu zvýšení imobility ( $p = 0,0001$ ) po aplikaci ketaminu v dávce 3 mg/kg, 10 mg/kg oproti kontrole a dále ketaminu v dávce 20 mg/kg oproti ketaminu v dávce 10 mg/kg. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ .



Obr. 8 – „not moving“ v testu nuceného plavání. Došlo k signifikantnímu zvýšení „not moving“ ( $p = 0,0012$ ) po aplikaci ketaminu v dávkách 3 mg/kg a 10 mg/kg ve srovnání s kontrolou. \*\* $p < 0,01$ .



Obr. 9 – Celková uplavaná vzdálenost. Ke snížení celkové uplavané vzdálenosti ( $p = 0,0150$ ) došlo po aplikaci ketaminu v dávce 3 mg/kg.  $*p < 0,05$ .

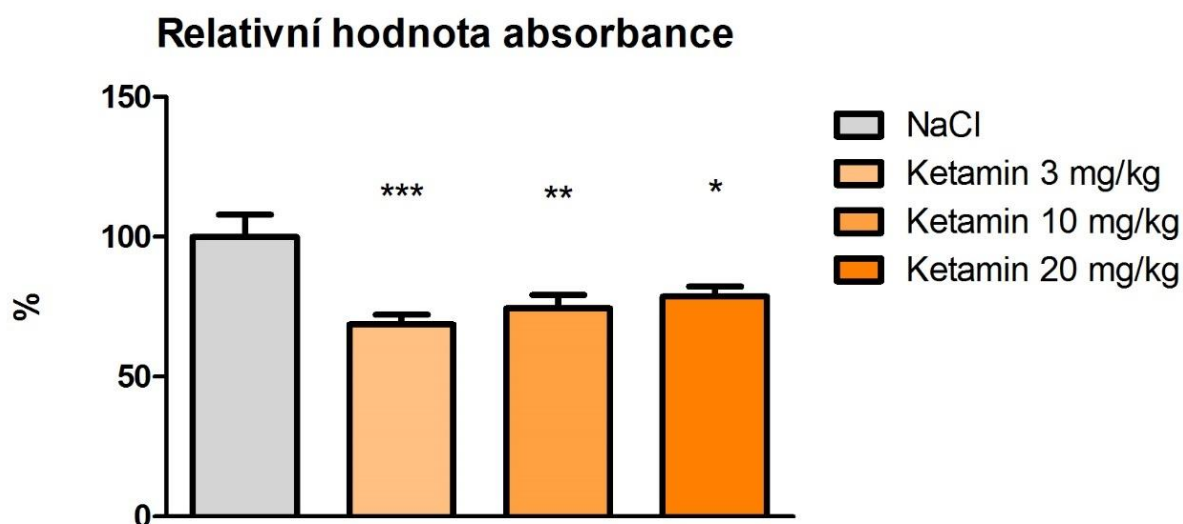


Obr. 10 – Latence. K signifikantnímu zvýšení latence ( $p = 0,0029$ ) došlo po podání ketaminu v dávce 20 mg/kg oproti ketaminu v dávce 10 mg/kg a kontrole.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .

## 6.2. Experiment 2

Ke stanovení změny hladiny fosforylovaného mTOR z mozkových homogenátů byly použity levé hemisféry myší z experimentu 1. Vzhledem k pilotnímu charakteru pokusu byly použity na každou skupinu hemisféry z prvních 8 zvířat. Celkem byla absorbance stanovována ve 32 vzorcích, přičemž od každého vzorku byl pipetován duplet.

Naměřená absorbance byla signifikantně snížena ( $p = 0,0007$ ) u myší po aplikaci ketaminu v dávkách 3 mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg ve srovnání s kontrolou. Graf je předmětem obrázku 11.



Obr. 11 – Absorbance vztažená k baseline (relativní hodnota absorbance) byla signifikantně snížena ( $p = 0,0007$ ) po aplikaci dávky 3 mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .



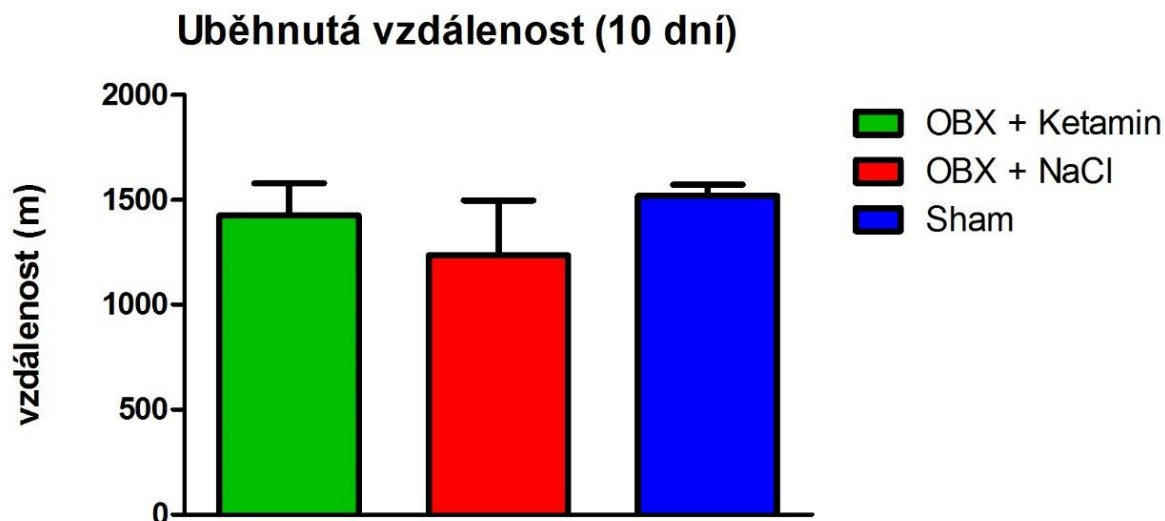
### 6.3. Experiment 3

Po třech týdnech po operaci byla do Phenotyper boxů umístěna pouze zvířata v dobrém zdravotním stavu bez výrazných obtíží. Celkem bylo do boxů umístěno 22 zvířat, z toho 13 OBX potkanů a 9 potkanů po sham operaci. Po skončení experimentu byla provedena extrakce mozků a kontrola lézí čichových bulbů. Potkani se zbytkovou tkání čichových bulbů byli z experimentu vyloučeni.

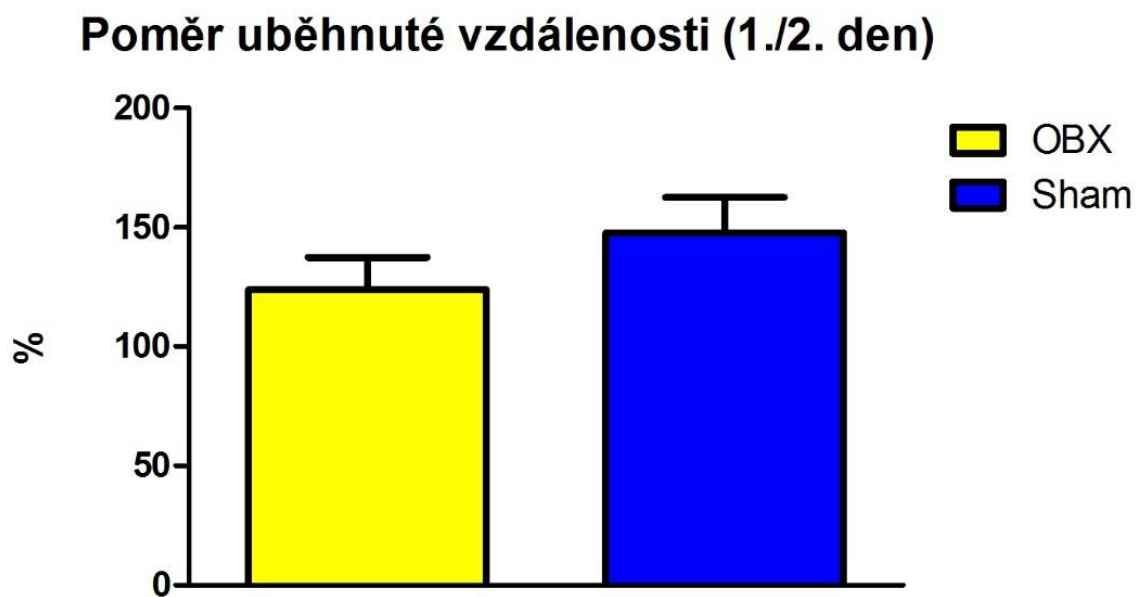
1 potkan byl z experimentu vyloučen z důvodu nepovedené operace. Data ze 4 potkanů byla ztracena z důvodu technických obtíží. K dispozici zbyla data ze 17 zvířat. V důsledku nízkého počtu potkanů v sham skupinách a pilotnímu charakteru experimentu došlo ke sloučení sham skupin v jednu skupinu pro následné analýzy. První den byla získaná behaviorální data porovnávána u dvou skupin dle zákroku, sham (n=5) a OBX (n=12). Od druhého dne došlo k rozdělení zvířat na tři skupiny dle zákroku a aplikované léčby: sham (n=5), OBX + aplikace ketaminu (v grafech označeno OBX + Ketamin, n=7), OBX + aplikace fyziologického roztoku (OBX + NaCl, n=5). Ze sledovaných parametrů nebyly hodnoceny počty otoček kolečka a množství vypité vody z důvodu technické závady na hardware, vylučující spolehlivost měřených hodnot. Konečné sledované parametry tedy byly celková uběhnutá vzdálenost, čas strávený v domečku, čas strávený v kolečku, počet vstupů do kolečka a frekvence návštěvy krmítka.

První hodnocený parametr je celková uběhnutá vzdálenost. Uběhnutá vzdálenost za celých 10 dní se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišila ( $p = 0,5557$ ), je však patrný jistý trend propadu celkové uběhnuté vzdálenosti u skupiny OBX potkanů bez léčby. Poměr celkově uběhnuté vzdálenosti za 1. a 2. den také není odlišný mezi skupinami ( $p = 0,3202$ ), zdá se ovšem, že poměr uběhnuté vzdálenosti je vyšší u kontrolních potkanů. V případě hodnocení parametru uběhnuté vzdálenosti po jednotlivých dnech je přítomná signifikantní změna naměřených hodnot v průběhu času ( $p_T < 0,0001$ ), není však patrný signifikantní vliv zákroku ( $p_I = 0,9767$ ,  $p_C = 0,5557$ ). Patrný je trend podobných uběhnutých vzdáleností u potkanů OBX po aplikaci ketaminu a potkanů kontrolních. Po šestém dni se však tyto skupiny oddělují. Výjimkou je první den, kdy je spíše patrná podobnost mezi skupinami OBX potkanů oproti skupině kontrolní.

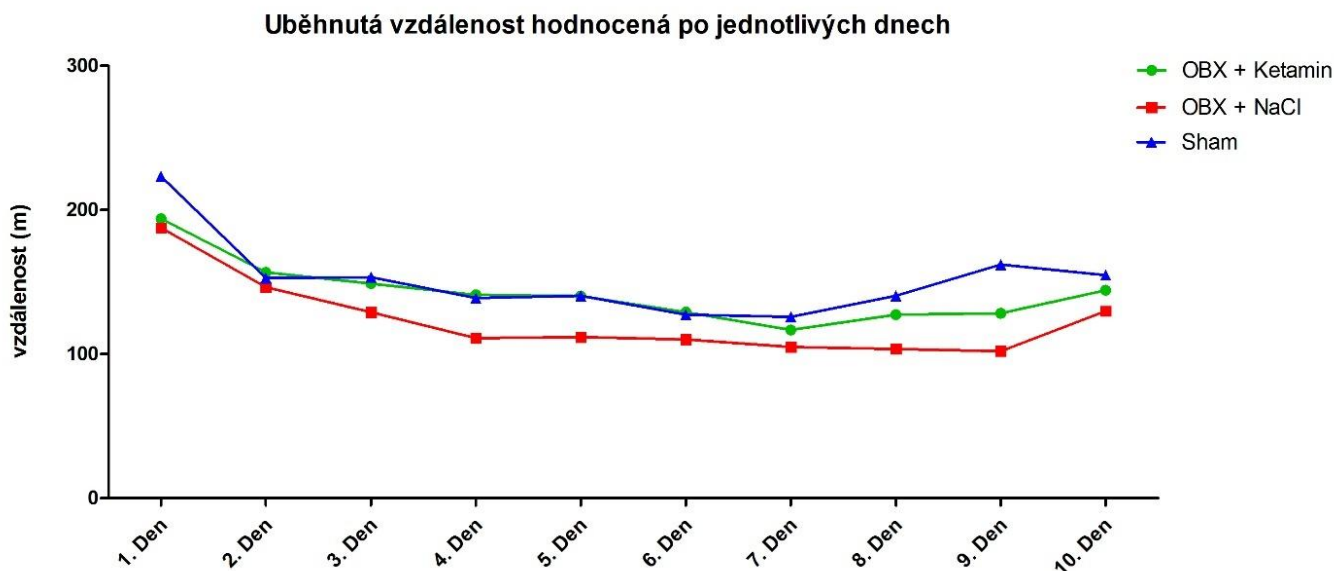
V případě hodnocení uběhnuté vzdálenosti za dobu experimentu po šestihodinových úsecích je patrný podobný trend. Opět je patrná signifikantní změna v průběhu času ( $p_T < 0,0001$ ), ale není přítomný signifikantní vliv zákroku ( $p_I = 0,6764$ ,  $p_C = 0,5557$ ). V případě tohoto grafu je patrná cirkadiánní aktivita zvířat. Celková uběhnutá vzdálenost byla sledována také ve vybraných časových úsecích, a to hodinu po poledni (12:00 – 13:00), hodinu po zhasnutí (18:00 – 19:00), hodinu po půlnoci (00:00 – 1:00) a hodinu po rozsvícení (6:00 – 7:00). První den je přítomen signifikantní rozdíl mezi vybranými časovými úseky ( $p_T = 0,0023$ ), vliv zákroku opět není signifikantní ( $p_I = 0,8175$ ,  $p_C = 0,5669$ ). Rozdíl se zdá být přítomný mezi aktivitou v poledne a o půlnoci mezi OBX a kontrolními potkany. V následujících dnech je stále patrný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými časovými úseky ( $p_T < 0,0001$ ), opět není patrný signifikantní vliv zákroku ( $p_I = 0,7844$ ,  $p_C = 0,0507$ ). Je možné sledovat trend podobnosti mezi OBX potkany po aplikaci ketaminu a kontrolními potkany, přičemž aktivita OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku se zdá být snižena oproti dalším skupinám. Rozdíly mezi jednotlivými časovými úseky se zdají být také více oploštělé v případě OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku. Poslední analýza byla provedena k určení, zda se liší mezi jednotlivými skupinami poměr v noci uběhnuté vzdálenosti k celkově uběhnuté vzdálenosti. V tomto případě není patrný žádný signifikantní rozdíl ( $p_I = 0,0957$ ,  $p_T = 0,5107$ ,  $p_C = 0,7113$ ). Grafy uběhnutých vzdáleností jsou předměty obrázků 12 – 18.



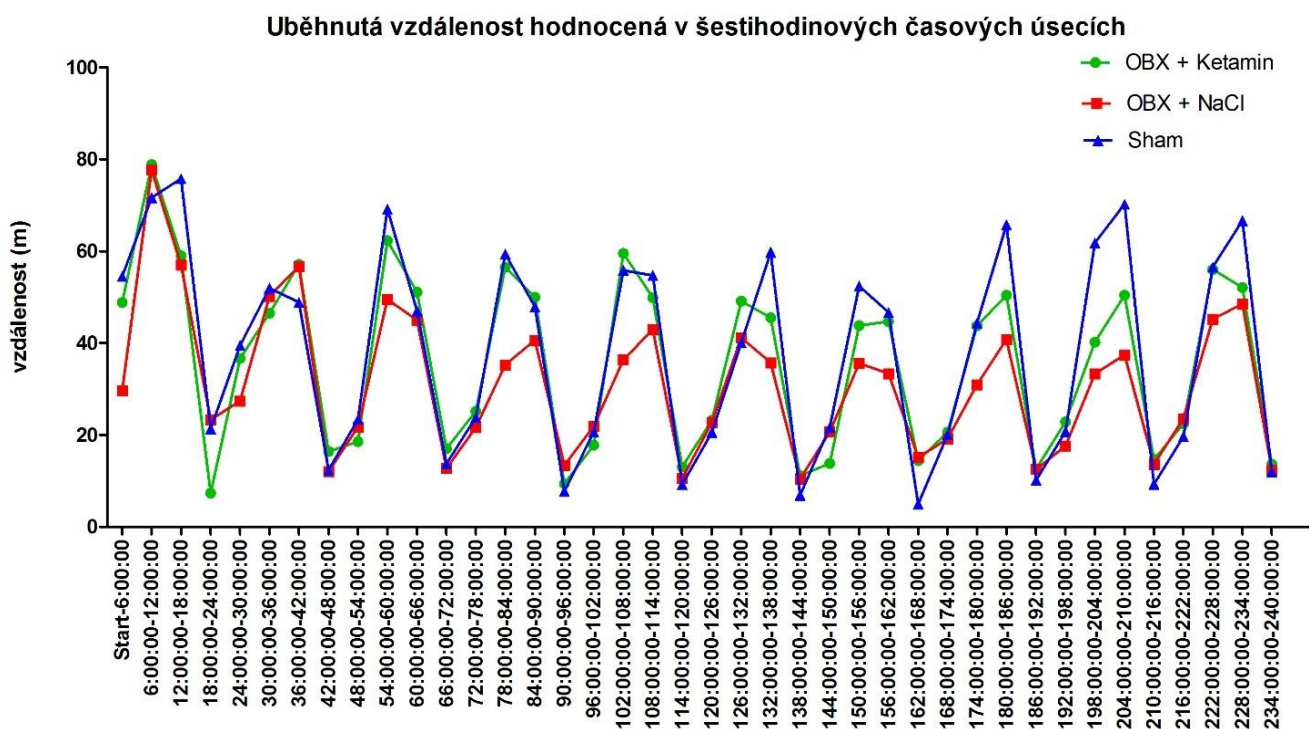
Obr. 12 – Uběhnutá vzdálenost za 10 dní experimentu. Mezi skupinami není patrný signifikantní rozdíl ( $p = 0,5557$ ).



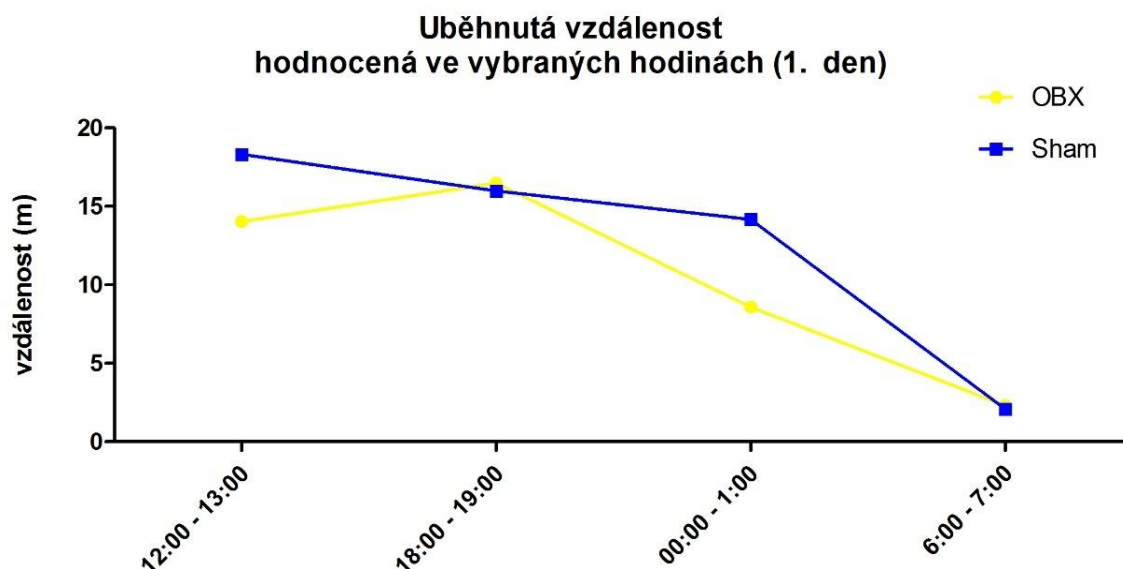
Obr. 13 – Poměr uběhnuté vzdálenosti 1. a 2. dne. Skupiny se signifikantně neliší ( $p = 0,3202$ ).



