

Katedra parazitologie
Univerzita Karlova v Praze - Přírodovědecká fakulta



Behaviorální a neurofyzilogické projevy latentní toxoplazmózy u myší

Hana Hodková

Diplomová práce
Praha 2006

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jaroslav Flegr, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

V Praze, 3.5. 2006

Hana Hodková
Hana Hodková

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Jaroslavu Flegrovi, CSc. za vedení mé diplomové práce, za jeho trpělivost a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Petru Kodymovi, CSc. za pomoc při infikování testovaných myší a odběrech krve, RNDr. Pavlu Němcovi, PhD. za pomoc při perfuzích a za odborné rady při imunohistochemických experimentech a RNDr. Danielu Fryntovi, PhD. za rady v průběhu etologických testů.

Také bych poděkovala Mgr. Mirce Berenreitové za příjemnou spolupráci, Mgr. Aničce Skallové, Mgr. Martině Novotné a samozřejmě svým rodičům za všestrannou podporu. V neposlední řadě také děkuji všem myškám, které jsem nutila spolupracovat.

OBSAH

1. Úvod	1
2. <i>Toxoplasma gondii</i>	2
2.1. Asexuální část životního cyklu v meziphostiteli.....	2
2.2. Sexuální část životního cyklu v definitivním hostiteli.....	2
3. Toxoplazmóza	3
3.1. Toxoplazmóza u člověka.....	3
3.1.1. Kongenitální toxoplazmóza.....	3
3.1.2. Akutní fáze získané toxoplazmózy.....	4
3.1.3. Latentní fáze získané toxoplazmózy.....	4
3.2. Toxoplazmóza u hlodavců.....	7
3.2.1. Změny v chování hlodavců.....	8
4. Etologické testy používané při testování změn v chování hlodavců	9
4.1. Pachové preference.....	10
4.1.1. Testování pachových preferencí.....	10
4.2. Prostorová paměť a učení.....	11
4.2.1. Testování prostorové paměti a učení.....	12
4.3. Lokomoční aktivita a explorace.....	13
4.3.1. Testování lokomoční aktivity a explorace.....	14
5. Faktory které mohou ovlivnit sledované prvky chování	14
6. Mechanismus působení <i>Toxoplasma gondii</i>	16
6.1. Dopamin.....	17
6.1.1. Syntéza a degradace dopaminu.....	17
6.1.2. Dopaminergní buňky.....	18
6.1.3. Receptory dopaminu.....	18
6.1.3.1. Narušení funkce D receptorů.....	19
6.1.4. Dopaminergní dráhy.....	20
6.2. Imunohistochemie.....	21

6.2.1. Fixace tkáně.....	21
6.2.2. Imunohistochemické barvení	21
6.3. Analýza obrazu.....	22
7. Vliv latentní toxoplazmózy na chování F1 kříženců myší kmenů BALB/c a C57/b	23
7.1. Příprava experimentálních zvířat	23
7.2. Příprava inokula	24
7.3. Stanovení množství protilátek v krvi komplement fixační reakcí (KFR)	25
7.4. Uspořádání etologických experimentů.....	26
7.4.1. Test pachových preferencí	26
7.4.2. Reakce na změnu potravy	28
7.4.3. Osmiramenné radiální bludiště.....	28
7.4.4. Přejchod kladin.....	29
7.4.5. Holeboard test	30
7.4.6. Test s běhacími kolotoči.....	32
7.4.7. Určení fáze estrálního cyklu u samic laboratorních myší	33
7.5. Statistické zpracování dat.....	33
7.6. Výsledky etologických pokusů	34
7.6.1. Klinické příznaky onemocnění.....	34
7.6.2. Testy pachových preferencí	36
7.6.2.1. Rozdíly v samičí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samic (test pachových preferencí č. 1)	36
7.6.2.2. Rozdíly v samčí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samců (test pachových preferencí č. 2)	37
7.6.2.3. Rozdíly v samičí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samců (test pachových preferencí č. 3)	39
7.6.2.4. Rozdíly v samičí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samců (test pachových preferencí č. 4)	40
7.6.3. Reakce na změnu potravy	42
7.6.4. Sledování prostorové paměti a schopnosti učení v osmiramenném radiálním bludišti.....	44
7.6.5. Přejchod kladin.....	48
7.6.6. Holeboard test po aplikaci ritanserinu.....	51
7.6.7. Sledování spontánní aktivity v testu s běhacími kolotoči	55