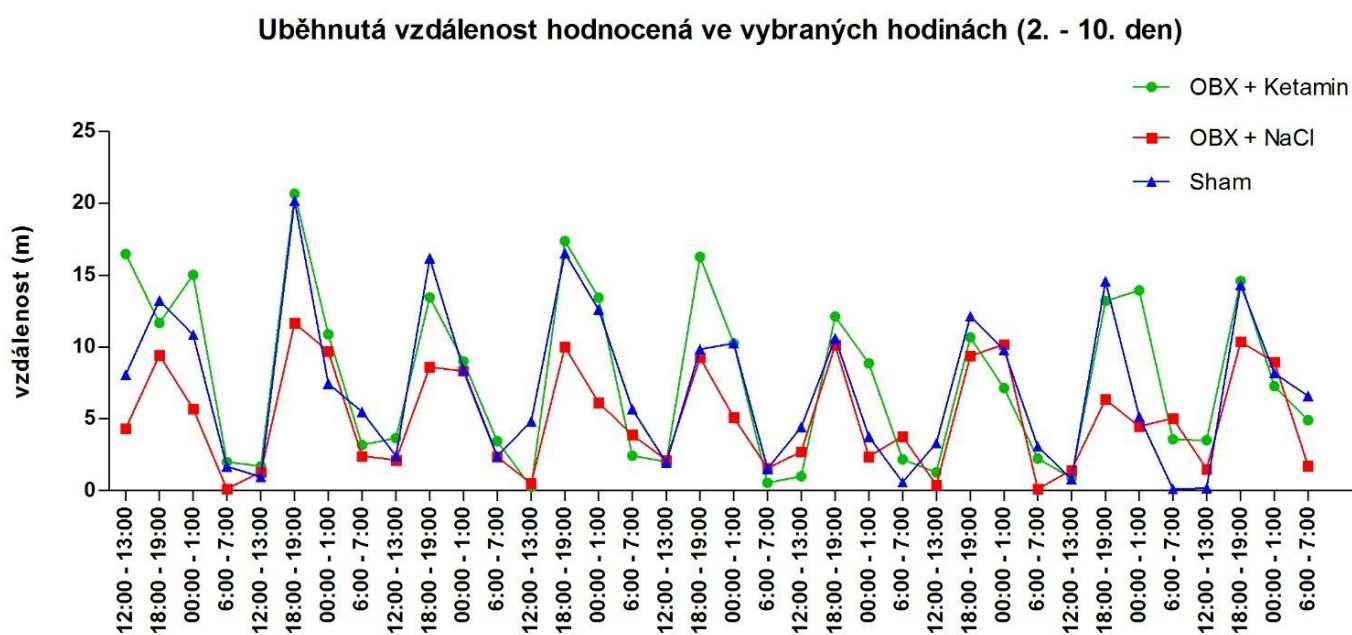
Obr. 14 – Celková uběhnutá vzdálenost za celou dobu experimentu, hodnocená po jednotlivých dnech. Jsou patrné signifikantní změny mezi jednotlivými dny ( $p_T < 0,0001$ ), není však patrný signifikantní vliv zákroku na míru změny či naměřené hodnoty ( $p_I = 0,9767$ ,  $p_C = 0,5557$ ).



Obr. 15 – uběhnutá vzdálenost hodnocená po šestihodinových úsecích. Je patrný signifikantní vliv času na naměřené hodnoty ( $p_T < 0,0001$ ), ale není přítomný signifikantní vliv zákroku ( $p_I = 0,6764$ ,  $p_C = 0,5557$ ).

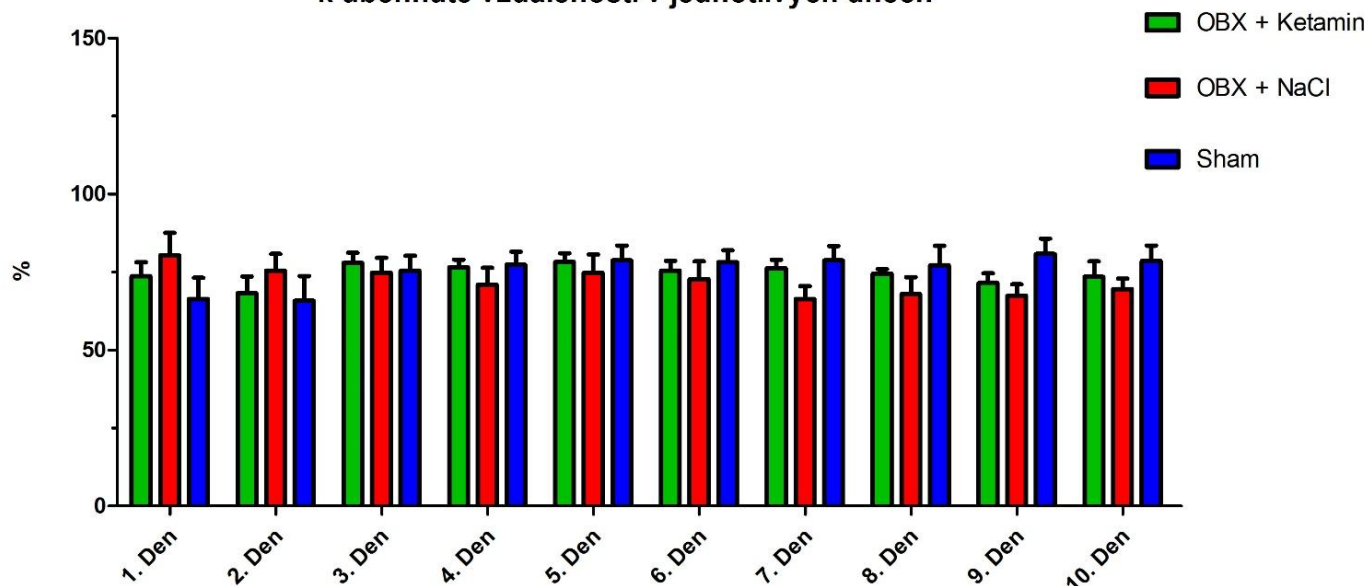


Obr. 16 – Uběhnutá vzdálenost hodnocená ve vybraných časových úsecích, první den. Patrný je signifikantní změna v průběhu času ( $p_T = 0,0023$ ), vliv zákroku se nezdá být signifikantní ( $p_I = 0,8175$ ,  $p_C = 0,5669$ ).



Obr. 17 – Uběhnutá vzdálenost ve vybraných časových úsecích ve zbývajících devíti dnech. Stále je přítomen signifikantní vliv času na naměřené hodnoty ( $p_T < 0,0001$ ), signifikantní vliv zákroku není patrný ( $p_I = 0,7844$ ,  $p_C = 0,0507$ ).

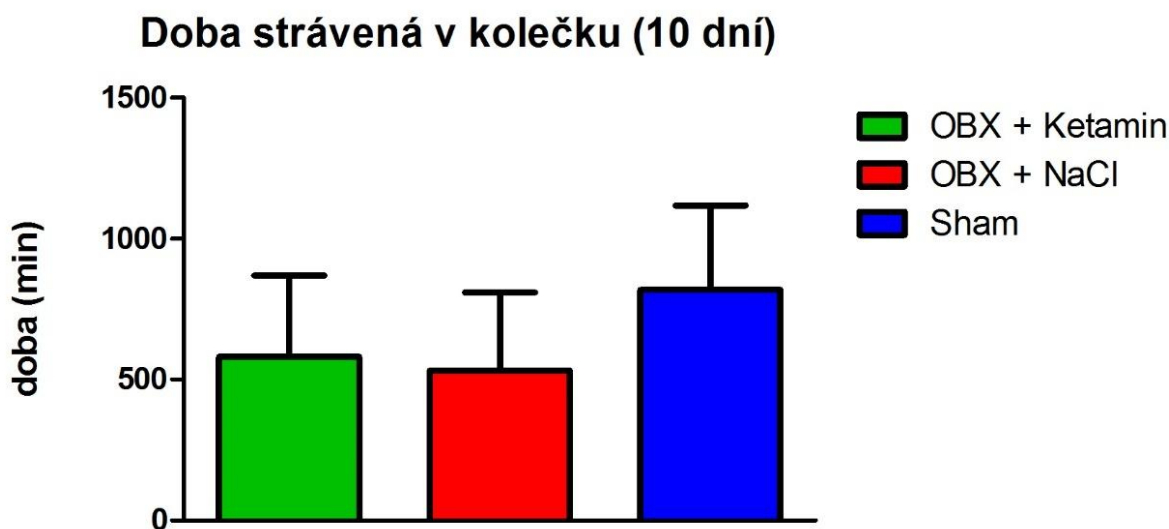
### Poměr v noci uběhnuté vzdálenosti k uběhnuté vzdálenosti v jednotlivých dnech



Obr. 18 – Poměr v noci uběhnuté vzdálenosti ve srovnání k celkové uběhnuté vzdálenosti daný den. Není patrná žádná signifikantní změna mezi jednotlivými skupinami v průběhu času ( $p_I = 0,0957$ ,  $p_T = 0,5107$ ,  $p_C = 0,7113$ ).

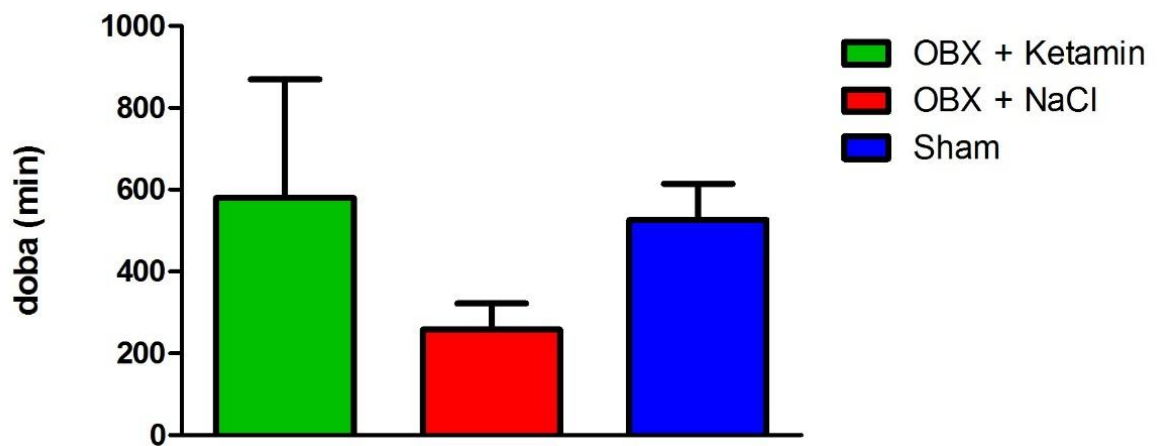
Dalším sledovaným parametrem byla doba strávená v běhacím kolečku. Doba strávená v kolečku za celých 10 dní není signifikantně rozdílná mezi jednotlivými skupinami ( $p = 0,7844$ ). V bližším pohledu na naměřené hodnoty však byly patrné hodnoty, které by mohly být odlehlé, což potvrdil Grubbsův test odlehlých hodnot. V případě, že by byly hodnoty odstraněny, celková doba strávená v kolečku u OBX potkanů po aplikaci ketaminu by se blížila celkové době strávené v kolečku u kontrolních potkanů. U OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku by byla doba strávená v kolečku nižší než u dalších dvou skupin, stále se ovšem nejedná o signifikantní rozdíl ( $p = 0,6454$ ). Doba strávená v kolečku v průběhu prvního dne není signifikantně rozdílná mezi experimentálními skupinami ( $p = 0,4932$ ), je však je patrný trend, kdy kontrolní potkani strávili v kolečku více času než OBX potkani. Doba strávená v kolečku v následujících dnech se signifikantně neliší s ohledem na časovou změnu či experimentální zákrok ( $p_I = 0,8308$ ,  $p_T = 0,0567$ ,  $p_C = 0,8707$ ). Jeví se však jistý trend rozdílné doby strávené v kolečku mezi jednotlivými dny, zatímco u OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku zůstává doba strávená v kolečku po jednotlivých dnech přibližně stejná.

V případě hodnocení doby strávené v kolečku po šestihodinových časových úsecích je patrná signifikantní změna mezi jednotlivými časovými úseky ( $p_T < 0,0001$ ), ovšem nelze přičítat signifikantní vliv experimentálnímu zákroku ( $p_I = 0,8459$ ,  $p_C = 0,7844$ ). Dále není patrný žádný výrazný trend, pouze ke konci experimentu se zdá, že kontrolní skupina a OBX potkani po aplikaci fyziologického roztoku trávili v kolečku stejně dlouhou dobu. Doba strávená v kolečku byla také hodnocená ve vybraných hodinách, podobně jako u celkově uběhnuté vzdálenosti. V prvním dni není přítomen signifikantní vliv žádného z faktorů ( $p_I = 0,3895$ ,  $p_T = 0,8913$ ,  $p_C = 0,3484$ ). Pozorovaný trend je, že kontrolní potkani strávili více času v kolečku oproti OBX potkanům. V následujících dnech je přítomen signifikantní rozdíl mezi jednotlivými časovými úseky ( $p_T < 0,0001$ ), zákrok však nemá na naměřené hodnoty signifikantní vliv ( $p_I = 0,8512$ ,  $p_C = 0,8853$ ). Není patrný žádný trend při srovnání jednotlivých skupin. Doba strávená v kolečku v rámci různých časových intervalů je zobrazena na obrázcích 19 – 25.



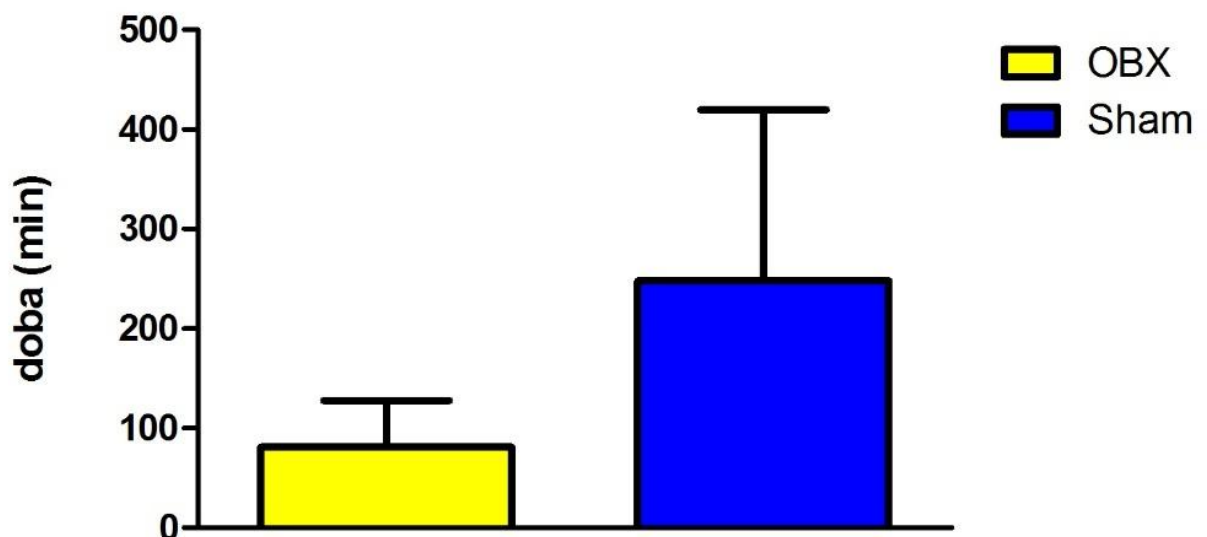
Obr. 19 – Celková doba strávená v běhacím kolečku po celou dobu experimentu. Mezi skupinami není signifikantní rozdíl ( $p = 0,7844$ ).

### Doba strávená v kolečku (10 dní) bez odlehlých hodnot



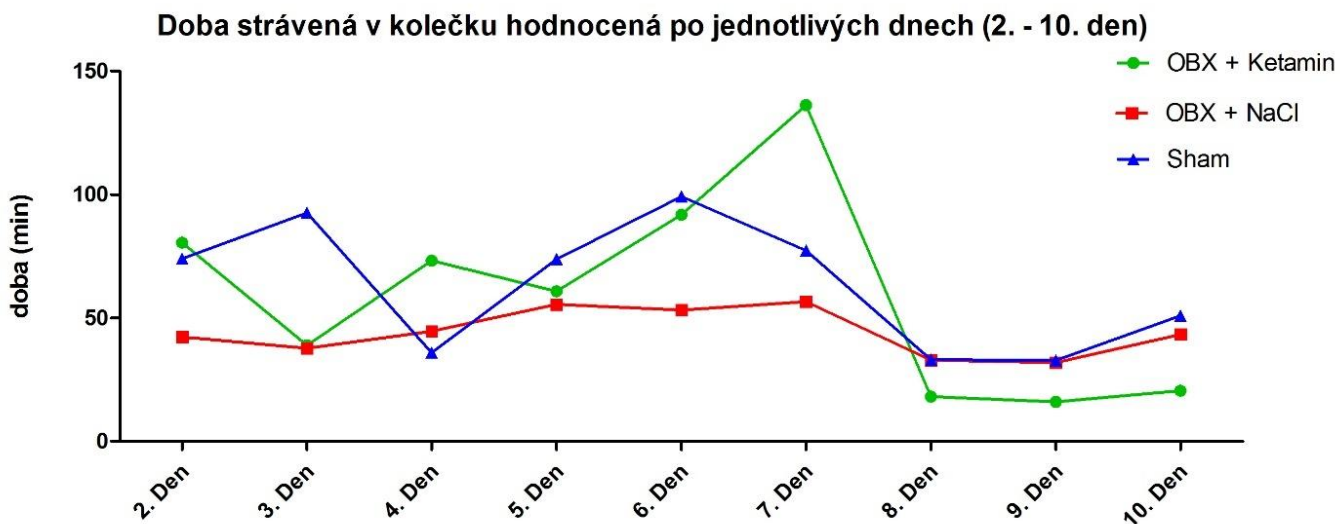
Obr. 20 – Celková doba strávená v běhacím kolečku po odebrání odlehlých hodnot. OBX + Ketamin skupina sleduje podobný trend jako skupina Sham. Rozdíl mezi skupinami však není signifikantní ( $p = 0,6454$ ).

### Doba strávená v kolečku (1. den)

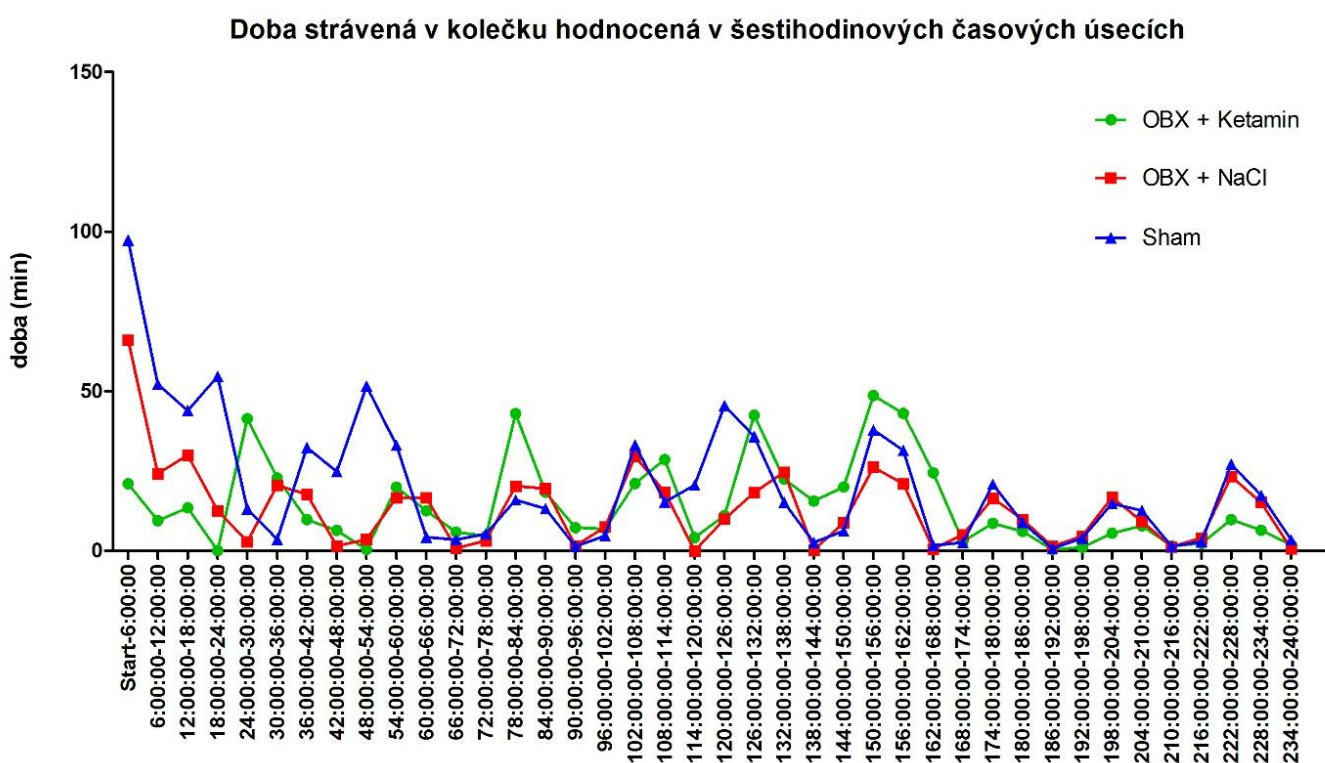


Obr. 21 – Čas strávený v kolečku první den experimentu. Mezi skupinami není signifikantní rozdíl ( $p = 0,4932$ ).

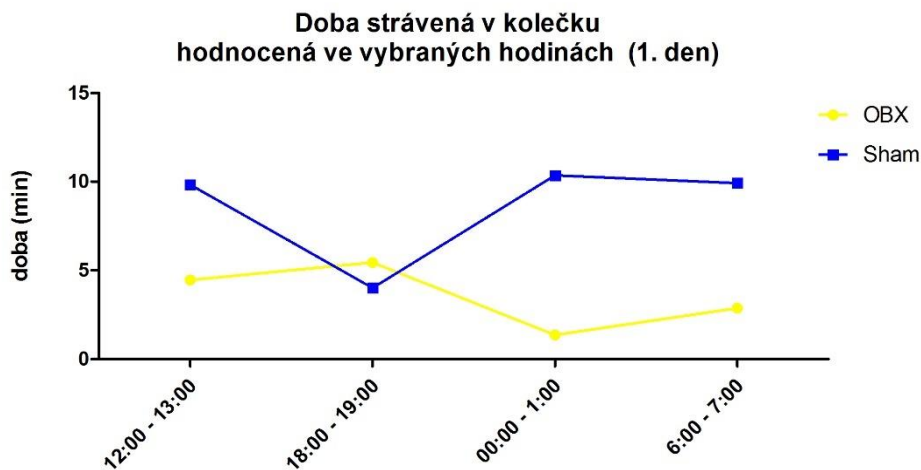




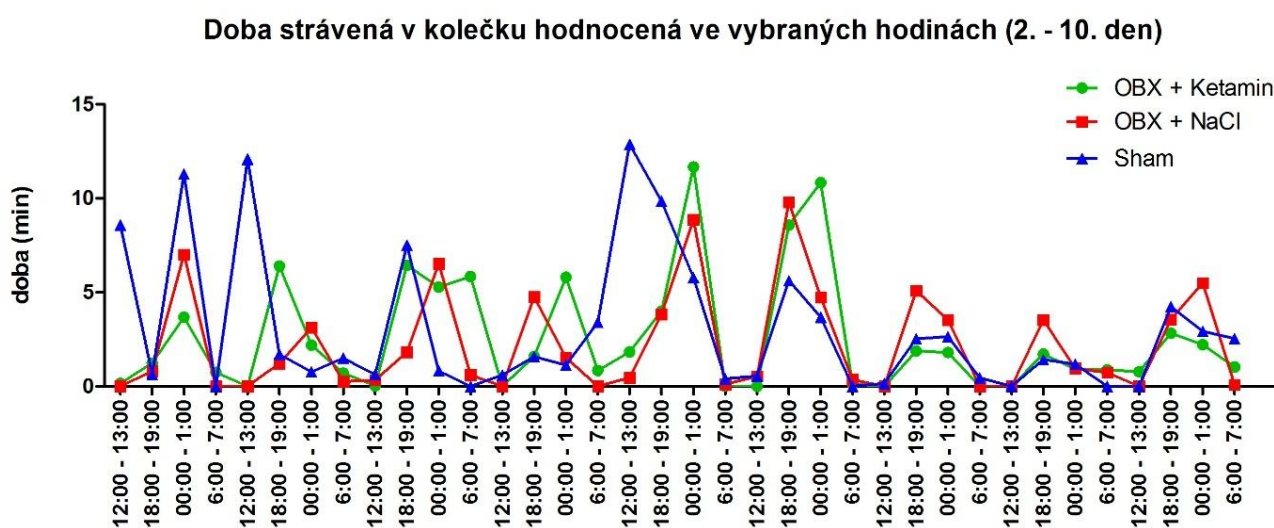
Obr. 22 – Čas strávený v kolečku následující dny experimentu, hodnocen po jednotlivých dnech. Čas strávený v kolečku se v žádném parametru signifikantně neliší ( $p_I = 0,8308$ ,  $p_T = 0,0567$ ,  $p_C = 0,8707$ ).



Obr. 23 – Doba strávená v kolečku, hodnoceno v šestihodinových intervalech. Signifikantní změna mezi jednotlivými časovými úseky je patrná ( $p_T < 0,0001$ ), vliv zákroku není signifikantní ( $p_I = 0,8459$ ,  $p_C = 0,7844$ ).

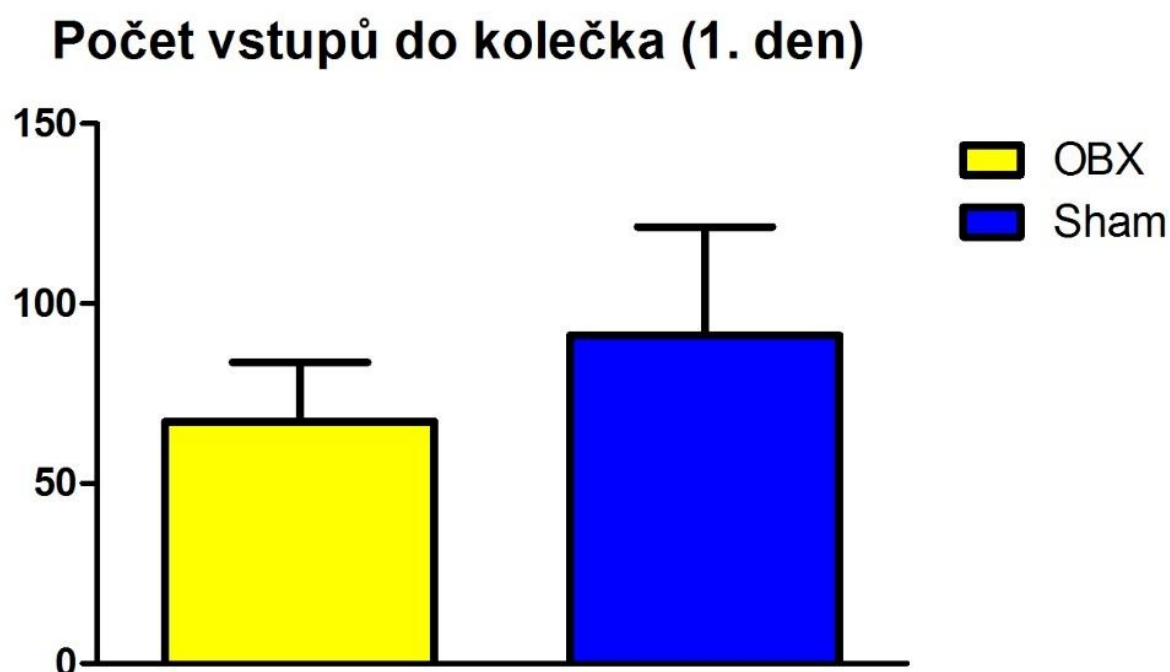


Obr. 24 – Doba strávená v kolečku hodnocená ve vybraných časových úsecích, první den. *Není patrná žádná signifikantní změna mezi jednotlivými měřeními, popřípadě přičitatelná experimentálnímu zákroku ( $p_I = 0,3895$ ,  $p_T = 0,8913$ ,  $p_C = 0,3484$ ).*



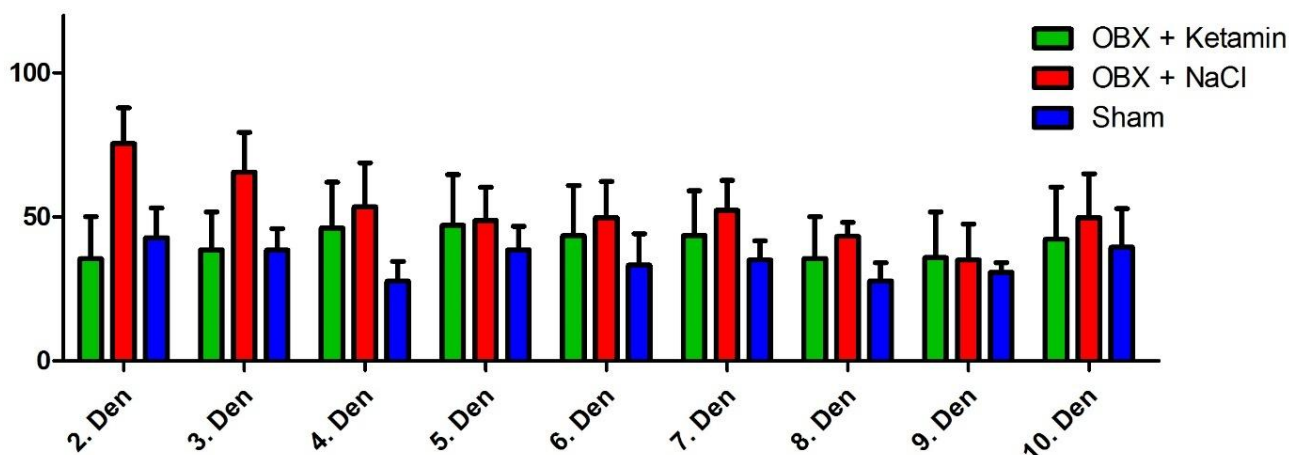
Obr. 25 – Doba strávená v kolečku hodnocená ve vybraných denních hodinách v následujících dnech měření. *Přítomen je signifikantní vliv času na dobu strávenou v kolečku ( $p_T < 0,0001$ ), není patrný signifikantní vliv zákroku ( $p_I = 0,8512$ ,  $p_C = 0,8853$ ).*

Dalším měřeným parametrem byl počet vstupů do běhacího kolečka v prvním dni a ve dnech následujících. V případě prvního dne není přítomen signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami ( $p = 0,4645$ ), ale je patrný trend vyššího počtu vstupů do kolečka u kontrolních potkanů ve srovnání s OBX potkany. V následujících dnech je patrná signifikantní změna v počtu vstupů do kolečka v průběhu času ( $p_T = 0,0357$ ), vliv zákroku ovšem není signifikantní ( $p_I = 0,1976$ ,  $p_C = 0,6416$ ). Přítomen je jistý trend vyššího počtu vstupů do kolečka v případě OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku ve srovnání s ostatními skupinami, není však velmi výrazný. Grafy znázorňující naměřené hodnoty v tomto parametru jsou předmětem obrázků 26 a 27.



Obr. 26 – Počet vstupů do kolečka 1. den. Není přítomen signifikantní rozdíl mezi skupinami ( $p = 0,4645$ )

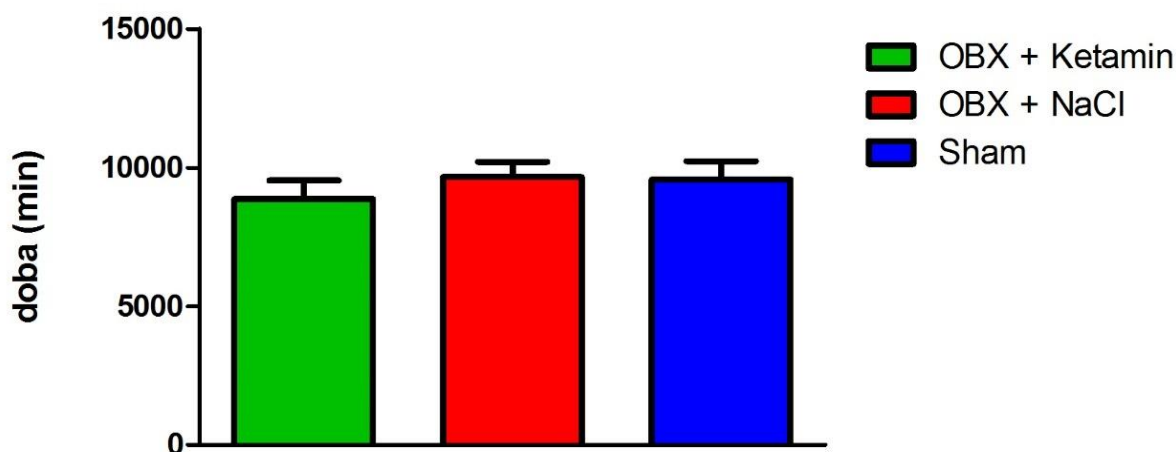
### Počet vstupů do kolečka (2. - 10. den)



Obr. 27 – počet vstupů do kolečka 2. – 10. den. Je přítomna signifikantní změna naměřených hodnot v průběhu času ( $p_T = 0,0357$ ), signifikantní vliv zákroku není patrný ( $p_I = 0,1976$ ,  $p_C = 0,6416$ ).

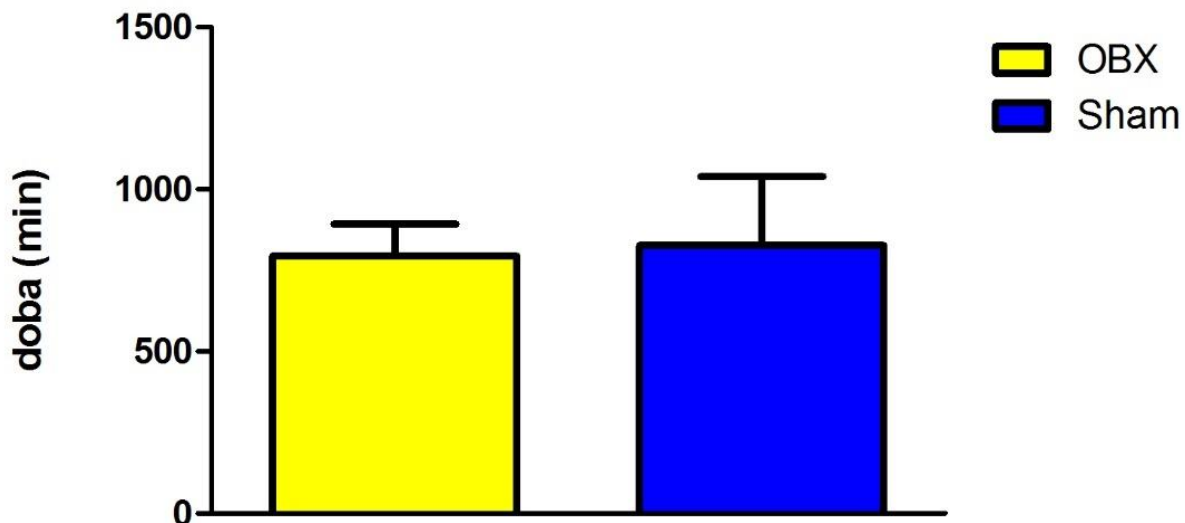
Dalším důležitým hodnoceným parametrem byl čas strávený v úkrytu, domečku. Celkový čas strávený v domečku po celou dobu měření se mezi jednotlivými skupinami neliší ( $p = 0,6196$ ), podobně není signifikantní rozdíl v době strávené v domečku během prvního dne experimentu ( $p = 0,8775$ ). V případě hodnocení doby strávené v domečku ve vybraných hodinách dne je opět signifikantní změna mezi jednotlivými měřeními ( $p_T = 0,0065$ ) bez patrného signifikantního vlivu zákroku ( $p_I = 0,9711$ ,  $p_C = 0,8038$ ). Stejně je tomu v případě hodnocení tohoto parametru v následujících dnech ( $p_I = 0,8689$ ,  $p_T < 0,0001$ ,  $p_C = 0,2805$ ). Přítomen je mírný trend v 2. – 10. dni experimentu, kdy OBX potkani po aplikaci fyziologického roztoku strávili více času v domečku ve srovnání s ostatními skupinami. V případě porovnání doby strávené v domečku s celkovou dobou měření v rámci prvního dne (procento času stráveného v úkrytu) není patrný rozdíl mezi skupinami ( $p = 0,9447$ ). V následujících dnech není patrná žádná signifikantní změna v poměru času stráveného v domečku k celkové době měření ( $p_I = 0,8572$ ,  $p_T = 0,2220$ ,  $p_C = 0,7131$ ). Z grafického znázornění je možné sledovat mírný trend vyššího podílu času stráveného v domečku u OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku. Obrázky 28 – 34 znázorňují data získaná z analýzy doby strávené v domečku.

### Doba strávená v domečku (10 dní)



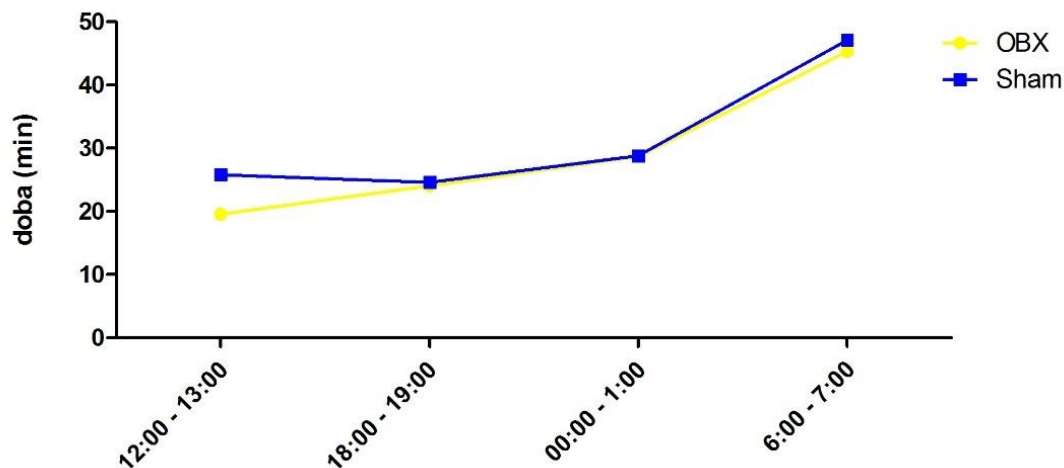
Obr. 28 – Celkový čas strávený v domečku se mezi jednotlivými skupinami nelišil ( $p = 0,6196$ ).

### Doba strávená v domečku (1. den)



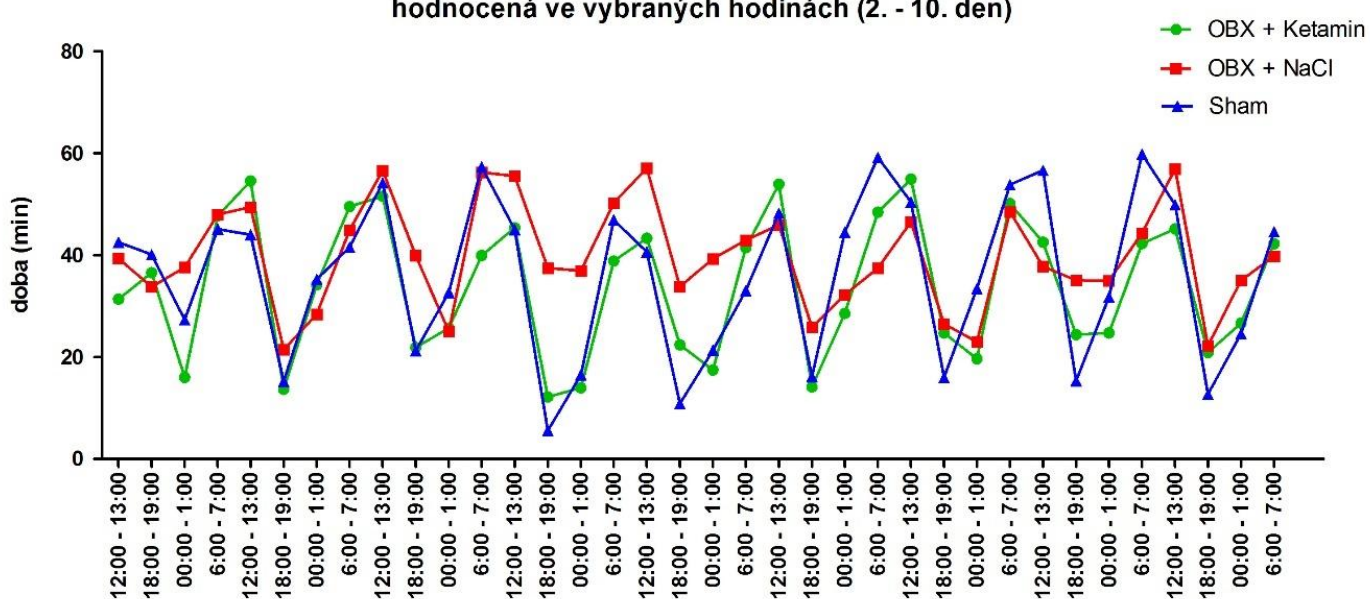
Obr. 29 – Není patrný rozdíl v době strávené v domečku v rámci prvního dne experimentu ( $p = 0,8775$ ).