8. Porovnání počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech	
nervové tkáně myši s latentní toxoplazmózou a myši kontrolních	59
8.1. Fixace mozku	59
8.2. Krájení zafixovaného mozku	60
8.3. Imunohistochemické barvení kryořezů	61
8.4. Přehledné histologické barvení kryořezů kresyl violetí	62
8.5. Použité chemikálie	63
8.6. Analýza obrazu	64
8.7. Statistické zpracování dat	64
8.8. Průběh studie	65
8.9. Výsledky detekce počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech mozku myši s latentní toxoplazmózou a myši kontrolních	66
8.9.1. Experiment č. 2	66
8.9.2. Experiment č. 3	67
9. Diskuse	72
9.1. Průběh infekce <i>Toxoplasma gondii</i> u myši	72
9.2. Vliv latentní toxoplazmózy na chování F1 kříženců myši kmenů BALB/c a C57/b...	73
9.2.1. Testy pachových preferencí	73
9.2.2. Reakce na změnu potravy	75
9.2.3. Sledování prostorové paměti a schopnosti učení v osmiramenném radiálním bludišti	77
9.2.4. Přejechání kladin	78
9.2.5. Holeboard test po aplikaci ritanserinu	79
9.2.6. Sledování spontánní aktivity v testu s běhacími kolotoči	81
9.3. Detekce počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně myši	82
9.3.1. Experiment č. 1	83
9.3.2. Experiment č. 2	83
9.3.3. Experiment č. 3	85
9.4. Mechanismus působení <i>Toxoplasma gondii</i>	86
10. Závěrečné shrnutí	88
11. Použitá literatura	90

1. Úvod

Parazité jsou významným činitelem uplatňujícím se v řadě přírodních procesů. Často působí také jako důležitý selekční faktor, který vyvolává evoluční změny u svých hostitelů. I když v řadě případů parazit svého hostitele nijak fyziologicky ani morfologicky neovlivňuje, mohou nastat situace, kdy přítomnost parazita způsobí změnu v chování hostitele. Případy, kdy změny v chování hostitele poskytují výhodu parazitovi, řadíme do kategorie manipulačního ovlivňování (Poulin, 1994).

Jedním z klasických organismů, který umožňuje studium manipulační hypotézy, je intracelulární parazit *Toxoplasma gondii*. Životní cyklus *Toxoplasma gondii* je nepřímý, zahrnuje fázi asexuální a fázi sexuální. Asexuální fáze probíhá v mezihostiteli, kterým může být kterýkoli teplokrevný obratlovec včetně člověka. Fáze sexuální probíhá v definitivním hostiteli, kterým mohou být pouze zástupci čeledi *Felidae*. Cyklus je považován za kompletní, pokud je infikovaný mezihostitel pozřen predátorem (definitivním hostitelem). Na základě tohoto heteroxeného životního cyklu lze předpokládat, že *Toxoplasma gondii* může ovlivňovat chování svého mezihostitele ve svůj prospěch tak, aby urychlila a zvýšila úspěšnost svého šíření do hostitele definitivního. Například, aby se mezihostitel stal snazší kořistí kočkovité šelmy (Flegr a kol., 1996).

Již bylo publikováno několik studií zabývajících se vlivem toxoplazmózy na chování mezihostitelů, které manipulační teorii podpořily, avšak doposud nebyl objasněn mechanismus, jakým *Toxoplasma gondii* své hostitele ovlivňuje. Jedna z hypotéz zaměřená na mechanismus působení *Toxoplasma gondii* předpokládá, že v mozku infikovaných mezihostitelů dochází ke změnám hladiny dopaminu. V roce 1985 Stibbs naměřil v celém mozku myši s latentní toxoplazmózou o 14 % vyšší hladinu dopaminu než u myši kontrolních (Stibbs, 1985). Tuto hypotézu později nepřímo podpořily i studie na lidech. *Toxoplasma*-pozitivní osoby dosahovaly signifikantně nižších hodnot ve faktoru Novelty seeking v Cloningerově dotazníku TCI (Flegr a kol., 2003) oproti osobám kontrolním. Předpokládá se, že tento psychobiologický faktor negativně koreluje s hladinou dopaminu.

V první části této práce jsme se nejprve zaměřili na změny v chování *Toxoplasma*-pozitivních myši, které by mohly přispět k snadnějšímu přenosu parazita do definitivního hostitele. Při sledování změn v chování myši s latentní toxoplazmózou jsme se též snažili použít takové etologické testy, pomocí kterých lze sledovat chování ovlivněné dopaminergní aktivitou. V druhé části jsme se soustředili na studium výše zmiňovaného mechanismu působení *Toxoplasma gondii* na mezihostitele. Porovnávali jsme počet aktivních

dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší.