### Doba strávená v domečku hodnocená ve vybraných hodinách (1. den)



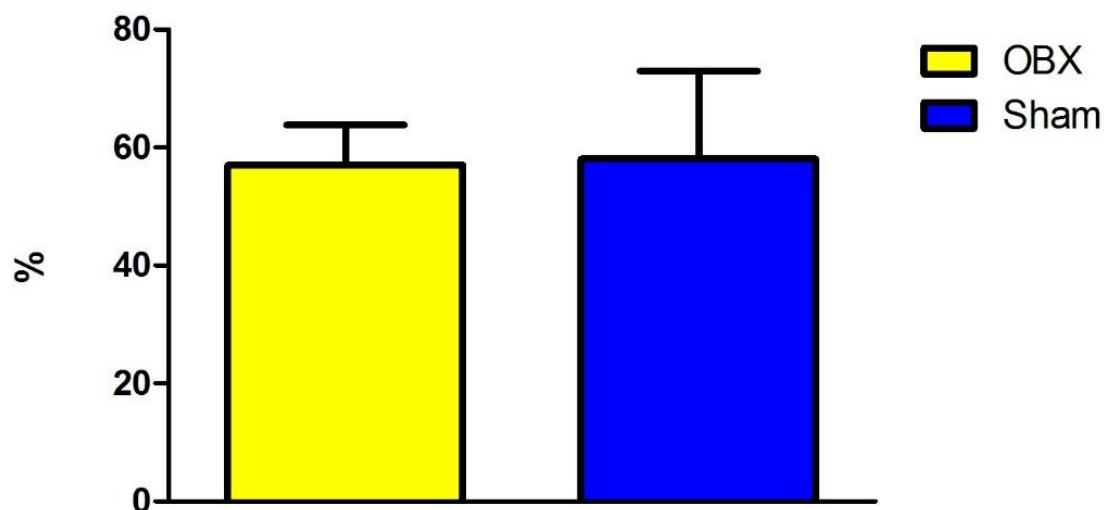
Obr. 30 – V případě hodnocení doby strávené v domečku ve vybraných hodinách je patrný signifikantní rozdíl mezi jednotlivými měřeními ( $p_T = 0,0065$ ), není ovšem patrný signifikantní vliv zákroku ( $p_I = 0,9711$ ,  $p_C = 0,8038$ ).

### Doba strávená v domečku hodnocená ve vybraných hodinách (2. - 10. den)



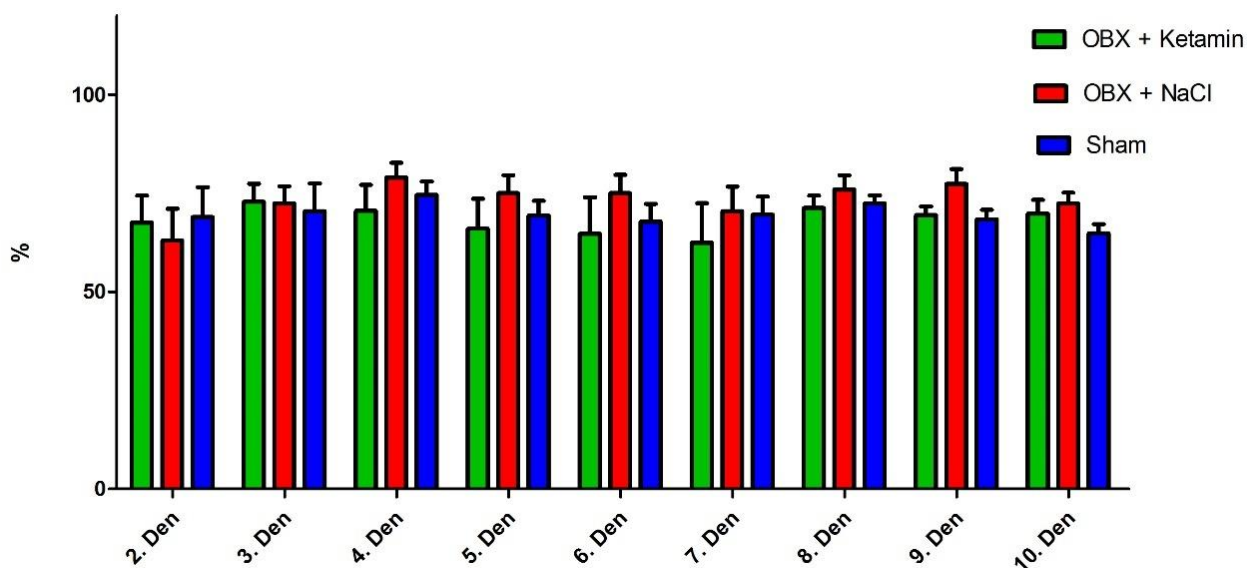
Obr. 31 – Hodnocení doby ve vybraných hodinách ve zbývajících dnech měření stále ukazuje signifikantní rozdíl mezi jednotlivými měřeními ( $p_T < 0,0001$ ), bez patrného signifikantního vlivu zákroku ( $p_I = 0,8689$ ,  $p_C = 0,2805$ ).

## Procento času stráveného v domečku (1. den)



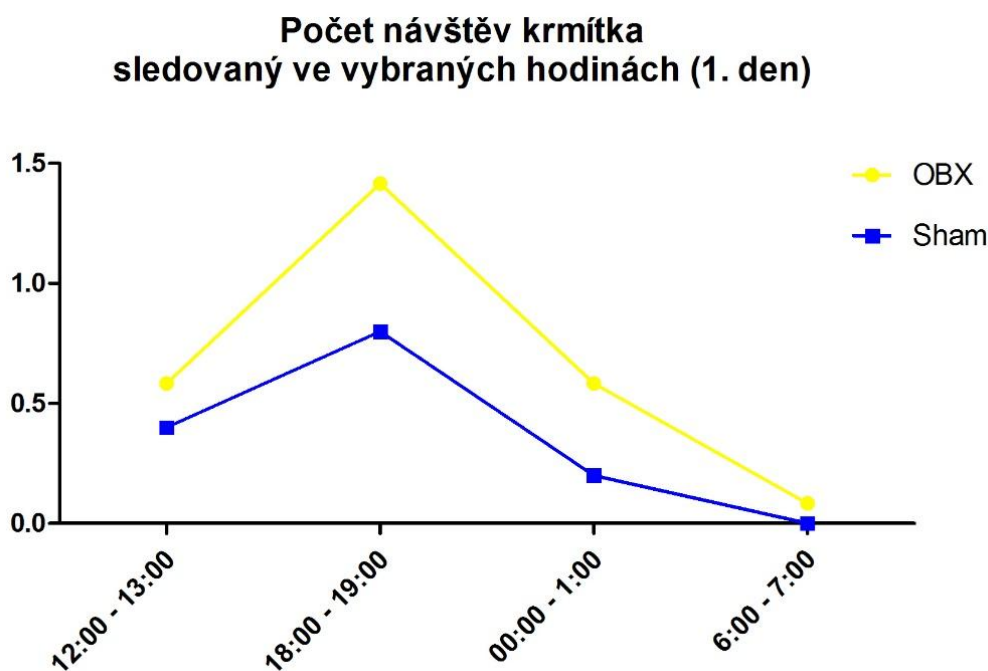
Obr. 32 – V případě hodnocení, jaký podíl času byl stráven v domečku v rámci prvního dne, není přítomen rozdíl mezi skupinami ( $p = 0,9447$ ).

## Procento času stráveného v domečku (2. - 10. den)



Obr. 33 – Procento času stráveného v domečku se významně neliší mezi jednotlivými skupinami po zbyvajících dnech experimentu ( $p_i = 0,8572$ ,  $p_T = 0,2220$ ,  $p_C = 0,7131$ ).

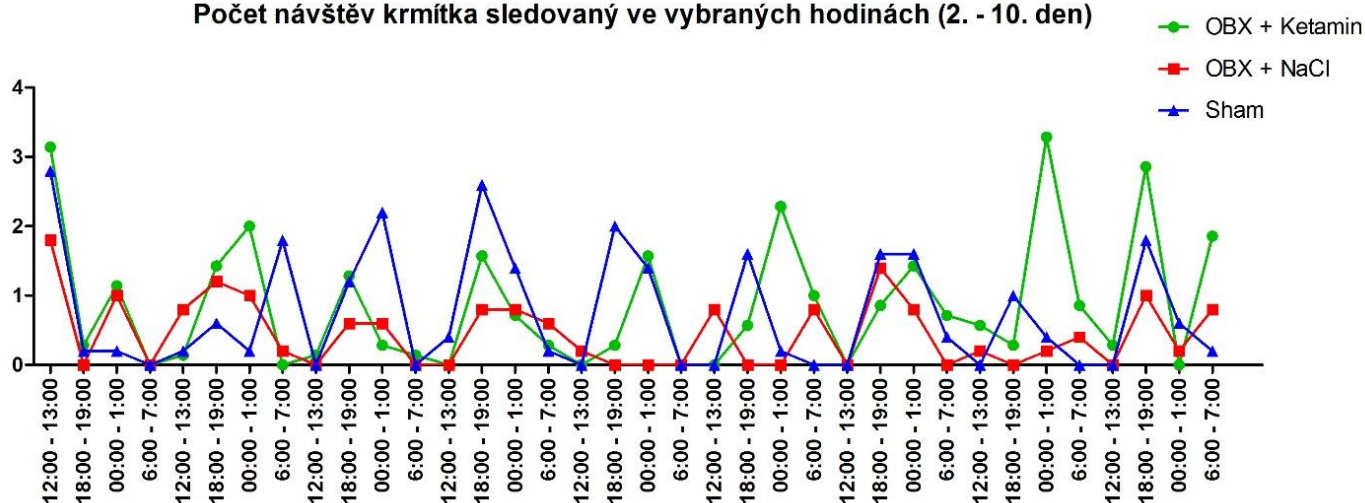
Posledním hodnoceným parametrem byl počet návštěv krmítka ve vybraných časových úsecích. Ani zde nebyl patrný signifikantní rozdíl mezi sledovanými skupinami v rámci prvního dne ( $p_I = 0,9619$ ,  $p_T = 0,2665$ ,  $p_C = 0,5803$ ), zdá se však být přítomný trend OBX potkanů navštěvovat častěji krmítko ve srovnání s kontrolní skupinou. Následující dny je signifikantní rozdíl v počtu návštěv v jednotlivých časových úsecích ( $p_T < 0,0001$ ), vliv zákroku však není signifikantní ( $p_I = 0,6605$ ,  $p_C = 0,6334$ ). Z grafického znázornění je patrný trend vyšší frekvence návštěvy krmítka po zhasnutí v případě kontrolních potkanů. Počet návštěv krmítka zobrazují grafy na obrázcích 34 a 35.



Obr. 34 – Počet návštěv krmítka ve vybraných časových úsecích prvního dne experimentu. Není signifikantní rozdíl mezi jednotlivými pozorováními ( $p_I = 0,9619$ ,  $p_T = 0,2665$ ,  $p_C = 0,5803$ ).



Počet návštěv krmítka sledovaný ve vybraných hodinách (2. - 10. den)



Obr. 35 – počet návštěv krmítka ve vybraných časových úsecích po zbývající dobu experimentu. Signifikantní je vliv času na sledované hodnoty ( $p_T < 0,0001$ ), zázrok patrně nemá signifikantní vliv ( $p_I = 0,6605$ ,  $p_C = 0,6334$ ).

## 7. Diskuze

Prvním cílem této práce bylo zhodnotit antidepresivní účinek ketaminu v testu nuceného plavání za využití software umožňujícího automatizované sledování experimentálního zvířete. Druhým cílem pak bylo stanovit hladinu fosforylovaného mTOR v mozковém homogenátu získaným z levé hemisféry zvířat použitých v prvním experimentu. V těchto experimentech byly zvoleny různé subanestetické dávky ketaminu, 3mg/kg, 10 mg/kg a 20 mg/kg. Ketamin byl zvolen kvůli rychlému nástupu antidepresivního účinku (Berman et al., 2000), zprostředkovaného primárně jiným mechanismem než přímým ovlivněním monoaminergní transmise. ICR kmen myši byl použit kvůli citlivosti k vlivu antidepresiv s atypickým mechanismem účinku (Petit-Demouliere et al., 2005) a k vyhodnocení výsledků byl využit software Ethovision XT. Sledované parametry byly míra imobility, doba stavu „not moving“, uplavaná vzdálenost a latence.

Imobilita je v programu Ethovision charakterizována změnou předem stanoveného počtu pixelů za danou časovou jednotku. Tento parametr má vyšší senzitivitu k možnému antidepresivnímu vlivu, neboť zachycuje i pohyby končetin. Toto je patrné i z výsledné statistické analýzy získaných dat, která ukazuje na signifikantní zvýšení či snížení u tří sledovaných skupin. Je nutno ovšem poznamenat, že pro patřičné stanovení tohoto parametru je vyšší nárok na dobré světelné podmínky a vysoký kontrast mezi zvířetem a pozadím. „not moving“, definovaný dobou, kdy se myš pohybuje rychlostí nižší, než 1,75 cm/s, v tomto experimentu vykazoval stejný trend jako imobilita. Signifikantní rozdíl byl patrný u dvou parametrů. Toto naznačuje, že je tento parametr skoro stejně citlivý na vyvolané změny, jako imobilita, ostatně v publikacích bývá někdy s imobilitou zaměňován (Juszczak et al., 2008). Celková uplavaná vzdálenost je robustní parametr, který není tolik citlivý ke změně světelných podmínek v průběhu experimentu (Hédou et al., 2001). V tomto experimentu došlo ke snížení celkové uplavané vzdálenosti po aplikaci ketaminu, což koreluje s předešlými pozorovanými výsledky. Signifikantní rozdíl byl však patrný pouze mezi první a druhou skupinou. Poslední sledovaný parametr, doba do první imobility zvířete, trvající 4 sekundy (latence), byl z větší části vyhodnocen manuálně. V tomto případě došlo k odečtení dané hodnoty z aktogramu zvířete. Z toho důvodu byl patrný vyšší rozptyl

mezi jednotlivými výsledky, který vedl k použití Grubbsova testu odlehlých hodnot a následnému vyřazení dvou odlehlých hodnot z analýzy.

Automatizované vyhodnocení testu nuceného plavání za použití software Ethovision se jeví jako užitečným experimentálním prostředkem, umožňujícím odfiltrování interindividuální variability experimentátorů, ovlivňující vyhodnocení sledovaných parametrů. Využití tohoto typu vyhodnocení umožňuje konzistenci výsledků mezi jednotlivými laboratořemi. Tento typ vyhodnocení má ovšem i svoje limity. Vysoký kontrast zvířete oproti pozadí je velmi důležitý, aby byl software schopný zvíře spolehlivě odlišit a sledovat. V tomto experimentu jsme použili černobílou kameru, tedy bylo dosaženo poměrně dobrého kontrastu, ovšem volba osvětlení s vyšší svítivostí by byla pravděpodobně vhodnější. Bylo by možné také zvolit jiné metodologické přístupy – například natáčení experimentu barevnou kamerou, popřípadě sledování zvířete za pomoci sledování značky na těle. Byla publikována i práce, navrhuující infračervené osvětlení při použití software Ethovision, vytvářející dobrý kontrast sledovaného objektu oproti pozadí (Bailoo et al., 2010).

Výsledky prvních tří parametrů ukazují na signifikantně zvýšenou míru imobility myši po aplikaci ketaminu v dávce 3 mg/kg ve srovnání s kontrolou. S následnými zvyšujícími se dávkami dochází ke snižování imobility. Tyto výsledky by se mohly zdát překvapivé vzhledem k publikovanému antidepresivnímu účinku již po první aplikaci u lidských pacientů (Berman et al., 2000). Nicméně v případě testování u zvířat tyto výsledky tak překvapivé nejsou, neboť mohou být patrně ovlivněny různými parametry, například volbou kmene experimentálního zvířete i volbou určité dávky. Snižování imobility v testu nuceného plavání po aplikaci ketaminu, ukazující na jeho antidepresivní účinek, bylo publikováno ve vyšších dávkách a v jiném kmeni myši (Cruz et al., 2009), popřípadě v dávkách nižších, ale u potkanů místo myši (Carrier & Kabbaj, 2013). Některé práce ukazují antidepresivní účinek ketaminu u kmene myši ICR v podobných dávkách, jaké byly použity v tomto experimentu, nicméně TST byl použit namísto FST (Koike et al., 2011) a jak již bylo zmíněno v teoretickém úvodu, tyto dva testy se navzdory jistým podobnostem od sebe liší (Renard et al., 2003). Byly publikovány i práce, které ukazují podobný okamžitý efekt ketaminu, jaký byl pozorován v tomto experimentu (Popik et al., 2008). Případně byl vliv na imobilitu po aplikaci ketaminu patrný pouze v případě, kdy byl použit některý

model založený na stresu (Koike et al., 2013; Ma et al., 2013). Doba latence, poslední sledovaný parametr, byla prodloužena po aplikaci ketaminu v dávce 20 mg/kg, což je v souladu s dostupnou literaturou. Prodloužení doby latence po aplikaci ketaminu v této či podobné dávce bylo publikováno u myši (Hayase et al., 2006) i potkanů (Parise et al., 2013).

Antidepresivní účinek ketaminu nebyl prokázán vlivem na imobilitu, uplavanou vzdálenost či dobu trvání stavu „not moving“. Pouze prodloužení doby latence po nejvyšší dávce ketaminu naznačuje antidepresivní účinek ketaminu. Jak je již ovšem ukázáno výše, publikované výsledky jsou v tomto ohledu nekonzistentní. FST je často prováděn dle stejného protokolu, který byl použit i v tomto experimentu, kdy je testován okamžitý účinek u zdravého zvířete. Mnoho parametrů, mimo jiné volba kmene myši či specifické dávky může ovlivnit sledovaný výsledek (Petit-Demouliere et al., 2005), což je třeba mít na paměti při hodnocení dat získaných ve FST. Srovnání např. s animálním modelem depresivní poruchy je proto namístě.

Cílem druhého experimentu bylo stanovit změnu hladiny fosforylovaného mTOR, přičemž vzorky byly získány z myši použitých v experimentu 1. Změna hladiny mTOR byla měřená v mozkových homogenátech. Význam signalizace mTOR v antidepresivním účinku ketaminu byla opakovaně publikována (Li et al., 2010; Zhou et al., 2014), což vedlo k rozhodnutí stanovit změnu fosforylace právě této kinázy. K analýze byla vybrána levá hemisféra, neboť některé práce poukázaly na relativně sníženou aktivaci levé hemisféry ve srovnání s pravou hemisférou (Hecht, 2010) a upravení této asymetrické aktivity pomocí antidepresivní léčby (Rotenberg, 2008). Hladina fosforylovaného mTOR v mozkových homogenátech byla v předchozích zmíněných pracích stanovena pomocí metody western blot (Li et al., 2010; Zhou et al., 2014). Snahou tohoto experimentu tedy bylo mimo jiné prověřit, zda je možné ke stanovení mTOR využít i metodu ELISA.

Změřené hladiny absorbance, vztažené ke zvolenému standardu, jsou v souladu se získanými behaviorálními daty. Výsledky ukazují signifikantní snížení fosforylovaného mTOR po aplikaci ketaminu ve všech dávkách, přičemž největší změna je patrná po aplikaci ketaminu v dávce 3 mg/kg. Běžně bývá publikováno snížení imobility po aplikaci ketaminu a s ním spojené zvýšení hladiny fosforylovaného mTOR (Li et al., 2010; Yang et al., 2013). Získané výsledky vykazují stejný trend, kdy

behaviorální změna je doprovázená změnou v hladině fosforylovaného mTOR. Publikovány byly však i práce, kde aktivace mTOR byla inhibována rapamycinem a přesto byl patrný vliv ketaminu v testu nuceného plavání (Autry et al., 2011), případně blokáda mTOR kinázy rapamycinem ovlivnila antidepresivní efekt ketaminu až 24 hodin po aplikaci (Iijima et al., 2012), což ukazuje na důležitost zvoleného časového rozestupu mezi jednotlivými procedurami. Dalším možným faktorem, ovlivňujícím hladinu fosforylovaného mTOR, by mohla být různá afinita ketaminu k různým podtypům NMDA receptoru, v závislosti na lokalizaci neuronů (např. interneuron vs. glutamátergní neuron) a s ohledem na podanou dávku (Grunze et al., 1996; Homayoun & Moghaddam, 2007). Toto by bylo možné vysvětlit rozdílným podjednotkovým složením dle daného typu neuronu (Chen & Lipton, 2006), což by mohlo ovlivnit afinitu ketaminu. Je možné, že u různých kmenů experimentálních zvířat se budou NMDA receptory na různých podtypech neuronů lišit, a tedy i afinita ketaminu v závislosti na podané dávce bude různá.

Limitací použité metodiky je měření změny fosforylovaného mTOR v celé hemisféře místo vybraných mozkových struktur. mTOR je všudypřítomná kináza, jejíž aktivita ovlivňuje mnoho procesů (Bergeron et al., 2014; Takei & Nawa, 2014). Měření změny hladiny mTOR by tak bylo vhodné soustředit do struktur implikovaných v depresivní poruše, jakými jsou například prefrontální kortex (Li et al., 2010) či hipokampus (Autry et al., 2011).

Cílem posledního experimentu bylo zavést a zhodnotit využití observačních boxů Phenotyper od společnosti Noldus k fenotypizaci modelu olfaktorické bulbektomie u potkanů kmene Long Evans a dále zhodnotit efekt ketaminu v tomto modelu. Olfaktorická bulbektomie je zavedený animální model v Laboratoři Neurofyziologie paměti, proto byl zvolen v tomto experimentu s pilotním charakterem. Behaviorální část experimentu byla zahájena 3 týdny po operaci. Zvolený časový úsek by měl být dostatečný k plnému zotavení zvířat, ale hlavně k rozvoji požadovaného fenotypu (Hendriksen et al., 2015). Kmen Long-Evans byl zvolen kvůli přítomnosti černé barvy, umožňující kontrast mezi podkladem a zvířetem a také dobré dostupnosti na oddělení. Ketamin byl zvolen kvůli rychlému nástupu antidepresivního účinku, ale i kvůli rychlému vyprchání tohoto účinku (Berman et al., 2000). Důležitou roli ve volbě ketaminu jako sledovaného antidepresiva hrál také jiný mechanismus účinku než

přímé ovlivnění monoaminergní transmise. Jak již bylo popsáno ve výsledcích, sham skupiny byly sloučeny v jednu bez ohledu na podanou látku. Experiment měl pilotní charakter a byl zde přítomen nárok na snížení počtu experimentálních zvířat. Toto sloučení bylo možné, neboť ketamin nemá efekt na sham operovaná zvířata v tomto modelu (Holubova et al., 2016).

Prvním hodnoceným parametrem byla celková uběhnutá vzdálenost. Navzdory jednoduchosti tohoto parametru se jedná o zlatý standard, neboť je robustní a jeho měření ve vybraných časových úsecích lze získat data mající výpovědní hodnotu ohledně cirkadiánní aktivity zvířete. V experimentu byl pozorován trend nižší celkové uběhnuté vzdálenosti u OBX potkanů bez aplikace ketaminu. OBX potkani také vykazovali nižší aktivitu první den ve srovnání s kontrolní skupinou. V literatuře je opakovaně publikována hyperlokomoce OBX potkanů (Breuer et al., 2007; Vinkers et al., 2009), sledována však byla i snížená aktivita v případě umístění potkanů do čtvercové arény s nízkou intenzitou osvětlení (Stockert et al., 1988). Publikovaná hyperlokomoce je ovšem záležitostí přetrvávající krátce po umístění do nového prostředí. Literatura zabývající se pohybovou aktivitou dlouhodobě v případě OBX potkanů není dostupná. Castelhana-Carlos & Costa v roce 2014 vydali studii založenou na automatizovaném monitorování chování, ovšem u modelu CMS. Nicméně tato práce ukazuje také celkově sníženou lokomoci u tohoto modelu (Castelhana-Carlos & Costa, 2014), což je v souladu s daty naměřenými v naší laboratoři. Dále je vhodné zmínit, že uběhnutá vzdálenost je měřena pouze v době, kdy se zvíře nachází mimo skryté zóny, jako je domeček, nebo kolečko, pokud tedy zvíře více exploruje, dá se očekávat, že naběhaná vzdálenost bude vyšší. Naopak, pokud má potkan vysokou anxiету, dá se očekávat, že stráví více času v domečku a tedy uběhnutá vzdálenost bude nižší. Vyšší anxieta u OBX potkanů byla již dříve publikována (Wang et al., 2007) a mohla by být dalším možným faktorem ovlivňujícím nižší uběhnutou vzdálenost sledovanou u OBX potkanů bez léčebného zásahu. Nutno ovšem říci, že ne všechny práce podporují vyšší anxiету v tomto modelu (Mar et al., 2000). S přihlédnutím na vizualizaci aktivity po jednotlivých dnech se zdá, že kontrolní skupina je aktivní první den, přičemž druhý den dochází k poklesu aktivity. Pokles aktivity není tak strmý u OBX potkanů. Toto je v souladu s pozorováním, že OBX potkani mají nižší míru habituace na nové prostředí (Mar et al., 2000). Na konci experimentu je patrný trend zvyšující se lokomoce u všech skupin, což by

mohlo souviset s působením sociální izolace na chování potkanů. Toto pozorování není příliš překvapivé, neboť v minulosti byly publikovány práce, ukazující na zvyšující se lokomoční aktivitu u individuálně chovaných potkanů (Wilkinson et al., 1994).

Aktivita potkanů byla dále hodnocena v šestihodinových úsecích a také ve vybraných hodinách každého dne. Tyto parametry byly sledovány z důvodu určení cirkadiánní aktivity, která byla ve většině sledovaných parametrů prokázána. Vyšší aktivita ve tmavé části dne ve srovnání s kontrolou byla publikována v případě OBX potkanů (Vinkers et al., 2009). Výsledky získané v našem experimentu ukazují vyšší píkы aktivity u OBX potkanů pouze první den, v následující dny dochází ke snížení aktivity OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku ve srovnání s kontrolní skupinou a OBX skupinou po aplikaci ketaminu. To je možné interpretovat jako jisté oploštění cirkadiánní aktivity a je možné toto pozorování dát do souvislosti s celkově sledovanou nižší aktivitou této skupiny. Přestože není tento fenotyp u OBX potkanů v literatuře popsán, zdá se, že aplikace ketaminu upravuje změnu chování po dobu až čtyř dnů, následně dochází k opětovnému objevení fenotypu, patrného u OBX potkanů bez léčebného zásahu. V případě srovnání noční aktivity zvířat k celkové aktivitě za hodnocený časový úsek je patrný trend snížené noční aktivity u OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku ve srovnání s ostatními skupinami, což je v souladu s pozorováními cirkadiánní aktivity. Podobně nižší noční aktivita byla také publikována v případě CMS potkanů v práci s podobným experimentálním nastavením (Castelhano-Carlos & Costa, 2014).

Kromě uběhnuté vzdálenosti byla hodnocena i doba strávená v běhacím kolečku. V tomto experimentu jsme sledovali trend snížené doby strávené v běhacím kolečku u OBX potkanů. Některé dostupné práce neukazují rozdíl v aktivitě v běhacím kolečku mezi OBX a Sham potkany (Chambliss et al., 2004; Van Hoomissen et al., 2003), ovšem tyto práce si měření tohoto parametru primárně nekladly za cíl. Další práce ukazují na vyšší aktivitu a delší čas strávený v kolečku u OBX myší (Possidente et al., 1996) či potkanů (Lumia et al., 1992). V případě automatizovaného monitorování chování CMS potkanů byla však publikována nižší aktivita v běhacím kolečku (Castelhano-Carlos & Costa, 2014), což je v souladu s naším pozorováním. Zde patrně opět hraje roli vliv dlouhodobého sledování chování, ve srovnání s krátkodobým sledováním tohoto parametru. V první dny strávila kontrolní skupina

v běhacím kolečku více času ve srovnání s OBX potkany. Následující den dochází ke snížení této doby. To je možné vysvětlit habituací na nové prostředí a nový předmět. V následujících dnech je patrný trend celkově nízké doby strávené v kolečku u OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku, přičemž není patrný rozdíl mezi jednotlivými dny. Co se týče sledování doby strávené v kolečku s ohledem na jistou cirkadiánní aktivitu, zde je naopak patrný jistý trend pravidelných cyklů u OBX potkanů bez farmakologické intervence. Patrný je také trend, kdy od 7. dne experimentu dochází k výraznému snížení doby strávené v kolečku ve všech skupinách. Toto by bylo možné opět přisoudit behaviorálním změnám, navozeným dlouhodobou separací experimentálních zvířat (Brain & Benton, 1983).

Další parametr, počet vstupů do kolečka, vyjadřuje, kolikrát potkan navštívil kolečko v hodnoceném časovém úseku. V tomto případě byl tento parametr měřen po jednotlivých dnech. Počet vstupů do kolečka byl vyšší v případě kontrolní skupiny, což opět není v rozporu se skutečností, že kolečko byl pro potkany nový objekt. Následující den došlo ke snížení návštěv kolečka kontrolní skupinou, zato je však patrný trend vyššího počtu návštěv kolečka OBX potkany bez farmakologické intervence. Vzhledem k jinak celkově nižší době strávené v kolečku je možné toto pozorování chápat jako projev snížené habituace u OBX potkanů (Mar et al., 2000), kdy opakovaně navštěvují kolečko navzdory tomu, že v něm pak nestráví tak dlouhou dobu. Jak již bylo uvedeno ve výsledcích, parametr celkově naběhané vzdálenosti v běhacím kolečku nebyl z technických důvodů změřen. Toto je limitující, soudě skutečnost, že tento parametr by mohl vnést nové světlo do interpretace výsledků získaných z běhacího kolečka.

Dalším měřeným parametrem byla doba strávená v domečku. Domeček byl hlavním prostorem, kde se mohli potkani ukrýt. Tento parametr se celkově prakticky nelišil mezi jednotlivými skupinami. Pouze v případě sledování času stráveného v domečku ve vybraných časových úsecích byla patrná jistá tendence OBX potkanů po aplikaci fyziologického roztoku trávit více času v domečku. Jednalo se o hodiny ze tmavé části dne. Toto je v souladu s nižší aktivitou, pozorovanou u této skupiny v tyto časové úseky. Ačkoliv není dostupná literatura, která by tento parametr měřila u OBX potkanů, u CMS potkanů byla naměřena delší doba spánku ve tmavé části dne (Castelhano-Carlos & Costa, 2014), což je v souladu s naším pozorováním. Poměr



času stráveného v domečku k celkovému času strávenému v experimentu se mezi jednotlivými skupinami také výrazně neliší, pouze se zdá, že OBX potkani po aplikaci fyziologického roztoku mají tendenci strávit vyšší podíl dne v domečku.

Poslední sledovaný parametr byla frekvence návštěvy krmítka. U OBX potkanů byla v minulosti publikována vyšší frekvence konzumace nižšího množství potravy v prvních týdnech po operaci (Meguid et al., 1997). U některých OBX potkanů, v závislosti na zvoleném kmeni, bylo sledováno celkové zvýšení příjmu potravy (Primeaux et al., 2007). Opět ovšem nejsou dostupné literární zdroje, sledující příjem potravy dlouhodobě, v obdobném experimentálním nastavení. První den experimentu je patrná vyšší frekvence návštěvy krmítka u OBX potkanů ve srovnání s kontrolními potkany. Toto by mohlo být přisouzeno tomu, že OBX potkani přijímají potravu v několika menších dávkách. Může se ovšem také jednat o další projev exploračního nového prostředí. Kontrolní potkani, zdá se, první dny v aréně navštěvují krmítko méně ve srovnání s OBX potkany. To by mohlo být dáno rychlejší habituací na prostředí. V následujících dnech frekvence návštěv stoupá a začíná být také patrná v pravidelných intervalech ve tmavé části dne. Pozorovaný efekt by také mohl být obdobou snížení příjmu potravy v důsledku umístění do nového, neznámého prostředí, přičemž příjem potravy se s postupem času upravuje. Toto chování je podkladem testu úzkosti a depresivního chování, nazývaného *novelty suppressed feeding test* (Dulawa & Hen, 2005). V našich výsledcích postupně zvyšování příjmu potravy, s postupnou manifestací rytmicity, s uplynulými dny v aréně u kontrolních potkanů. U OBX potkanů po aplikaci ketaminu také dochází ke zvýšení frekvence návštěvy krmítka v nočních hodinách, zatímco OBX potkani po aplikaci fyziologického roztoku navštěvují krmítko s nižší frekvencí a bez jasně patrné závislosti na denní době. Vzhledem k tomu, že není publikována literatura, která by sledovala podobný parametr v takovém detailu, v jakém je sledován v této práci, je obtížné říci, jakým způsobem lze přesně interpretovat naměřená data. Pozorovaný efekt tak může být projevem reakce na nové prostředí, odlišným potravním příjmem, popřípadě jiným vzorcem potravního chování, jak již bylo publikováno (Meguid et al., 1997), navíc v kontextu cirkadiánní aktivity. V případě hodnocení tohoto parametru je limitující chybějící údaj o celkovém zkonsumovaném množství, přičemž TSE Systems umožňují tento parametr měřit. U CMS potkanů tak byl zjištěn nižší příjem potravy oproti kontrolní skupině (Castelhana-Carlos & Costa, 2014), nutno však říci, že v této práci

naopak chybí hodnocení příjmu potravy v průběhu dne a publikované výsledky tak postrádají rozměr změny příjmu potravy v průběhu času.

Nad rámec parametrů naměřených za použití specializovaného software by bylo vhodné dodat, že v případě manipulace se zvířaty před zahájením behaviorálního měření, v době aplikace a na konci experimentu byla patrná vyšší agresivita OBX potkanů vůči experimentátorovi ve srovnání s potkany kontrolními. Patrně se ovšem jednalo o defenzivní chování, které by podporovalo link k vyšší úzkosti pokusných zvířat (Neumann et al., 2010), přičemž naměřené parametry přítomnosti vyšší anxiety u OBX potkanů podporují. Vliv ketaminu na tento fenotyp není v rozporu s touto myšlenkou, neboť ukázal v některých pracích i anxiolytický účinek (Zhang et al., 2015). Je ovšem třeba mít na paměti, že vzorek sledovaných zvířat je malý a mezi jednotlivými potkany je velký rozptyl naměřených hodnot. Nutno říci, že nízký počet experimentálních zvířat je hlavní limitací této studie. Pro získání dat umožňujících spolehlivou interpretaci a snazší sledování trendů by bylo vhodné zvolit větší počet zvířat. Vhodné by také bylo provést předběžné stanovení míry anxiety a lokomoce u experimentálních zvířat před samotným provedením operace, například pomocí testu otevřeného pole, ke snížení vlivu interindividuálních rozdílů mezi jednotlivými zvířaty na naměřené hodnoty a hodnocené parametry.

Jak je patrné, hodnocené parametry je často obtížné hodnotit ve světle dostupné literatury, neboť prakticky neexistují práce využívající stejný metodologický přístup ve stejném modelu depresivní poruchy. Z tohoto důvodu byly výsledky tohoto experimentu často srovnávány ke studii Castelhana-Carlos & Costa z roku 2014 (Castelhana-Carlos & Costa, 2014), kde byl zvolen podobný experimentální přístup. Navzdory skutečnosti, že v této studii byl použit jiný systém automatizovaného monitorování chování a jiný animální model depresivní poruchy, zdá se, že se výsledky sledovaných parametrů do jisté míry podobají. Toto je zajímavé pozorování, neboť běžně bývá CMS modelu přičítána vyšší validita, než modelu OBX. Samozřejmě není možné tyto práce plně srovnat, neboť náš experiment měl pilotní charakter s nízkým počtem experimentálních zvířat a naopak v práci Castelhana-Carlos & Costa z roku 2014 nebyly měřeny všechny proměnné v takovém rozsahu, v jakém byly měřeny v našem experimentu (Castelhana-Carlos & Costa, 2014). Přesto je zde patrná jistá podobnost mezi modely CMS a OBX. Sledovaný

fenotyp lze dále do jisté míry převádět do fenotypu pozorovaného u depresivního pacienta. Příkladem může být snížená pohybová aktivita, snížení příjmu potravy, či snížený zájem o běhací kolečko, které je jinak pro potkany příjemným stimulem (Castelhano-Carlos & Costa, 2014). Možnost přirovnání sledovaných behaviorálních změn u animálního modelu depresivní poruchy k symptomům patrných u depresivního pacienta je přitom jeden z hlavních a žádaných výstupů validního animálního modelu.

Na závěr je třeba říci, že použitý hardware a software měl své limitace. Vyjma technické závady, vedoucí ke ztrátě dat z běhacího kolečka a množství vypité vody, byly programem vytvářeny příliš velké videosoubory, nahrávané pomocí nestandardních kodeků, což vedlo ke ztížení uchování a manipulace s výslednými soubory. Aparatura sama o sobě byla špatně manipulovatelná, například v případě potřeby manipulace s experimentálním zvířetem, což může také ve svém výsledku vést k ovlivnění experimentálních dat. Automatické sledování zvířete pomocí software probíhalo v případě potkana Long-Evans, který má částečně černé zbarvení, spolehlivě, nicméně vzhledem k potřebě vysokého kontrastu mezi zvířetem a podkladem může být experimentátor limitován volbou konkrétního kmene. Volba různých kmenů přitom může ve svém důsledku opět vést k ovlivnění získaných experimentálních dat (Stöhr et al., 1998). V případě potřeby volby bílého potkana na světlé podestýlce lze problematiku správného rozeznání zvířete softwarem řešit barevným označením, což bylo mimo jiné také v předtestech v naší laboratoři zkoušeno (nepublikované výsledky). Testovaná barevná značení měla ovšem nízkou dobu trvanlivosti a obnovení barevného značení tak bylo třeba opakovat třikrát až čtyřikrát v průběhu behaviorálního měření, což ve svém důsledku znamená zvýšenou manipulaci s experimentálním zvířetem, tedy zásah do žádaného experimentálního protokolu. Automatizované monitorování zvířete na podkladě barevného kontrastu může být dále ovlivněno změnou světelných podmínek, ať se jedná o náhlou změnu osvětlení (při vypnutí a zapnutí světel), vymizení barevné značky, či postupnou kontaminaci podestýlky. V tomto ohledu se sledování zvířete za pomoci implantovaného radiového vysílače jeví jako lepší metodologický přístup (Castelhano-Carlos & Costa, 2014). Dále není v případě této verze Ethovision XT možné sledovat vícero zvířat v jedné aréně, tedy je nutné zvířata po dobu experimentu separovat. Separace ovlivňuje chování experimentálních zvířat a tím tedy i získaná experimentální data (Brain & Benton, 1983; Wilkinson et al., 1994). Radiový vysílač

aplikovaný pod kůži, využívaný v případě použití TSE systems (Castelhano-Carlos & Costa, 2014), tento problém odstraňuje a umožňuje tak spolehlivé sledování většího počtu zvířat současně. Přesto je nutné říci, že škála dat získaná z našich měření ve fenotypizačních boxech je široká a v momentálně dostupné literatuře nemá obdoby.

Přestože použité Phenotyper boxy mají některé výše zmíněné technické limitace, je nutné říci, že tento metodologický přístup má silné stránky. V poměrně krátké době je možné získat rozsáhlé množství dat, získané ze sledování poměrně jednoduchých, a tedy robustních parametrů. Tyto data je také možné získat bez nadměrného zásahu experimentátora do průběhu experimentu a vyhodnocení sledovaných parametrů, což zvyšuje validitu sledovaných behaviorálních dat a reprodukovatelnost mezi jednotlivými laboratořemi. Z revize dostupné literatury je patrné, že automatizované monitorování chování umožňuje získání nových dat, která nejsou v momentální chvíli dostupná. Tento metodologický přístup má tak potenciál rozšířit škálu dostupných informací o sledovaných modelech a umožnit tak lepší pochopení sledovaného animálního modelu a důsledkem toho vyšší citlivost k zaznamenání behaviorálních změn navozených antidepressivní léčbou. Je tedy patrné, že automatizované sledování experimentálního zvířete je cenným prostředkem v experimentálním výzkumu (nejen) depresivní poruchy.

## 8. Závěr

Tato práce byla primárně zaměřena na nové metodologické přístupy ve výzkumu depresivní poruchy v laboratoři Neurofyziologie paměti. Snahou této práce bylo zhodnotit využití automatizovaného monitorování chování ve vyhodnocení behaviorálních dat získaných z experimentů zaměřených na antidepresivní ketaminu. Tento účinek byl měřen v testu nuceného plavání a v animálním modelu olfaktorické bulbektomie. Snahou také bylo stanovit změnu hladiny fosforylovaného mTOR v reakci na podání subanestetické dávky ketaminu, přičemž stanovení bylo prováděno v mozковém homogenátu za pomoci kolorimetrické metody ELISA.

Antidepresivní účinek ketaminu v testu nuceného plavání nebyl v tomto experimentu prokázán, což mohlo být ovlivněno mnohými faktory, jakými jsou volba kmene myši, zvolená dávka aplikované látky, ale i teplota vody, rozměry použitého válce či časový interval aplikace a prováděného testu. Zhodnocení získaných behaviorálních dat za pomoci automatické detekce softwarem bylo v tomto experimentu praktickým přístupem. Tento experiment ovšem ukázal na jisté prvky, které by bylo možné vylepšit, jako je volba jiné kamery, značení zvířat či využití jiného typu osvětlení. Z výsledků je také patrné, že test nuceného plavání je velmi citlivý na zvolený experimentální protokol, což může vést k falešně negativním či pozitivním výsledkům, nemusí se tedy jednat o nejvhodnější test antidepresivního účinku látek.