2. *Toxoplasma gondii*

V současné době je *Toxoplasma gondii* řazena do čeledi *Sarcocystidae*, řádu *Eimeriida*, třídy *Coccidea*, kmene *Apicomplexa* (Corliss, 1994; Lee a kol., 2000).

Toxoplasma gondii patří mezi obligátně intracelulární parazity, kteří se množí výhradně uvnitř hostitelských buněk. Životní cyklus *Toxoplasma gondii* je nepřímý- parazit se asexuálně rozmnožuje v mezihostiteli, sexuální fáze rozmnožování poté probíhá pouze v hostiteli definitivním (Webster, 2001). V životním cyklu se *Toxoplasma gondii* vyskytuje ve třech různých formách- sporozoit, tachyzoit a bradyzoit.

2.1. Asexuální část životního cyklu v mezihostiteli

Během asexuální části životního cyklu se uvnitř hostitelských buněk množí tachyzoiti opakovanou a rychlou endodyogonií. Po určité době, pravděpodobně jako reakce na imunitní odpověď hostitele, začne parazit vytvářet tkáňové cysty (Gross, 1996). Tkáňové cysty představují velmi odolná stádia (přežívající až desítky let), jejich přítomnost v tkáních je zodpovědná za latentní fázi toxoplazmózy. Uvnitř cyst nalezneme velké množství bradyzoitů, které se množí pomalou endodyogonií. Tkáňové cysty se preferenčně vytvářejí v nervové a svalové tkáni infikovaných mezihostitelů (Jíra a Rosický, 1983). Cysty mají za následek celoživotní imunní stimulaci hostitele jejímž výsledkem je mimo jiné obvykle celoživotní nespecifická imunita vůči další infekci *Toxoplasma gondii*.

2.2. Sexuální část životního cyklu v definitivním hostiteli

Po pozření infikovaného mezihostitele definitivním hostitelem (kočkovitou šelmou) dojde k rozrušení stěny tkáňových cyst a uvolnění bradyzoitů. Bradyzoiti penetrují do epitelálních buněk tenkého střeva, mění se v tachyzoity a zahájí další fázi asexuálního množení endodyogonií a následnou endopolygonii (Termer a kol., 2000). Po několika generacích asexuálního množení nastává fáze sexuální, tzv. gametogonie, která probíhá pouze v definitivním hostiteli (v kočkovité šelmě) (Dubey, 1986). Po oplození makrogamet mikrogametami vznikají zygoty, které se vyvíjí v oocysty. Nevysporulované oocysty jsou poté společně s výkaly vylučovány do vnějšího prostředí. Dozrávání sporozoitů uvnitř oocyst (tzv. sporogonie) nastává mimo tělo definitivního hostitele. Nevysporulované oocysty se

ve vnějším prostředí stávají zdrojem infekce pro další hostitele. Infikovaná kočkovitá šelma vylučuje velké množství oocyst po dobu 1-3 týdnů. Oocysty mohou v půdě za vhodných podmínek přežít několik měsíců až jeden rok.

3. Toxoplazmóza

Toxoplasma gondii vyvolává u svých hostitelů onemocnění, které se nazývá toxoplazmóza.

3.1. Toxoplazmóza u člověka

Jak bylo zmíněno již v úvodu, mezihostitelem *Toxoplasma gondii* může být kterýkoli teplokrevný obratlovec včetně člověka. Toxoplazmózou je infikováno 30 až 60 % lidí na celém světě, jedná se tedy o kosmopolitně rozšířené onemocnění (Holliman, 1997).

Většina autorů rozlišuje toxoplazmózu dle způsobu nákazy na kongenitální a získanou. Získanou toxoplazmózu můžeme dále dělit, podle klinických hledisek, na fázi akutní, chronickou (dlouho přetrvávající akutní příznaky onemocnění) a latentní (Holliman, 1997).

3.1.1. Kongenitální toxoplazmóza

O kongenitální toxoplazmóze se hovoří při přenosu infekce z matky na plod. Důsledky kongenitální nákazy závisí nejen na počtu a virulenci parazitů přenesených na plod, ale také na trimestru, ve kterém se matka toxoplazmózou nakazila. K přenosu *Toxoplasma gondii* na plod může dojít pouze během akutní fáze onemocnění (tedy jestliže je matka nakažena v průběhu těhotenství, nebo došlo-li k nákaze krátce před otěhotněním). Mezi klasickou triádu projevů kongenitální toxoplazmózy patří intrakraniální kalcifikace, hydrocephalus a mikrophthalmie. Toxoplazmóza může být také příčinou mentální retardace či chorioretinitis (Alford a kol., 1974). Vysoce pravděpodobný přenos infekce z matky na plod je ve třetím trimestru těhotenství (až 60 %). V tomto případě však nemá tak závažné důsledky pro plod (někdy se projeví pouze séropositivitou dítěte). Naproti tomu přenos infekce z matky na plod během prvního trimestru je méně pravděpodobný, avšak důsledky pro plod bývají o to vážnější (spontánní potrat, porod mrtvého plodu, hydrocephalus atd.) (Gange, 2001).

3.1.2. Akutní fáze získané toxoplazmózy

Tato fáze je charakterizována přítomností tachyzoitů v krvi a v ostatních tkáních infikovaných jedinců. V akutní fázi infekce dochází k rychlému vzestupu hladin protilátek typu IgM, IgA a pozvolnému vzestupu protilátek typu IgG (Kodym a Tolarová, 1998). U člověka se tato fáze toxoplazmózy často projevuje nespecifickým zhoršením zdravotního stavu- malátností, bolestí hlavy, horečkou, myalgiemi a lymfadenopatií (zduření mízních uzlin především v oblasti krku a šije). Tyto příznaky jsou obdobné běžným virovým onemocněním (Holliman, 1997). Akutní fáze se může též projevit psychiatrickými komplikacemi (desorientace, psychosy se schizofrenickými příznaky, deprese) (Minto a Roberts, 1959). Řada studií prokázala asociaci mezi akutní fází toxoplazmózy a schizofrenií, nebo vyšší prevalenci latentní toxoplazmózy u pacientů se schizofrenií než v normální populaci. Teorie o možné kauzální souvislosti mezi toxoplazmózou a schizofrenií má však mnoho odpůrců, toxoplazmóze je obvykle přisuzován spíše nespecifický vliv tzv. provokačního činitele (Petrovický a Vojtěchovský, 1955).

3.1.3. Latentní fáze získané toxoplazmózy

Latentní fáze toxoplazmózy probíhá u imunokompetentních osob asymptomaticky, trvá zpravidla až do konce života hostitele a z klinického hlediska se jeví jako nevýznamná. K závažným klinickým příznakům však může docházet u některých imunodeficientních osob (např. u HIV pozitivních jedinců), především postižením CNS – toxoplazmatická encephalitis, meningo-encephalitis či meningo-encephalo-myelitis (Powell a kol., 1978; Heitman a Irizarry, 1991). Někteří pacienti mohou trpět také psychickými poruchami- halucinacemi, nebo progresivní demencí (Höschl a Balon, 1980).

Latentní fáze toxoplazmózy má však i u imunokompetentních jedinců zřejmě mnohem větší význam než se předpokládá. Během latentní fáze toxoplazmózy přežívá parazit v dormantní formě (bradyzoit) nejčastěji v nervové nebo svalové tkáni svého hostitele. Předpokládá se, že mozek hostitele je pro parazita vhodným místem odkud je možno ovlivňovat hostitele specifickými zásahy do nervového systému. Tyto zásahy parazita mohou vést ke změně chování hostitele.

Latentní fáze infekce je charakteristická přítomností protilátek typu IgG, zatímco protilátky IgM a IgA klesají a do devíti měsíců od nákazy zcela vymizí (Kodym a Tolarová, 1998).

Vliv latentní toxoplazmózy na člověka byl nejprve zkoumán v souvislosti

s psychiatrickými onemocněními. Mnoha autory byly popsány psychoneurotické potíže u osob infikovaných *Toxoplasma gondii* (Wildführ, 1954; Petrovický a Vojtěchovský, 1955). Vysoké procento *Toxoplasma*-pozitivních osob bylo též pozorováno mezi schizofreniky (Jírovec a Vojtěchovský, 1957).

Od roku 1994 však Jaroslav Flegr a jeho kolektiv studují vliv latentní toxoplazmózy na osobnost a chování zdravých lidí.