Sledovaná změna hladiny fosforylovaného mTOR byla v souladu se sledovanými behaviorálními změnami v testu nuceného plavání, tedy aplikace ketaminu hladinu fosforylovaného mTOR nezvýšila. Je ovšem patrné, že i za pomoci metody ELISA je možné stanovit hladinu fosforylovaného mTOR v mozковém homogenátu, což je příznivým výstupem tohoto experimentu.

Předmětem posledního, ovšem nejzásadnějšího experimentu této práce byl pilotní experiment, v němž bylo dlouhodobě automaticky monitorováno chování bulbektomizovaných potkanů, modelu depresivní poruchy. Sledování probíhalo ve fenotypizačních boxech od společnosti Noldus. Sledován byl také vliv ketaminu na tento fenotyp. Antidepresivní vliv ketaminu nebyl v tomto experimentu prokázán, což není překvapivé vzhledem k nízkému počtu zvířat použitému v tomto pilotním experimentu. Přesto lze říci, že byla získána široká škála zajímavých behaviorálních

dat, umožňující sledování doposud nepublikovaných charakteristik tohoto modelu a také změny cirkadiánní aktivity sledovaných zvířat. Ačkoliv bylo použití těchto fenotypizačních boxů spojeno s jistými technickými obtížemi, je nutné říci, že experimentální přístup, vycházející z automatizovaného monitorování chování, ukázal velký potenciál.

## 9. Seznam použité literatury

- aan het Rot, M., Collins, K. A., Murrough, J. W., Perez, A. M., Reich, D. L., Charney, D. S., & Mathew, S. J. (2010). Safety and Efficacy of Repeated-Dose Intravenous Ketamine for Treatment-Resistant Depression. *Biological Psychiatry*, *67*(2), 139–145.
- Abbracchio, M. P., & Burnstock, G. (1994). Purinoceptors: Are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology and Therapeutics*, *64*(3), 445–475.
- Altamura, C., Maes, M., Dai, J., & Meltzer, H. Y. (1995). Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *European Neuropsychopharmacology*, *5*(Suppl. 1), 71–75.
- American Psychiatric Association. (2013). DSM-V. *American Journal of Psychiatry*.
- Anderson, I. M. (2000). Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: A meta-analysis of efficacy and tolerability. *Journal of Affective Disorders*, *58*(1), 19–36.
- Antal-Zimanyi, I., & Khawaja, X. (2009). The role of melanin-concentrating hormone in energy homeostasis and mood disorders. *Journal of Molecular Neuroscience*, *39*(1-2), 86–98.
- Artigas, F. (2015). Developments in the field of antidepressants, where do we go now? *European Neuropsychopharmacology*, *25*(5), 657–670.
- Arundine, M., & Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, *34*(4-5), 325–337.
- Ashton, A. K., Mahmood, A., & Iqbal, F. (2005). Improvements in SSRI/SNRI-induced sexual dysfunction by switching to escitalopram. *Journal of Sex & Marital Therapy*, *31*(3), 257–262.
- Autry, A. E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E. S., Los, M. F., Cheng, P., Kavalali, E.T., Monteggia, L. M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, *475*(7354), 91–95.

- Ayensu, W. K., Pucilowski, O., Mason, G. A., Overstreet, D. H., Rezvani, A. H., & Janowsky, D. S. (1995). Effects of chronic mild stress on serum complement activity, saccharin preference, and corticosterone levels in Flinders lines of rats. *Physiology & Behavior*, *57*(1), 165–169.
- Baca Baldomero, E., Giner Ubago, J., Leal Cercós, C., Vallejo Ruiloba, J., García Calvo, C., & Prieto López, R. (2005). Venlafaxine extended release versus conventional antidepressants in the remission of depressive disorders after previous antidepressant failure: ARGOS study. *Depression and Anxiety*, *22*(2), 68–76.
- Bacchi, F., Mathé, A. A., Jiménez, P., Stasi, L., Arban, R., Gerrard, P., & Caberlotto, L. (2006). Anxiolytic-like effect of the selective Neuropeptide Y Y2 receptor antagonist BIIIE0246 in the elevated plus-maze. *Peptides*, *27*(12), 3202–3207.
- Bailoo, J. D., Bohlen, M. O., & Wahlsten, D. (2010). The precision of video and photocell tracking systems and the elimination of tracking errors with infrared backlighting. *Journal of Neuroscience Methods*, *188*(1), 45–52.
- Barkus, C. (2013). Genetic Mouse Models of Depression. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, *14*, 55–78.
- Basso, A. M., Bratcher, N. A., Gallagher, K. B., Cowart, M. D., Zhao, C., Sun, M., ... Rueter, L. E. (2006). Lack of efficacy of melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonists in models of depression and anxiety. *European Journal of Pharmacology*, *540*(1-3), 115–120.
- Baumeister, D., Barnes, G., Giaroli, G., & Tracy, D. (2014). Classical hallucinogens as antidepressants? A review of pharmacodynamics and putative clinical roles. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, *4*(4), 156–169.
- Bein, H. J. (1978). Prejudices in Pharmacology and Pharmacotherapy: Reserpine as a Model for Experimental Research in Depression. *Pharmacopsychiatry*, *11*(06), 289–293.
- Bergeron, Y., Chagniel, L., Bureau, G., Massicotte, G., & Cyr, M. (2014). mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *7*, 26.



- Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. a, Heninger, G. R., Charney, D. S., & Krystal, J. H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Society of Biological Psychiatry*, *47*(4), 351–354.
- Berrocso, E., Ikeda, K., Sora, I., Uhl, G. R., Sánchez-Blázquez, P., & Mico, J. A. (2013). Active behaviours produced by antidepressants and opioids in the mouse tail suspension test. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, *16*(1), 151–162.
- Bertaina-Anglade, V., la Rochelle, C. D., Boyer, P.-A., & Mocaër, E. (2006). Antidepressant-like effects of agomelatine (S 20098) in the learned helplessness model. *Behavioural Pharmacology*, *17*(8), 703–713.
- Berton, O., Hahn, C.-G., & Thase, M. E. (2012). Are we getting closer to valid translational models for major depression? *Science (New York, N.Y.)*, *338*(6103), 75–79.
- Beyer, C. E., & Hughes, Z. A. (2007). Innovations in CNS drug discovery: Differentiating strategies to treat depression. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *2*(10), 1369–1377.
- Binneman, B., Feltner, D., Kolluri, S., Shi, Y., Qiu, R., & Stiger, T. (2008). A 6-week randomized, placebo-controlled trial of CP-316,311 (a selective CRH1 antagonist) in the treatment of major depression. *American Journal of Psychiatry*, *165*(5), 617–620.
- Bodkin, J. A., Zornberg, G. L., Lukas, S. E., & Cole, J. O. (1995). Buprenorphine treatment of refractory depression. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, *15*(1), 49–57.
- Borowsky, B., Durkin, M. M., Ogozalek, K., Marzabadi, M. R., DeLeon, J., Lagu, B., ... Forray, C. (2002). Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist. *Nature Medicine*, *8*(8), 825–830.
- Boucher, A. A., Arnold, J. C., Hunt, G. E., Spiro, A., Spencer, J., Brown, C., ... Kassiou, M. (2011). Resilience and reduced c-Fos expression in P2X7 receptor knockout mice exposed to repeated forced swim test. *Neuroscience*, *189*, 170–177.

- Brain, P. F., & Benton, D. (1983). Conditions of Housing, Hormones, and Aggressive Behavior. *Hormones and Aggressive Behavior*, 351–372.
- Brambilla, P., Perez, J., Barale, F., Schettini, G., & Soares, J. C. (2003). GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry*, 8(8), 715,721–737.
- Breuer, M. E., Groenink, L., Oosting, R. S., Westenberg, H. G. M., & Olivier, B. (2007). Long-Term Behavioral Changes After Cessation of Chronic Antidepressant Treatment in Olfactory Bulbectomized Rats. *Biological Psychiatry*, 61(8), 990–995.
- Brodaty, H., Luscombe, G., Parker, G., Wilhelm, K., Hickie, I., Austin, M. P., & Mitchell, P. (2001). Early and late onset depression in old age: Different aetiologies, same phenomenology. *Journal of Affective Disorders*, 66(2-3), 225–236.
- Brummelte, S., & Galea, L. A. M. (2010). Depression during pregnancy and postpartum: Contribution of stress and ovarian hormones. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34(5), 766–776.
- Brunner, J., Keck, M. E., Landgraf, R., Uhr, M., Namendorf, C., & Bronisch, T. (2002). Vasopressin in CSF and plasma in depressed suicide attempters: Preliminary results. *European Neuropsychopharmacology*, 12(5), 489–494.
- Bunney, B. G., & Bunney, W. E. (2013). Mechanisms of rapid antidepressant effects of sleep deprivation therapy: Clock genes and circadian rhythms. *Biological Psychiatry*, 73(12), 1164–1171.
- Burgdorf, J., Zhang, X., Nicholson, K. L., Balster, R. L., David Leander, J., Stanton, P. K., ... Moskal, J. R. (2013). GLYX-13, a NMDA Receptor Glycine-Site Functional Partial Agonist, Induces Antidepressant-Like Effects Without Ketamine-Like Side Effects. *Neuropsychopharmacology*, 38(5), 729–742.
- Carlezon, W. A., Béguin, C., Knoll, A. T., & Cohen, B. M. (2009). Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders. *Pharmacology & Therapeutics*, 123(3), 334–343.
- Carr, G. V, Bangasser, D. A., Bethea, T., Young, M., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2009). Antidepressant-Like Effects of  $\kappa$ -Opioid Receptor Antagonists in Wistar Kyoto Rats. *Neuropsychopharmacology*, 35(10), 752–763.

- Carrier, N., & Kabbaj, M. (2013). Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. *Neuropharmacology*, *70*, 27–34.
- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., ... Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science (New York, N.Y.)*, *301*(5631), 386–389.
- Castelhano-Carlos, M., & Costa, P. (2014). PhenoWorld: a new paradigm to screen rodent behavior. *Translational Psychiatry*, *4*(6), e399.
- Catena-Dell'Osso, M., Fagiolini, A., Marazziti, D., Baroni, S., & Bellantuono, C. (2013). Non-monoaminergic targets for the development of antidepressants: focus on neuropeptides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *13*, 2–10.
- Ciraulo, D. A., Shader, R. I., & Greenblatt, D. J. (2011). Clinical pharmacology and therapeutics of antidepressants. *Pharmacotherapy of Depression: Second Edition*, 33–124.
- Clayton, A. H., Pradko, J. F., Croft, H. A., Brendan Montano, C., Leadbetter, R. A., Bolden-Watson, C., ... Metz, A. (2002). Prevalence of sexual dysfunction among newer antidepressants. *Journal of Clinical Psychiatry*, *63*(4), 357–366.
- Costa-Mattioli, M., & Monteggia, L. M. (2013). mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, *16*(11), 1537–1543
- Coyle, C. M., & Laws, K. R. (2015). The use of ketamine as an antidepressant: A systematic review and meta-analysis. *Human Psychopharmacology*, *30*(3), 152–163.
- Cruz, S. L., Soberanes-Chávez, P., Páez-Martínez, N., & López-Rubalcava, C. (2009). Toluene has antidepressant-like actions in two animal models used for the screening of antidepressant drugs. *Psychopharmacology*, *204*(2), 279–286.
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, *23*(5), 238–245.

- Cryan, J. F., Mombereau, C., & Vassout, A. (2005a). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 571–625.
- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005b). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 547–569.
- Czéh, B., Fuchs, E., Wiborg, O., & Simon, M. (2015). Animal models of major depression and their clinical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 64, 293–310.
- David, D. J. P., Renard, C. E., Jolliet, P., Hascoët, M., & Bourin, M. (2003). Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology*, 166(4), 373–382.
- de Pablos, R. M., Villarán, R. F., Argüelles, S., Herrera, A. J., Venero, J. L., Ayala, A., ... Machado, A. (2006). Stress Increases Vulnerability to Inflammation in the Rat Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 26(21), 5709–5719.
- Detke, M. J., Johnson, J., & Lucki, I. (1997). Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 5(2), 107–112.
- Dickens, C., McGowan, L., Clark-Carter, D., & Creed, F. (2002). Depression in rheumatoid arthritis: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Psychosomatic Medicine*, 64(1), 52–60.
- Drugan, R. C., Basile, A. S., Ha, J.-H., Healy, D., & Ferland, R. J. (1997). Analysis of the importance of controllable versus uncontrollable stress on subsequent behavioral and physiological functioning. *Brain Research Protocols*, 2(1), 69–74.
- Dulawa, S. C., & Hen, R. (2005). Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 771–783.
- Duman, R. S., Malberg, J., Nakagawa, S., & D'Sa, C. (2000). Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biological Psychiatry*, 48(8), 732–739.

- Duman, R. S., & Monteggia, L. M. (2006). A Neurotrophic Model for Stress-Related Mood Disorders. *Biological Psychiatry*, *59*(12), 1116–1127.
- Eisch, A. J., Bolaños, C. A., De Wit, J., Simonak, R. D., Pudiak, C. M., Barrot, M., ... Nestler, E. J. (2003). Brain-derived neurotrophic factor in the ventral midbrain-nucleus accumbens pathway: A role in depression. *Biological Psychiatry*, *54*(10), 994–1005.
- El Khoury, A., Gruber, S. H. M., Mørk, A., & Mathé, A. a. (2006). Adult life behavioral consequences of early maternal separation are alleviated by escitalopram treatment in a rat model of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *30*(3), 535–540.
- El Yacoubi, M., Ledent, C., Parmentier, M., Bertorelli, R., Ongini, E., Costentin, J., & Vaugeois, J. M. (2001). Adenosine A2A receptor antagonists are potential antidepressants: evidence based on pharmacology and A2A receptor knockout mice. *Br J Pharmacol*, *134*(1), 68–77.
- Elhwuegi, A. S. (2004). Central monoamines and their role in major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *28*(3), 435–451.
- Fagiolini, A., Comandini, A., Dell'Osso, M. C., & Kasper, S. (2012). Rediscovering trazodone for the treatment of major depressive disorder. *CNS Drugs*, *26*(12), 1033–1049.
- Fan, M., Liu, B., Jiang, T., Jiang, X., Zhao, H., & Zhang, J. (2010). Meta-analysis of the association between the monoamine oxidase-A gene and mood disorders. *Psychiatr Genet Wolters Kluwer Health Psychiatric Genetics*, *20*(20), 1–71.
- Fava, M. (2003). Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biological Psychiatry*, *53*(8), 649–659.
- Ferguson, J. M., & Shingleton, R. N. (2007). An open-label, flexible-dose study of memantine in major depressive disorder. *Clinical Neuropharmacology*, *30*(3), 136–144.

- Fergusson, D., Doucette, S., Glass, K. C., Shapiro, S., Healy, D., Hebert, P., & Hutton, B. (2005). Association between suicide attempts and selective serotonin reuptake inhibitors: systematic review of randomised controlled trials. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 330(7488), 396.
- Fitch, T. E., Benvenga, M. J., Jesudason, C. D., Zink, C., Vandergriff, A. B., Menezes, M. M., ... Rorick-Kehn, L. M. (2014). LSN2424100: A novel, potent orexin-2 receptor antagonist with selectivity over orexin-1 receptors and activity in an animal model predictive of antidepressant-like efficacy. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 5.
- Flockhart, D. A. (2012). Dietary restrictions and drug interactions with monoamine oxidase inhibitors: An update. *Journal of Clinical Psychiatry*, 73(Suppl. 1), 17–24.
- Fogaça, M. V., Galve-Roperh, I., Guimarães, F. S., & Campos, A. C. (2013). Cannabinoids, Neurogenesis and Antidepressant Drugs: Is there a Link? *Current Neuropharmacology*, 11(3), 263–275.
- Forbes, N. F., Stewart, C. A., Matthews, K., & Reid, I. C. (1996). Chronic Mild Stress and Sucrose Consumption: Validity as a Model of Depression. *Physiology & Behavior*, 60(6), 1481–1484.
- Freye, E. M. P. (2010). Toxicity of Datura Stramonium. *Pharmacology and Abuse of Cocaine, Amphetamines, Ecstasy and Related Designer Drugs*, 217–218.
- Furey, M. L., & Drevets, W. C. (2006). Antidepressant efficacy of the antimuscarinic drug scopolamine: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Archives of General Psychiatry*, 63(10), 1121–1129.
- Geraciotti, T. D., Carpenter, L. L., Owens, M. J., Baker, D. G., Ekhtor, N. N., Horn, P. S., ... Nemeroff, C. B. (2006). Elevated Cerebrospinal Fluid Substance P Concentrations in Posttraumatic Stress Disorder and Major Depression. *American Journal of Psychiatry*, 163(4), 637–643.
- Giedke, H., & Schwäzler, F. (2002). Therapeutic use of sleep deprivation in depression. *Sleep Medicine Reviews*, 6(5), 361–377.
- Gillespie, C. F., & Nemeroff, C. B. (2005). Hypercortisolemia and depression. *Psychosomatic Medicine*, 67(Suppl 1.), 26–28.

- Girdler, S. S., Straneva, P. A., Light, K. C., Pedersen, C. A., & Morrow, A. L. (2001). Allopregnanolone levels and reactivity to mental stress in premenstrual dysphoric disorder. *Biological Psychiatry*, *49*(9), 788–797.
- Goldberg, J. L., & Barres, B. A. (2000). The relationship between neuronal survival and regeneration. *Annual Review of Neuroscience*, *23*, 579–612.
- Golden, R. N., Gaynes, B. N., Ekstrom, R. D., Hamer, R. M., Jacobsen, F. M., Suppes, T., ... Nemeroff, C. B. (2005). The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: a review and meta-analysis of the evidence. *American Journal of Psychiatry*, *162*(4), 656–662.
- Gorzalka, B. B., & Hill, M. N. (2011). Putative role of endocannabinoid signaling in the etiology of depression and actions of antidepressants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *35*(7), 1575–1585.
- Griebel, G., Beeské, S., & Stahl, S. M. (2012). The vasopressin V1b receptor antagonist SSR149415 in the treatment of major depressive and generalized anxiety disorders: Results from 4 randomized, double-blind, placebo-controlled studies. *Journal of Clinical Psychiatry*, *73*(11), 1403–1411.
- Griebel, G., Simiand, J., Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Pascal, M., Scatton, B., ... Soubrie, P. (2002). Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(9), 6370–6375.
- Grimm, S., Luborzewski, A., Schubert, F., Merkl, A., Kronenberg, G., Colla, M., ... Bajbouj, M. (2012). Region-specific glutamate changes in patients with unipolar depression. *Journal of Psychiatric Research*, *46*(8), 1059–1065.
- Grunze, H. C., Rainnie, D. G., Hasselmo, M. E., Barkai, E., Hearn, E. F., McCarley, R. W., & Greene, R. W. (1996). NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *Journal of Neuroscience*, *16*(6), 2034–2043.
- Hackett, M. L., Anderson, C. S., House, A., & Xia, J. (2008). Interventions for treating depression after stroke. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *4*.

- Hall, C., & Ballachey, E. L. (1932). A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*, 6, 1–12.
- Hansen, V., Skre, I., & Lund, E. (2008). What is this thing called "SAD"? A critique of the concept of Seasonal Affective Disorder. *Epidemiologia E Psichiatria Sociale*, 17(2), 120–127.
- Harald, B., & Gordon, P. (2012). Meta-review of depressive subtyping models. *Journal of Affective Disorders*, 139(2), 126–140.
- Hasegawa, S., Watanabe, A., Nguyen, K. Q., Debonnel, G., & Diksic, M. (2005). Chronic administration of citalopram in olfactory bulbectomy rats restores brain 5-HT synthesis rates: An autoradiographic study. *Psychopharmacology*, 179(4), 781–790.
- Hasler, G. (2010). Pathophysiology of depression: do we have any solid evidence of interest to clinicians? *World Psychiatry : Official Journal of the World Psychiatric Association (WPA)*, 9(3), 155–161.
- Hasler, G., van der Veen, J. W., Tumonis, T., Meyers, N., Shen, J., Drevets, W. C., ... CA, Z. (2007). Reduced Prefrontal Glutamate/Glutamine and  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Levels in Major Depression Determined Using Proton Magnetic Resonance Spectroscopy. *Archives of General Psychiatry*, 64(2), 193.
- Hayase, T., Yamamoto, Y., & Yamamoto, K. (2006). Behavioral effects of ketamine and toxic interactions with psychostimulants. *BMC Neuroscience*, 7, 25.
- Haynes, L. ., Griffiths, M. ., Hyde, R. ., Barber, D. ., & Mitchell, I. . (2001). Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience*, 104(1), 57–69.
- Hédou, G., Pryce, C., Di Iorio, L., Heidbreder, C. a, & Feldon, J. (2001). An automated analysis of rat behavior in the forced swim test. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 70(1), 65–76.
- Hecht, D. (2010). Depression and the hyperactive right-hemisphere. *Neuroscience Research*, 68(2), 77–87.



- Heim, C., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H., & Nemeroff, C. B. (2008). The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology*, *33*(6), 693–710.
- Hendriksen, H., Mechiel Korte, S., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2015). The olfactory bulbectomy model in mice and rat: One story or two tails? *European Journal of Pharmacology*, *753*, 105–113.
- Henkel, V., Mergl, R., Allgaier, A. K., Kohlen, R., Möller, H. J., & Hegerl, U. (2006). Treatment of depression with atypical features: A meta-analytic approach. *Psychiatry Research*, *141*(1), 89–101.
- Herrmann, L. L., Goodwin, G. M., & Ebmeier, K. P. (2007). The cognitive neuropsychology of depression in the elderly. *Psychological Medicine*, *37*(12), 1693–1702.
- Herrmann, L. L., Le Masurier, M., & Ebmeier, K. P. (2008). White matter hyperintensities in late life depression: a systematic review. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *79*(6), 619–624.
- Hill, M. N., & Gorzalka, B. B. (2005). Pharmacological enhancement of cannabinoid CB1 receptor activity elicits an antidepressant-like response in the rat forced swim test. *European Neuropsychopharmacology*, *15*(6), 593–599.
- Hodgson, R. A., Higgins, G. A., Guthrie, D. H., Lu, S. X., Pond, A. J., Mullins, D. E., ... Varty, G. B. (2007). Comparison of the V1b antagonist, SSR149415, and the CRF1 antagonist, CP-154,526, in rodent models of anxiety and depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *86*(3), 431–440.
- Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences*, *33*(2), 67–75.
- Hollis, F., & Kabbaj, M. (2014). Social defeat as an animal model for depression. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, *55*(2), 221–232.
- Hollis, F., Wang, H., Dietz, D., Gunjan, A., & Kabbaj, M. (2010). The effects of repeated social defeat on long-term depressive-like behavior and short-term histone modifications in the hippocampus in male Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*, *211*(1), 69–77.

- Holm, K. J., & Markham, A. (1999). Mirtazapine: A review of its use in major depression. *Drugs*, 57(4), 607–631.
- Holubova, K., Kleteckova, L., Skurlova, M., Riczny, J., Stuchlik, A., & Vales, K. (2016). Rapamycin blocks the antidepressant effect of ketamine in task-dependent manner. *Psychopharmacology*, 233(11), 2077–2097.
- Holubova, K., Nekovarova, T., Pistovcakova, J., Sulcova, A., Stuchlík, A., & Vales, K. (2014). Pregnanolone Glutamate, a Novel Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor, Exerts Antidepressant-Like Properties in Animal Models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 130.
- Homayoun, H., & Moghaddam, B. (2007). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(43), 11496–11500.
- Howland, R. H. (2009). An overview of seasonal affective disorder and its treatment options. *The Physician and Sportsmedicine*, 37(4), 104–115.
- Howland, R. H. (2010). Use of endocrine hormones for treating depression. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, 48(12), 13–16.
- Huhman, K. L. (2006). Social conflict models: Can they inform us about human psychopathology? *Hormones and Behavior*, 50(4), 640–646.
- Chaki, S., Shimazaki, T., Nishiguchi, M., Funakoshi, T., Iijima, M., Ito, A., ... Sekiguchi, Y. (2015). Antidepressant/anxiolytic potential and adverse effect liabilities of melanin-concentrating hormone receptor 1 antagonists in animal models. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 135, 154–168.
- Chambliss, H. O., Van Hoomissen, J. D., Holmes, P. V., Bunnell, B. N., & Dishman, R. K. (2004). Effects of chronic activity wheel running and imipramine on masculine copulatory behavior after olfactory bulbectomy. *Physiology and Behavior*, 82(4), 593–600.
- Chen, H. S. V., & Lipton, S. A. (2006). The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1611–1626.

- Choudary, P. V, Molnar, M., Evans, S. J., Tomita, H., Li, J. Z., Vawter, M. P., ... Jones, E. G. (2005). Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15653–15658.
- Chourbaji, S., Zacher, C., Sanchis-Segura, C., Dormann, C., Vollmayr, B., & Gass, P. (2005). Learned helplessness: Validity and reliability of depressive-like states in mice. *Brain Research Protocols*, 16(1-3), 70–78.
- Iijima, M., Fukumoto, K., & Chaki, S. (2012). Acute and sustained effects of a metabotropic glutamate 5 receptor antagonist in the novelty-suppressed feeding test. *Behavioural Brain Research*, 235(2), 287–292.
- Ishizaki, J., & Mimura, M. (2011). Dysthymia and apathy: Diagnosis and treatment. *Depression Research and Treatment*, 2011.
- Jernigan, C. S., Goswami, D. B., Austin, M. C., Iyo, A. H., Chandran, A., Stockmeier, C. A., & Karolewicz, B. (2011). The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35(7), 1774–1779.
- Juszczak, G. R., Lisowski, P., Śliwa, A. T., & Swiergiel, A. H. (2008). Computer assisted video analysis of swimming performance in a forced swim test: Simultaneous assessment of duration of immobility and swimming style in mice selected for high and low swim-stress induced analgesia. *Physiology & Behavior*, 95(3), 400–407.
- Karege, F., Vaudan, G., Schwald, M., Perroud, N., & La Harpe, R. (2005). Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 136(1-2), 29–37.
- Kato, M., & Serretti, A. (2010). Review and meta-analysis of antidepressant pharmacogenetic findings in major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 15(5), 473–500.
- Kato, N. (2009). Neurophysiological mechanisms of electroconvulsive therapy for depression. *Neuroscience Research*, 64(1), 3–11.

- Katz, R. J. (1981). Animal model of depression: effects of electroconvulsive shock therapy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 5(2), 273–277.
- Kelly, J. P., & Leonard, B. E. (1996). Effects of chronic desipramine on waiting behaviour for a food reward in olfactory bulbectomized rats. *Journal of Psychopharmacology*, 10(2), 153–156.
- Kessler, R. C. (1997). The Effects of Stressful Life Events on Depression. *Annual Review of Psychology*, 48, 191–214.
- Kessler, R. C., & Bromet, E. J. (2013). The epidemiology of depression across cultures. *Annual Review of Public Health*, 34, 119–138.
- Khisti, R. T., Chopde, C. T., & Jain, S. P. (2000). Antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one in mice forced swim test. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(1), 137–143.
- Klann, E., Antion, M. D., Banko, J. L., & Hou, L. (2004). Synaptic plasticity and translation initiation. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 11(4), 365–372.
- Koike, H., Iijima, M., & Chaki, S. (2011). Involvement of AMPA receptor in both the rapid and sustained antidepressant-like effects of ketamine in animal models of depression. *Behavioural Brain Research*, 224(1), 107–111.
- Koike, H., Iijima, M., & Chaki, S. (2013). Effects of ketamine and LY341495 on the depressive-like behavior of repeated corticosterone-injected rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 107, 20–23.
- Kuhn, R. (1958). The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *The American Journal of Psychiatry*, 115(5), 459–464.
- Kulkarni, S. K., & Dhir, A. (2007). Effect of various classes of antidepressants in behavioral paradigms of despair. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 31(6), 1248–1254.
- Kupfer, D. J., Frank, E., & Phillips, M. L. (2012). Major depressive disorder: New clinical, neurobiological, and treatment perspectives. *The Lancet*, 379(9820), 1045–1055.

- Kurre Nielsen, C., Arnt, J., & Sánchez, C. (2000). Intracranial self-stimulation and sucrose intake differ as hedonic measures following chronic mild stress: interstrain and interindividual differences. *Behavioural Brain Research*, *107*(1-2), 21–33.
- Landgraf, D., Long, J. E., & Welsh, D. K. (2015). Depression-like behaviour in mice is associated with disrupted circadian rhythms in nucleus accumbens and periaqueductal grey. *The European Journal of Neuroscience*, *43*(10), 1309–1320.
- Lapidus, K. A. B., Levitch, C. F., Perez, A. M., Brallier, J. W., Parides, M. K., Soleimani, L., ... Murrough, J. W. (2014). A randomized controlled trial of intranasal ketamine in major depressive disorder. *Biological Psychiatry*, *76*(12), 970–976.
- Lehmann, J., & Feldon, J. (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the Neurosciences*, *11*(4), 383–408.
- Leibrock, C., Ackermann, T. F., Hierlmeier, M., Lang, F., Borgwardt, S., & Lang, U. E. (2013). Akt2 deficiency is associated with anxiety and depressive behavior in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *32*(3), 766–777.
- Li, J. Z., Bunney, B. G., Meng, F., Hagenauer, M. H., Walsh, D. M., Vawter, M. P., ... Bunney, W. E. (2013). Circadian patterns of gene expression in the human brain and disruption in major depressive disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(24), 9950–9955.
- Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., ... Duman, R. S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science (New York, N.Y.)*, *329*(5994), 959–964.
- Li, X., & Jope, R. S. (2010). Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *35*(11), 2143–2154.

- Li, X., Zhu, W., Roh, M.-S., Friedman, A. B., Rosborough, K., & Jope, R. S. (2004). In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 29, 1426–1431.
- Lucki, I. (1997). The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behavioural Pharmacology*, 8(6-7), 523–532.
- Lumia, A. R., Teicher, M. H., Salchli, F., Ayers, E., & Possidente, B. (1992). Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression. *Brain Research*, 587(2), 181–185.
- Luscher, B., Shen, Q., & Sahir, N. (2011). The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Molecular Psychiatry*, 16(4), 383–406.
- Lutter, M., Krishnan, V., Russo, S. J., Jung, S., McClung, C. A., & Nestler, E. J. (2008). Orexin signaling mediates the antidepressant-like effect of calorie restriction. *J Neurosci*, 28(12), 3071–3075.
- Lutz, P.-E., & Kieffer, B. L. (2013). Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends in Neurosciences*, 36(3), 195–206.
- Lykouras, L., & Gournellis, R. (2009). Psychotic (delusional) major depression: New vistas. *Current Psychiatry Reviews*, 5(1), 1–28.
- Lyons, W. E., Mamounas, L. a, Ricaurte, G. a, Coppola, V., Reid, S. W., Bora, S. H., ... Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(26), 15239–15244.
- Ma, X. C., Dang, Y. H., Jia, M., Ma, R., Wang, F., Wu, J., ... Hashimoto, K. (2013). Long-Lasting Antidepressant Action of Ketamine, but Not Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibitor SB216763, in the Chronic Mild Stress Model of Mice. *PLoS ONE*, 8(2), e56053.
- Maclsaac, S. E., Carvalho, A. F., Cha, D. S., Mansur, R. B., & McIntyre, R. S. (2014). The mechanism, efficacy, and tolerability profile of agomelatine. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 15(2), 259–274.

- MacQueen, G. M., Campbell, S., McEwen, B. S., Macdonald, K., Amano, S., Joffe, R. T., ... Young, L. T. (2003). Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(3), 1387–1392.
- Malberg, J. E., & Duman, R. S. (2003). Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *28*(9), 1562–1571.
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *20*(24), 9104–9110.
- Mansbach, R. S., Brooks, E. N., & Chen, Y. L. (1997). Antidepressant-like effects of CP-154,526, a selective CRF1 receptor antagonist. *European Journal of Pharmacology*, *323*(1), 21–26.
- Mar, A., Spreekmeester, E., & Rochford, J. (2000). Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. *Psychopharmacology*, *150*(1), 52–60.
- Matthews, K., Forbes, N., & Reid, I. C. (1995). Sucrose consumption as an hedonic measure following chronic unpredictable mild stress. *Physiology & Behavior*, *57*(2), 241–248.
- Mayeux, R., Stern, Y., Rosen, J., & Leventhal, J. (1981). Depression, intellectual impairment, and Parkinson disease. *Neurology*, *31*(6), 645–650.
- Mayorga, A. J., & Lucki, I. (2001). Limitations on the use of the C57BL/6 mouse in the tail suspension test. *Psychopharmacology*, *155*(1), 110–112.
- McClung, C. A. (2007). Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, *114*(2), 222–232.
- McGowan, P. O., Sasaki, A., D'Alessio, A. C., Dymov, S., Labonté, B., Szyf, M., ... Meaney, M. J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience*, *12*(3), 342–348.

- McKinney, W. T., & Bunney, W. E. (1969). Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Archives of General Psychiatry*, 21(2), 240–248.
- Meguid, M. M., Koseki, M., Yang, Z. J., Gleason, J. R., & Laviano, A. (1997). Acute adaptive changes in food intake pattern following olfactory ablation in rats. *Neuroreport*, 8(6), 1439–1444.
- Méndez-Andino, J. L., & Wos, J. A. (2007). MCH-R1 antagonists: what is keeping most research programs away from the clinic? *Drug Discovery Today*, 12(21-22), 972–979.
- Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M. O., & Anisman, H. (2004). Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(6), 1478–1485.
- Mieda, M., & Sakurai, T. (2012). Overview of orexin/hypocretin system. *Progress in Brain Research*, 198, 5–14.
- Mineur, Y. S., Obayemi, A., Wigestrang, M. B., Fote, G. M., Calarco, C. A., Li, A. M., & Picciotto, M. R. (2013). Cholinergic signaling in the hippocampus regulates social stress resilience and anxiety- and depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3573–3578.
- Mohr, P., Rodriguez, M., Slavíčková, A., & Hanka, J. (2011). The application of vagus nerve stimulation and deep brain stimulation in depression. *Neuropsychobiology*, 64(3), 170–181.
- Molina-Hernández, M., Tellez-Alcántara, N. P., Pérez García, J., Olivera Lopez, J. I., & Teresa Jaramillo, M. (2005). Antidepressant-like actions of intra-accumbens infusions of allopregnanolone in ovariectomized Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 80(3), 401–409.
- Monleon, S., & Aquila, P., Parra, A., Simon, V. M., Brain, P. F., & Willner, P. (1995). Attenuation of sucrose consumption in mice by chronic mild stress and its restoration by imipramine. *Psychopharmacology*, 117(4), 453–457.



- Monteggia, L. M., Gideons, E., & Kavalali, E. T. (2013). The role of eukaryotic elongation factor 2 kinase in rapid antidepressant action of ketamine. *Biological Psychiatry*, *73*(12), 1199–1203.
- Morales-Medina, J. C., Dumont, Y., Bonaventure, P., & Quirion, R. (2012). Chronic administration of the Y2 receptor antagonist, JNJ-31020028, induced antidepressant like-behaviors in olfactory bulbectomized rat. *Neuropeptides*, *46*(6), 329–334.
- Moreau, J. L., Jenck, F., Martin, J. R., Mortas, P., & Haefely, W. E. (1992). Antidepressant treatment prevents chronic unpredictable mild stress-induced anhedonia as assessed by ventral tegmentum self-stimulation behavior in rats. *European Neuropsychopharmacology*, *2*(1), 43–49.
- Morera, A. L., & Abreu, P. (2006). Seasonality of psychopathology and circannual melatonin rhythm. *Journal of Pineal Research*, *41*(3), 279–283.
- Morrow, A. L. (2007). Recent developments in the significance and therapeutic relevance of neuroactive steroids — Introduction to the special issue. *Pharmacology & Therapeutics*, *116*(1), 1–6.
- Müller, M. B., Lucassen, P. J., Yassouridis, A., Hoogendijk, W. J. G., Holsboer, F., & Swaab, D. F. (2001). Neither major depression nor glucocorticoid treatment affects the cellular integrity of the human hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, *14*(10), 1603–1612.
- Murrough, J. W., Iosifescu, D. V., Chang, L. C., Al Jurdi, R. K., Green, C. E., Perez, A. M., ... Mathew, S. J. (2013). Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: A two-site randomized controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, *170*(10), 1134–1142.
- Mutlu, O., Gumuslu, E., Ulak, G., Celikyurt, I. K., Kokturk, S., Kir, H. M., ... Erden, F. (2012). Effects of fluoxetine, tianeptine and olanzapine on unpredictable chronic mild stress-induced depression-like behavior in mice. *Life Sciences*, *91*(25-26), 1252–1262.

- Naninck, E. F. G., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazic, S. E., Lucassen, P. J., & Korosi, A. (2015). Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. *Hippocampus*, 25(3), 309–328.
- Nemeroff, C. B. (1996). The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions. *Molecular Psychiatry*, 1(4), 336–342.
- Neumann, I. D., Veenema, A. H., & Beiderbeck, D. I. (2010). Aggression and anxiety: social context and neurobiological links. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4, 12.
- Neumeister, A., Nugent, A. C., Waldeck, T., Geraci, M., Schwarz, M., Bonne, O., ... Drevets, W. C. (2004). Neural and behavioral responses to tryptophan depletion in unmedicated patients with remitted major depressive disorder and controls. *Archives of General Psychiatry*, 61(8), 765–773.
- Niciu, M. J., Ionescu, D. F., Richards, E. M., & Zarate, C. a. (2013). Glutamate and its receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 121(8), 907–924.
- Nielsen, D. M., Carey, G. J., & Gold, L. H. (2004). Antidepressant-like activity of corticotropin-releasing factor type-1 receptor antagonists in mice. *European Journal of Pharmacology*, 499(1-2), 135–146.
- Nollet, M., Gaillard, P., Minier, F., Tanti, A., Belzung, C., & Leman, S. (2011). Activation of orexin neurons in dorsomedial/perifornical hypothalamus and antidepressant reversal in a rodent model of depression. *Neuropharmacology*, 61(1), 336–346.
- Norman, T. R., Cranston, I., Irons, J. A., Gabriel, C., Dekeyne, A., Millan, M. J., & Mocaër, E. (2012). Agomelatine suppresses locomotor hyperactivity in olfactory bulbectomised rats: A comparison to melatonin and to the 5-HT<sub>2c</sub> antagonist, S32006. *European Journal of Pharmacology*, 674(1), 27–32.
- O'Neil, M. F., & Moore, N. A. (2003). Animal models of depression: Are there any? *Human Psychopharmacology*, 18(4), 239–254.

- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), 419–427.
- Oleson, E. B., & Cheer, J. F. (2012). A brain on cannabinoids: The role of dopamine release in reward seeking. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a012229.
- Osório, F. de L., Sanches, R. F., Macedo, L. R., dos Santos, R. G., Maia-de-Oliveira, J. P., Wichert-Ana, L., ... Hallak, J. E. (2015). Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 37(1), 13–20.
- Overmier, J. B., & Seligman, M. E. (1967). Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63(1), 28–33.
- Overstreet, D. H. (1993). The flinders sensitive line rats: A genetic animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17(1), 51–68.
- Overstreet, D. H., & Wegener, G. (2013). The flinders sensitive line rat model of depression--25 years and still producing. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 143–155.
- Padiath, Q. S., Paranjpe, D., Jain, S., & Sharma, V. K. (2004). Glycogen synthase kinase 3beta as a likely target for the action of lithium on circadian clocks. *Chronobiology International*, 21(1), 43–55.
- Papp, M., Gruca, P., Boyer, P. A., & Mocaer, E. (2003). Effect of agomelatine in the chronic mild stress model of depression in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 28(4), 694–703.
- Parise, E. M., Alcantara, L. F., Warren, B. L., Wright, K. N., Hadad, R., Sial, O. K., ... Bolaños-Guzmán, C. A. (2013). Repeated ketamine exposure induces an enduring resilient phenotype in adolescent and adult rats. *Biological Psychiatry*, 74(10), 750–759.
- Parker, G., Fink, M., Shorter, E., Taylor, M. A., Akiskal, H., Berrios, G., ... Swartz, C. (2010). Issues for DSM-5: Whither melancholia? The case for its classification as a distinct mood disorder. *American Journal of Psychiatry*, 167(7), 745–747.

- Parry, B. L., Fernando Martínez, L., Maurer, E. L., López, A. M., Sorenson, D., & Meliska, C. J. (2006). Sleep, rhythms and women's mood. Part II. Menopause. *Sleep Medicine Reviews, 10*(3), 197–208.
- Patten, S. B., & Barbui, C. (2004). Drug-induced depression: A systematic review to inform clinical practice. *Psychotherapy and Psychosomatics, 73*(4), 207–215.
- Paykel, E. S. (2008). Basic concepts of depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience, 10*(3), 279–289.
- Payne, J. L., Palmer, J. T., & Joffe, H. (2009). A reproductive subtype of depression: conceptualizing models and moving toward etiology. *Harvard Review of Psychiatry, 17*(2), 72–86.
- Perez-Caballero, L., Torres-Sanchez, S., Bravo, L., Mico, J. A., & Berrocoso, E. (2014). Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development. *Expert Opinion on Drug Discovery, 9*, 567–578.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., & Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology, 177*(3), 245–255.
- Petty, F., & Sherman, A. D. (1984). Plasma GABA levels in psychiatric illness. *Journal of Affective Disorders, 6*(2), 131–138.
- Pilc, A., Wierońska, J. M., & Skolnick, P. (2013). Glutamate-based antidepressants: Preclinical psychopharmacology. *Biological Psychiatry, 73*(12), 1125–1132.
- Piñeyro, G., & Blier, P. (1996). Regulation of 5-hydroxytryptamine release from rat midbrain raphe nuclei by 5-hydroxytryptamine<sub>1D</sub> receptors: effect of tetrodotoxin, G protein inactivation and long-term antidepressant administration. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 276*(2), 697–707.
- Popik, P., Kos, T., Sowa-Kućma, M., & Nowak, G. (2008). Lack of persistent effects of ketamine in rodent models of depression. *Psychopharmacology, 198*(3), 421–430.
- Porsolt, R. D. (2000). Animal models of depression: utility for transgenic research. *Reviews in the Neurosciences, 11*(1), 53–8.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature, 266*(5604), 730–732.