V první studii bylo prostřednictvím 16-ti faktorového Cattelova dotazníku porovnáváno chování, respektive psychologické profily, které toto chování odrážejí u studentů a pedagogů PŘF UK (Flegr a Hrdý, 1994). Cattel v dotazníku rozlišuje dva typy rysů- povrchové a zdrojové. Povrchové rysy jsou náhodnou kombinací projevů (např. inteligence a vzdělání), zdrojové rysy vytvářejí stavební bloky osobnosti (Cattel, 1970). V současné době existuje 30 těchto rysů, z toho 16 jich měří 16 Cattelův PF (např.: A- vřelost, N- naivita, E- dominance). Tento dotazník se běžně používá v psychologické praxi. U mužů byly na základě 16 Cattelova PF dotazníku zjištěny posuny průměrných skóre vlivem latentní toxoplazmózy směrem k nižším hladinám ve faktorech A (sizotýmie, afektotýmie), G (síla superega) a Q3 (sebekontrola, sebepojetí) a směrem k vyšším hladinám ve faktoru L (podezřívavost, žárlivost). O dva roky později byl tento soubor studovaných osob rozšířen (Flegr a kol., 1996) a i na tomto rozšířeném souboru se opět potvrdil posun ve faktorech G (síla superega) a L (podezřívavost, žárlivost) u *Toxoplasma*-pozitivních mužů oproti mužům kontrolním. V této studii byly také pozorovány posuny v psychice nakažených žen. *Toxoplasma*-pozitivní ženy dosahovaly oproti ženám kontrolním signifikantně vyšších skóre ve faktorech A (vřelost), Q3 (sebekontrola, sebepojetí) a nižších hodnot ve faktorech L (podezřívavost, žárlivost) a N (naivita). Ve faktorech A (sizotýmie, afektotýmie), G (ochota respektovat sociální pravidla a normy), L (žárlivost), N (naivita) a Q3 (síla vůle) je vliv *Toxoplasma gondii* u žen a mužů opačný. U faktoru O (nejistota, pocit ohrožení) je vliv shodný (vzestup), ale u žen je mnohem slabší.

Na základě 16 PF Cattelova dotazníku lze tedy infikované muže ve srovnání s muži neinfikovanými charakterizovat jako podezřívavější, rezervovanější, s větším sklonem k pocitům viny, s menším sebevědomím a nižší silou superega.

Ženy infikované toxoplazmózou ve srovnání s ženami neinfikovanými se jeví jako více vřelé, sebedisciplované, důvěřivé a přirozené, narozdíl od žen neinfikovaných.

Positivní korelace mezi faktory G, F, H a L a délkou infekce ukazuje, že s dobou nákazy se změny v psychice nakažených osob prohlubují. Zdá se tedy, že specifické rysy nezvyšují pravděpodobnost nákazy, ale že příčinou změny psychického rysu je nákaza (Flegr

a kol., 1996).

Vyšší hodnoty některých faktorů B (inteligence), Q1 (radikalismus), O (sklon k pocitům viny) a Q4 (vysoká ergická tenze) byly nalezeny u infikovaných žen testovaných na toxoplazmózu během těhotenství (Flegr a Havlíček, 1999).

V dalším souboru 55-ti žen vyšetřených na toxoplazmózu během těhotenství, byla prokázána korelace mezi délkou infekce a faktory A, G, F (Flegr a kol., 2000). Opakovaně se tedy prokázala korelace mezi délkou trvání latentní toxoplazmózy a mírou posunu hodnot příslušných psychobiologických faktorů.

V souboru 857 vojáků základní služby Flegr a kolektiv (2003) použili mimo jiné také Cloningerův temperamentový a charakterový inventář. Cloningerův temperamentový a charakterový inventář (TCI) zahrnuje 4 temperamentové dimenze - Novelty seeking, Harm avoidance, Reward dependence a Perzistence. Novelty seeking představuje tendence vyhledávat a pozitivně prožívat nové zkušenosti a prostředí. Harm avoidance je definováno jako schopnost učit se a měnit chování následkem trestu nebo frustrace. Reward dependence je schopnost vytrvat u určitého chování v závislosti na odměně nebo sociálním oceněním. Perzistence měří vytrvalost navzdory frustraci nebo únavě (Cloninger, 1987). Na základě neurofarmakologických, neuroanatomických a biochemických dat byl každé temperamentní dimenzi přiřazen specifický neurotransmiter: Harm avoidance - GABA a serotonin, Novelty seeking - dopamin, Reward dependence - norepinephrine, Perzistence - glutamin a serotonin (Cloninger a kol., 1993). Prostřednictvím tohoto dotazníku bylo u *Toxoplasma*-pozitivních mužů zjištěno snížení pouze faktoru Novelty seeking (NS) oproti mužům kontrolním. Pokles Novelty seeking byl patrný ve třech ze čtyř primárních faktorů NS (NS2 - impulsivita, NS3 - extravagance, NS4 - nespořádanost). Naopak NS1 - explorační excitabilita u *Toxoplasma*-pozitivních jedinců dosahovala mírně vyšších hodnot než u jedinců kontrolních. Nízké hodnoty tří ze čtyř primárních faktorů NS (NS2 - NS4) ukazují, že *Toxoplasma*-pozitivní jedinci jsou v průměru více přemýšliví, rezervovaní, pomalí a se zvýšenou sebekontrolou. Mají také potřebu být organizovaní a preferují aktivity s přesně danými pravidly a předpisy. Použitím Ottisova testu autoři též zaznamenali nižší verbální inteligenci u *Toxoplasma*-pozitivních mužů oproti mužům neinfikovaným. Ottisův test je standardní verbální inteligenční test, který se skládá ze 32 otázek zaměřených na všeobecné informace.