- Portella, M. J., de Diego-Adeliño, J., Puigdemont, D., Pérez-Egea, R., Álvarez, E., Artigas, F., & Pérez, V. (2009). Pindolol augmentation enhances response outcomes in first depressive episodes. *European Neuropsychopharmacology*, *19*(7), 516–519.
- Possidente, B., Lumia, A. R., McGinnis, M. Y., Rapp, M., & McEldowney, S. (1996). Effects of fluoxetine and olfactory bulbectomy on mouse circadian activity rhythms. *Brain Research*, *713*(1-2), 108–113.
- Posternak, M. a. (2003). Biological markers of atypical depression. *Harvard Review of Psychiatry*, *11*(1), 1–7.
- Preskorn, S., Macaluso, M., Mehra, D. O., Zammit, G., Moskal, J. R., Burch, R. M., & Group, G.-13 C. S. (2015). Randomized Proof of Concept Trial of GLYX-13, an N-Methyl-D-Aspartate Receptor Glycine Site Partial Agonist, in Major Depressive Disorder Nonresponsive to a Previous Antidepressant Agent. *Journal of Psychiatric Practice*, *21*(2), 140–149.
- Primeaux, S. D., Barnes, M. J., & Bray, G. A. (2007). Olfactory bulbectomy increases food intake and hypothalamic neuropeptide Y in obesity-prone but not obesity-resistant rats. *Behavioural Brain Research*, *180*(2), 190–196.
- Pucak, M. L., Carroll, K. A. L., Kerr, D. A., & Kaplin, A. I. (2007). Neuropsychiatric manifestations of depression in multiple sclerosis: Neuroinflammatory, neuroendocrine, and neurotrophic mechanisms in the pathogenesis of immune-mediated depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *9*(2), 125–139.
- Puigdemont, D., Pérez-Egea, R., Portella, M. J., Molet, J., de Diego-Adeliño, J., Gironell, A., ... Pérez, V. (2012). Deep brain stimulation of the subcallosal cingulate gyrus: further evidence in treatment-resistant major depression. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *15*(01), 121–133.
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Wei, J., Dilley, G., Pittman, S. D., Meltzer, H. Y., ... Stockmeier, C. A. (1999). Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biological Psychiatry*, *45*(9), 1085–1098.

- Rajkowska, G., O'Dwyer, G., Teleki, Z., Stockmeier, C. A., & Miguel-Hidalgo, J. J. (2007). GABAergic neurons immunoreactive for calcium binding proteins are reduced in the prefrontal cortex in major depression. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(2), 471–482.
- Ratti, E., Bellew, K., Bettica, P., Bryson, H., Zamuner, S., Archer, G., ... Fernandes, S. (2011). Results from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled studies of the novel NK1 receptor antagonist casopitant in patients with major depressive disorder. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 31(6), 727–733.
- Rau, A., Grossheinrich, N., Palm, U., Pogarell, O., & Padberg, F. (2007). Transcranial and deep brain stimulation approaches as treatment for depression. *Clinical EEG and Neuroscience: Official Journal of the EEG and Clinical Neuroscience Society (ENCS)*, 38(2), 105–115.
- Renard, C. E., Dailly, E., David, D. J. P., Hascoet, M., & Bourin, M. (2003). Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, 17(4), 449–455.
- Reynolds, I. J., & Miller, R. J. (1988). Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc. *British Journal of Pharmacology*, 95(1), 95–102.
- Rice, C. J., Sandman, C. A., Lenjavi, M. R., & Baram, T. Z. (2008). A novel mouse model for acute and long-lasting consequences of early life stress. *Endocrinology*, 149(10), 4892–4900.
- Ripoll, N., David, D. J. P., Dailly, E., Hascoët, M., & Bourin, M. (2003). Antidepressant-like effects in various mice strains in the tail suspension test. *Behavioural Brain Research*, 143(2), 193–200.
- Risch, N., Herrell, R., Lehner, T., Liang, K.-Y., Eaves, L., Hoh, J., ... Merikangas, K. R. (2009). Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA*, 301(23), 2462–2471.

- Rohan, K., Roecklein, K., & Haaga, D. (2009). Biological and Psychological Mechanisms of Seasonal Affective Disorder: A Review and Integration. *Current Psychiatry Reviews*, 5(1), 37–47.
- Roche, M., Harkin, A., & Kelly, J. P. (2007). Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(6), 1312–1320.
- Rotenberg, V. S. (2008). Functional brain asymmetry as a determinative factor in the treatment of depression: theoretical implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(8), 1772–1777.
- Rush, a J. (2007). The varied clinical presentations of major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*, 68 Suppl 8(MDD), 4–10.
- Russell, J. M., Koran, L. M., Rush, J., Hirschfeld, R. M. A., Harrison, W., Friedman, E. S., ... Keller, M. (2001). Effect of concurrent anxiety on response to sertraline and imipramine in patients with chronic depression. *Depression and Anxiety*, 13(1), 18–27.
- Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Fuchs, E., Rütger, E., & Havemann-Reinecke, U. (2005). Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behavioural Brain Research*, 162(1), 127–134.
- Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Hiemke, C., Fuchs, E., Rütger, E., & Havemann-Reinecke, U. (2006). Citalopram counteracts depressive-like symptoms evoked by chronic social stress in rats. *Behavioural Pharmacology*, 17(1), 19–29.
- Sahay, A., & Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience*, 10(9), 1110–1115.
- Sanacora, G., Mason, G. F., Rothman, D. L., Behar, K. L., Hyder, F., Petroff, O. a, ... Krystal, J. H. (1999). Reduced cortical gamma-aminobutyric acid levels in depressed patients determined by proton magnetic resonance spectroscopy. *Archives of General Psychiatry*, 56(11), 1043–1047.
- Scott, A. J. (2000). Shift work and health. *Primary Care*, 27(4), 1057–1079.

- Sen, S., Duman, R., & Sanacora, G. (2008). Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Antidepressant Medications: Meta-Analyses and Implications. *Biological Psychiatry*, *64*(6), 527–532.
- Settle, E. C., Stahl, S. M., Batey, S. R., Johnston, J. A., & Ascher, J. A. (1999). Safety profile of sustained-release bupropion in depression: Results of three clinical trials. *Clinical Therapeutics*, *21*(3), 454–463.
- Seymour, P. a, Schmidt, A. W., & Schulz, D. W. (2003). The pharmacology of CP-154,526, a non-peptide antagonist of the CRH1 receptor: a review. *CNS Drug Reviews*, *9*(1), 57–96.
- Sheline, Y. I., Gado, M. H., & Kraemer, H. C. (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *American Journal of Psychiatry*, *160*(8), 1516–1518.
- Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., & Vannier, M. W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(9), 3908–13.
- Shimizu, E., Hashimoto, K., Okamura, N., Koike, K., Komatsu, N., Kumakiri, C., ... Iyo, M. (2003). Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biological Psychiatry*, *54*(1), 70–75.
- Shirayama, Y., Chen, A. C.-H., Nakagawa, S., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(8), 3251–3261.
- Shirayama, Y., Yang, C., Zhang, J.-C., Ren, Q., Yao, W., & Hashimoto, K. (2015). Alterations in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain regions of a learned helplessness rat model and the antidepressant effects of a TrkB agonist and antagonist. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *25*(12), 2449–2458.
- Shulman, K. I., Herrmann, N., & Walker, S. E. (2013). Current place of monoamine oxidase inhibitors in the treatment of depression. *CNS Drugs*, *27*(10), 789–797.



- Schechter, L. E., Ring, R. H., Beyer, C. E., Hughes, Z. A., Khawaja, X., Malberg, J. E., & Rosenzweig-Lipson, S. (2005). Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 2(4), 590–611.
- Schildkraut, J. J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The American Journal of Psychiatry*, 122(5), 509–522.
- Schmidt, M. V., Wang, X. D., & Meijer, O. C. (2011). Early life stress paradigms in rodents: Potential animal models of depression? *Psychopharmacology*, 214(1), 131–140.
- Schuklenk, U., & Vathorst, S. V. D. (2015). Treatment-resistant major depressive disorder and assisted dying. *Journal of Medical Ethics*, 0, 1–7.
- Schule, C., TC, B., Eser, D., & Rupprecht, R. (2009). Hypothalamic-pituitary-adrenocortical system dysregulation and new treatment strategies in depression. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 9(7), 1005–1019.
- Sidor, M. M. (2012). Psychiatry's age of enlightenment: optogenetics and the discovery of novel targets for the treatment of psychiatric disorders. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 37(1), 4.
- Skalisz, L. (2002). Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression–Parkinson's disease association. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(5), 879–883.
- Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2014). The ups and downs of modelling mood disorders in rodents. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 55(2), 297–309.
- Smith, S. (2002). Diabetic retinopathy and the NMDA receptor. *Drug News & Perspectives*, 15(4), 226–232.
- Soares, C. N., & Zitek, B. (2008). Reproductive hormone sensitivity and risk for depression across the female life cycle: A continuum of vulnerability? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 33(4), 331–343.
- Song, C., & Leonard, B. E. (2005). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 627–647.

- Sou tre, E., Salvati, E., Belugou, J. L., Pringuey, D., Candito, M., Krebs, B., ...  
 Darcourt, G. (1989). Circadian rhythms in depression and recovery: Evidence for blunted amplitude as the main chronobiological abnormality. *Psychiatry Research*, 28(3), 263–278.
- Spencer, S. J., Xu, L., Clarke, M. A., Lemus, M., Reichenbach, A., Geenen, B., ...  
 Andrews, Z. B. (2012). Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biological Psychiatry*, 72(6), 457–465.
- Sperlagh, B., Csolle, C., Ando, R. D., Goloncser, F., Kittel, A., & Baranyi, M. (2012).  
 The role of purinergic signaling in depressive disorders.  
*Neuropsychopharmacologia Hungarica : A Magyar Pszichofarmakol giai Egyes let Lapja = Official Journal of the Hungarian Association of Psychopharmacology*, 14(4), 231–238.
- Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85(3), 367–370.
- Stock, H. S., Ford, K., & Wilson, M. A. (2000). Gender and gonadal hormone effects in the olfactory bulbectomy animal model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(1), 183–191.
- Stockert, M., Serra, J., & De Robertis, E. (1988). Effect of olfactory bulbectomy and chronic amitryptiline treatment in rats. 3H-imipramine binding and behavioral analysis by swimming and open field tests. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 29(4), 681–686.
- St hr, T., Wermeling, D. S., Weiner, I., & Feldon, J. (1998). Rat Strain Differences in Open-Field Behavior and the Locomotor Stimulating and Rewarding Effects of Amphetamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 59(4), 813–818.
- Str hle, a, Romeo, E., Hermann, B., Pasini, a, Spalletta, G., di Michele, 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. *Biological Psychiatry*, 45(3), 274–277.

- Sullivan, P. F., Neale, M. C., & Kendler, K. S. (2000). Genetic epidemiology of major depression: Review and meta-analysis. *American Journal of Psychiatry*, *157*(10), 1552–1562.
- Swaab, D. F., Bao, A. M., & Lucassen, P. J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, *4*(2), 141–194.
- Takamori, K., Yoshida, S., & Okuyama, S. (2001). Availability of learned helplessness test as a model of depression compared to a forced swimming test in rats. *Pharmacology*, *63*(3), 147–153.
- Takei, N., & Nawa, H. (2014). mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *7*, 28.
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(1), 467–472.
- Taylor, D., Lenox-Smith, A., & Bradley, A. (2013). A review of the suitability of duloxetine and venlafaxine for use in patients with depression in primary care with a focus on cardiovascular safety, suicide and mortality due to antidepressant overdose. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, *3*(3), 151–161.
- Taylor, M. A., & Fink, M. (2008). Restoring melancholia in the classification of mood disorders. *Journal of Affective Disorders*, *105*(1-3), 1–14.
- Thase, M. E. (2007). Recognition and diagnosis of atypical depression. *Journal of Clinical Psychiatry*, *68*(Suppl.8), 11–16.
- The UK ECT Review Group. (2003). Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, *361*, 799–808.
- Trindade, E., Menon, D., Topfer, L. A., & Coloma, C. (1998). Adverse effects associated with selective serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants: a meta-analysis. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Médicale Canadienne*, *159*(10), 1245–1252.

- Urani, A., Chourbaji, S., & Gass, P. (2005). Mutant mouse models of depression: Candidate genes and current mouse lines. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(4-5), 805–828.
- Valvassori, S. S., Budni, J., Varela, R. B., & Quevedo, J. (2013). Contributions of animal models to the study of mood disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria (São Paulo, Brazil : 1999)*, 35(Suppl.2), 121–131.
- van der Stelt, H. M., Breuer, M. E., Olivier, B., & Westenberg, H. G. M. (2005). Permanent deficits in serotonergic functioning of olfactory bulbectomized rats: an in vivo microdialysis study. *Biological Psychiatry*, 57(9), 1061–1067.
- Van Hooissen, J. D., Chambliss, H. O., Holmes, P. V., & Dishman, R. K. (2003). Effects of chronic exercise and imipramine on mRNA for BDNF after olfactory bulbectomy in rat. *Brain Research*, 974(1-2), 228–235.
- van Riezen, H., Schnieden, H., & Wren, A. (1976). Behavioural changes following olfactory bulbectomy in rats: a possible model for the detection of antidepressant drugs [proceedings]. *British Journal of Pharmacology*, 57(3), 426–427.
- Van Rossum, E. F. C., Binder, E. B., Majer, M., Koper, J. W., Ising, M., Modell, S., ... Holsboer, F. (2006). Polymorphisms of the glucocorticoid receptor gene and major depression. *Biological Psychiatry*, 59(8), 681–688.
- Varty, G. B., Cohen-Williams, M. E., & Hunter, J. C. (2003). The antidepressant-like effects of neurokinin NK1 receptor antagonists in a gerbil tail suspension test. *Behavioural Pharmacology*, 14, 87–95.
- Vetulani, J. (2013). Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. *Pharmacological Reports : PR*, 65(6), 1451–1461.
- Vidal, R., Pilar-Cuéllar, F., dos Anjos, S., Linge, R., Treceño, B., Vargas, V. I., ... Pazos, A. (2011). New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways. *Current Pharmaceutical Design*, 17(5), 521–533.
- Vinkers, C. H., Breuer, M. E., Westphal, K. G. C., Korte, S. M., Oosting, R. S., Olivier, B., & Groenink, L. (2009). Olfactory bulbectomy induces rapid and stable changes in basal and stress-induced locomotor activity, heart rate and body temperature responses in the home cage. *Neuroscience*, 159(1), 39–46.

- Vogel, G., Neill, D., Hagler, M., Kors, D., & Hartley, P. (1990). Decreased intracranial self-stimulation in a new animal model of endogenous depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *14*(1), 65–68.
- Voleti, B., Navarria, A., Liu, R. J., Banasr, M., Li, N., Terwilliger, R., ... Duman, R. S. (2013). Scopolamine rapidly increases mammalian target of rapamycin complex 1 signaling, synaptogenesis, and antidepressant behavioral responses. *Biological Psychiatry*, *74*(10), 742–749.
- Vollmayr, B., & Henn, F. A. (2001). Learned helplessness in the rat: improvements in validity and reliability. *Brain Research Protocols*, *8*(1), 1–7.
- Walker, A. K., Rivera, P. D., Wang, Q., Chuang, J.-C., Tran, S., Osborne-Lawrence, S., ... Zigman, J. M. (2015). The P7C3 class of neuroprotective compounds exerts antidepressant efficacy in mice by increasing hippocampal neurogenesis. *Molecular Psychiatry*, *20*(4), 500–508.
- Walker, M. W., Wolinsky, T. D., Jubian, V., Chandrasena, G., Zhong, H., Huang, X., ... Craig, D. A. (2009). The novel neuropeptide Y Y5 receptor antagonist Lu AA33810 [N-[[trans-4-[(4,5-dihydro[1]benzothiepine[5,4-d]thiazol-2-yl)amino]cyclohexyl]methyl]-methanesulfonamide] exerts anxiolytic- and antidepressant-like effects in rat models of stress sensitivity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *328*(3), 900–911.
- Wang, D., Noda, Y., Tsunekawa, H., Zhou, Y., Miyazaki, M., Senzaki, K., & Nabeshima, T. (2007). Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety. *Behavioural Brain Research*, *178*(2), 262–273.
- Wehr, T. a, Duncan, W. C., Sher, L., Aeschbach, D., Schwartz, P. J., Turner, E. H., ... Rosenthal, N. E. (2001). A circadian signal of change of season in patients with seasonal affective disorder. *Archives of General Psychiatry*, *58*(12), 1108–1114.
- Welberg, L. (2013). Sleep: Adenosine-based antidepressants? *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(3), 154–155.
- West, A. P. (1990). Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *14*(6), 863–877.

- Widerlöv, E., Lindström, L. H., Wahlestedt, C., & Ekman, R. (1988). Neuropeptide Y and peptide YY as possible cerebrospinal fluid markers for major depression and schizophrenia, respectively. *Journal of Psychiatric Research*, 22(1), 69–79.
- Wijkstra, J., Lijmer, J., Burger, H., Geddes, J., & Nolen, W. a. (2013). Pharmacological treatment for psychotic depression. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11(11), CD004044.
- Wilkinson, L. S., Killcross, S. S., Humby, T., Hall, F. S., Geyer, M. A., & Robbins, T. W. (1994). Social Isolation in the Rat Produces Developmentally Specific Deficits in Prepulse Inhibition of the Acoustic Startle Response Without Disrupting Latent Inhibition. *Neuropsychopharmacology*, 10(1), 61–72.
- Wilkinson, S. M., Gunosewoyo, H., Barron, M. L., Boucher, A., McDonnell, M., Turner, P., ... Kassiou, M. (2014). The first cns-active carborane: A novel p2x7 receptor antagonist with antidepressant activity. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(5), 335–339.
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83(1), 1–16.
- Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134(4), 319–329.
- Willner, P., & Mitchell, P. J. (2002). The validity of animal models of predisposition to depression. *Behavioural Pharmacology*, 13(3), 169–188.
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93(3), 358–364.
- Witkin, J. M., Overshiner, C., Li, X., Catlow, J. T., Wishart, G. N., Schober, D. a, ... Felder, C. C. (2014). M1 and m2 muscarinic receptor subtypes regulate antidepressant-like effects of the rapidly acting antidepressant scopolamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 351(2), 448–456.
- World Health Organization. (1992). The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders. *International Classification*, 10, 1–267.

- Yamada, K., Kobayashi, M., Shiozaki, S., Ohta, T., Mori, A., Jenner, P., & Kanda, T. (2014). Antidepressant activity of the adenosine A2A receptor antagonist, istradefylline (KW-6002) on learned helplessness in rats. *Psychopharmacology*, 231(14), 2839–2849.
- Yang, C., Hu, Y.-M., Zhou, Z.-Q., Zhang, G.-F., & Yang, J.-J. (2013). Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 118(1), 3–8.
- Yang, T., & Dunner, D. L. (2001). Differential subtyping of depression. *Depression and Anxiety*, 13(1), 11–17.
- Young, L. T., Dowlatshahi, D., MacQueen, G. M., & Wang, J. F. (1998). Increased temporal cortex CREB concentrations and antidepressant treatment in major depression. *The Lancet*, 352(9142), 1754–1755.
- Zarate Jr., C. A., Singh, J. B., Carlson, P. J., Brutsché, N. E., Ameli, R., Luckenbaugh, D. A., ... Manji, H. K. (2006a). A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry*, 63(8), 856–864.
- Zarate, C. A., Singh, J. B., Quiroz, J. A., De Jesus, G., Denicoff, K. K., Luckenbaugh, D. A., ... Charney, D. S. (2006b). A double-blind, placebo-controlled study of memantine in the treatment of major depression. *The American Journal of Psychiatry*, 163(1), 153–155.
- Zhang, L.-M., Zhou, W.-W., Ji, Y.-J., Li, Y., Zhao, N., Chen, H.-X., ... Li, Y.-F. (2015). Anxiolytic effects of ketamine in animal models of posttraumatic stress disorder. *Psychopharmacology*, 232(4), 663–672.
- Zhou, W., Wang, N., Yang, C., Li, X. M., Zhou, Z. Q., & Yang, J. J. (2014). Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *European Psychiatry*, 29(7), 419–423.