Cloningerův test byl použit i při testování dárců krevních destiček fakultní nemocnice v Praze. *Toxoplasma*-pozitivní jedinci dosahovali opět nižších hodnot ve faktoru Novelty seeking než jedinci kontrolní (Skallová a kol., 2005a).

Další studie ukazují, že jedinci infikovaní latentní toxoplazmózou mají signifikantně

zhoršenou psychomotorickou výkonnost, což se projevuje prodloužením reakčních časů ve srovnání s kontrolními jedinci (Havlíček a kol., 2001; Flegr a kol., 2002). Byla též shledána vyšší frekvence *Toxoplasma*-pozitivních osob, které se staly obětí dopravních nehod (Flegr a kol., 2002), což může souviset se zhoršením psychomotorických funkcí nebo změnou některých osobnostních rysů. Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními jedinci v psychomotorické výkonnosti a osobnostních faktorech se opět zvyšovaly v průběhu infekce. Naopak riziko autonehody v průběhu infekce klesalo.

Dosavadní výzkumy lze tedy shrnout tak, že *Toxoplasma gondii* pravděpodobně indukuje změny v psychice nakažených osob. Tyto změny jsou charakteristické pro latentní fázi toxoplazmózy, která byla až doposud považována za bezpříznakovou.

3.2. Toxoplazmóza u hlodavců

Přirozeným mezihostitelem *Toxoplasma gondii* jsou drobní hlodavci. Akutní fáze u hlodavců nastává takřka ihned po nákaze infekčními sporozoity či bradyzoity. Ty se poté mění v tachyzoity, které putují do vnitřních orgánů. Již po 2 týdnech dochází k napadení srdce i mozku. Po infekci avirulentními kmeny *Toxoplasma gondii* je nejhorší zdravotní stav u myši patrný přibližně 10. - 14. den. V této době dochází k výraznému poklesu váhy, myši jsou shrbené a jejich srst je naježená. V tomto stádiu infekce není imunita ještě zcela vytvořena (Kodym, 1996).

V latentní fázi onemocnění je již imunita vytvořena, tachyzoiti se mění v bradyzoity, a dochází k tvorbě tkáňových cyst. Maximální počet cyst v mozku je ve druhém měsíci po infekci (Kodym, 1996).

Průběh onemocnění samozřejmě ovlivňuje míra virulence kmene, velikost infekční dávky a druh hostitele, kterého *Toxoplasma gondii* napadne. Rozlišujeme kmeny *Toxoplasma gondii* na virulentní, které obvykle usmrcují nakažené myši již do 10 dnů, nebo cystogenní, které tvoří pouze cysty a myši neusmrcují (Kodym a kol., 2002). Infekční dávka je druhým důležitým ovlivňujícím faktorem. S jejím zvýšením dochází ke zhoršení průběhu onemocnění. Např. snížení infekční dávky tachyzoitů virulentního kmene *Toxoplasma gondii* z 10^5 o 2 řády vede až k 83 % snížení mortality myši kmene BALB/c (Araujo a kol., 1976). Poslední faktor, který hraje důležitou roli v průběhu nemoci, je druh hostitele, který je napaden. Vysoce odolní hostitelé jsou např. potkani a lidé, málo odolní hostitelé jsou naopak myši, morčata a králíci (Frenkel, 1988). Rozdíly v průběhu onemocnění byly také pozorovány mezi jednotlivými kmeny myši. Málo rezistentním kmenem je např. kmen BALB/c (Araujo a kol., 1976).

3.2.1. Změny v chování hlodavců

Přenos *Toxoplasma gondii* do definitivního hostitele (kočkovité šelmy) probíhá obvykle formou predace. Přirozenou kořistí kočky (definitivního hostitele) jsou drobní hlodavci (mezihostitel). Účelem manipulace mezihostitele je zvýšení efektivity přenosu parazita do hostitele definitivního.

Behaviorální efekt toxoplazmózy byl nejčastěji studován u laboratorních myší. Již roku 1978 Piekarski a kol. prokázal, že *Toxoplasma*-pozitivní myši mají zhoršenou schopnost učení oproti myším kontrolním. Na tuto studii o rok později navázal Witting (1979), který potvrdil, že *Toxoplasma gondii* skutečně ovlivňuje schopnost učení a prostorové paměti a to i po 6 týdnech od infekce. *Toxoplasma*-pozitivní myši se učily výrazně pomaleji a při hledání správné cesty v bludišti také více chybovaly.

Roku 1980 Hutchison a kol. pozorovali u *Toxoplasma*-pozitivních myší nižší výskyt exploračního chování (např. panáčkování) v novém prostředí arény. *Toxoplasma*-pozitivní myši též častěji střídaly jednotlivé prvky chování než myši kontrolní (Hutchison a kol., 1980a). Naopak Skallová roku 2005 pozorovala signifikantně vyšší exploraci u *Toxoplasma*-pozitivních samic F1 kříženců kmenů BALB/c a B10A (Skallová, 2005b).

Několik dalších studií se věnovalo změnám v aktivitě infikovaných myší. *Toxoplasma*-pozitivní myši testované v Open-field testu vykazovaly relativně nižší preference pro centrální oblast boxu. Rovněž u nich byla pozorována zvýšená lokomoční aktivita projevující se větším počtem proběhnutých čtverců (Hay a kol., 1983c). Myši infikované kongenitálně i v dospělosti byly oproti kontrolním výrazně aktivnější, a to jak v prostředí novém (Hay a kol., 1983c), tak i v prostředí známém (Hay a kol., 1985). Ve všech případech změna v aktivitě nekorelovala s počtem tkáňových cyst v mozku ani s celkovým zdravotním stavem. V roce 2000 Hrdá sledovala dynamiku změn v aktivitě infikovaných myší v průběhu dvanácti týdnů od nákazy. Zjistila nižší aktivitu u infikovaných zvířat v akutní fázi infekce, při níž byly u všech infikovaných zvířat pozorovány známky onemocnění. V latentní fázi infekce se aktivita infikovaných myší od kontrol již nelišila.

Další studie prokázala zhoršené motorické schopnosti měřené počtem pádů z rotujícího válce u *Toxoplasma*-pozitivních myší oproti myším kontrolním (Hutchison a kol., 1980c). Byl také pozorován rozdíl mezi kongenitálně a v dospělosti infikovanými myšmi (Hay a kol., 1983b). Myši infikované kongenitálně padaly signifikantně častěji než myši infikované v dospělosti a obě skupiny byly signifikantně horší než skupina kontrolní.

Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními myšmi kmene A byly

zaznamenány v experimentu, který byl zaměřen na rozpoznávání nového a starého prostředí (ramene) v Y bludišti. Kontrolní myši dávaly přednost novému neznámému rameni před starým, zatímco u myší *Toxoplasma*-pozitivních nebyla pozorována žádná preference (Hutchison a kol., 1980b; Hay a kol., 1984). Snížená reakce na nové prostředí korelovala s počtem cyst v mozku infikovaných jedinců. Z těchto studií tedy vyplývá, že infekce *Toxoplasma gondii* ovlivňuje u myší schopnost rozlišovat mezi novými a známými podněty.

Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními myšmi byly zaznamenány i v testu sledující sociální chování. U kongenitálně nakažených samců bylo pozorováno zvýšení počtu prvků spojených s agresí a dominancí (Arnott a kol., 1990).

Změny v chování byly pozorované i u *Toxoplasma*-pozitivních potkanů, *Rattus norvegicus*. *Toxoplasma*-pozitivní potkani vykazovali vyšší aktivitu než potkani kontrolní (Webster, 1994a). *Toxoplasma*-pozitivní potkani oproti kontrolám dříve ztráceli obavu žrát z misky s novým podnětem (pach, miska, potrava), vykazovali tedy nižší neofobii (Webster a kol., 1994b). Zajímavé je, že tyto změny chování byly pozorovány jak u experimentálně nakažených hybridů potkana divokého a laboratorního, tak i u odchycených divokých potkanů nakažených přirozenou cestou. *Toxoplasma*-pozitivní potkani rovněž signifikantně častěji reagovali a zkoumali nové podněty než potkani kontrolní (Berdoy a kol., 1995). Mezi kongenitálně infikovanými a kontrolními samci kříženců laboratorních a divokých potkanů nebyli pozorovány žádné rozdíly v sociálním postavení ani v hladině testosteronu (Berdoy a kol., 1995).

4. Etologické testy používané při testování změn v chování hlodavců

Existuje mnoho druhů etologických testů, které sledují změny v chování hlodavců. Každý z těchto testů je vždy zaměřen na specifické prvky chování. Vzhledem k tomu, že hlavní částí této práce je sledování změn v chování *Toxoplasma*-pozitivních myší, v následujících kapitolách jsou popsány námi hodnocené prvky chování a metody jejich možného testování.

4.1. Pachové preference

Obraz okolního světa je u mnoha zvířat vytvářen souborem pachových signálů. Pomocí čichových orgánů zvířata objevují potravu, vyhledávají partnery a identifikují nepřátele (Isles a kol., 2001). Svůj revír vymezují pachovými značkami a pachové žlázy jim pomáhají zahnat soka nebo demonstrovat jejich pozici ve skupině. Pro některé zvířecí druhy jsou pachové značky jedním z významných způsobů komunikace. Například samci myši pachem své moči vzbuzují u samic ochotu k páření. Zvířata si jimi však dokáží sdělit i další emoce například neklid, strach nebo agresivitu (Brown, 1995).

Při výběru sexuálního partnera zvířata preferují především zdravé neparazitované jedince. Tento výběr jim tak umožní ochranu před kontaktem přenosnými nemocemi a zabrání též přenosu onemocnění na potomstvo (Clayton, 1991). V některých případech mohou být parazitovaní jedinci snadno odlišitelní od jedinců zdravých. Například u ptáků při napadení některými parazity dochází ke změně ornamentace a vybarvení peří (Hamilton a Zuk, 1982). U zvířat, která komunikují především pomocí čichu, mohou k identifikaci parazitovaných jedinců sloužit změny pachu partnera, jelikož pach moči mimo jiné odráží zdravotní stav jedince (Kavaliers a Colwell, 1993; Kavaliers a Colwell, 1995a; Kavaliers a Colwell, 1995b).

Samice při výběru sexuálního partnera též preferují samce, kteří vylučují vyšší množství feromonu, tedy obvykle samce s vyšší hladinou testosteronu v krvi. Vyšší hladinu testosteronu v krvi mají u savců dominantnější samci (Barnard, 1994). Zvýšená hladina testosteronu však na druhou stranu způsobuje imunosupresi, která může usnadnit nákazu některými parazity (Zuk and McKean, 1996). Zároveň však bylo prokázáno, že sociálně níže postavení jedinci (tedy jedinci s nižší hladinou testosteronu v krvi) jsou pod tlakem dominantnějších samců a mají nejen sníženou šanci se úspěšně rozmnožit, ale jsou též vzhledem k neustálé migraci a snížené znalosti okolí vystaveni i vyššímu riziku predace (Berdoy, 1994).

4.1.2. Testování pachových preferencí

K testování pachových preferencí hlodavců se nejčastěji používá Y-bludiště. V jednotlivých ramenech bludiště jsou umístěny různé pachové značky. Testované zvíře má na výběr, které z těchto ramen přednostně navštíví (Willis a Poulin, 2000; Ehman a Scott, 2001). Druhým typem aparatury je čtvercová aréna v jejíž rozích jsou jamky (nebo boxy) se vzorky pachů. Pachové preference jsou následně hodnoceny jako rozdíly v časech strávených prozkoumáváním jednotlivých jamek (Berdoy a kol., 2000; Webster a kol., nepublikováno).

4.2. Prostorová paměť a učení

Paměť je schopnost organismu přijímat, uchovávat a vyvolávat přechodné vjemy a to i po odeznění vyvolávajících podnětů. Paměť je nezbytnou podmínkou vývoje jedince, jeho orientace a existence.

V mozku tento proces umožňuje velký počet biochemických a mikroanatomických změn na úrovni synapsí, které uloží všechny záznamy, jež organismus vědomě i nevědomě přijme (Kulišťák, 2003). Přesná lokalizace paměťového centra není stanovena. Jednou ze základních struktur spojených s pamětí je hipokampus. Důležitá je také mozková kůra, která plní mnoho úloh zejména při vytváření paměťových stop při procesu učení, a striatum, které je zapojeno především do procesu učení a plánování nových motorických dovedností. Jak při ukládání dat, tak při vybavování informací jsou ve vzájemné souhře prefrontální kůra a hipokampus (Rokyta, 2002). Paměť a učení je také ovlivňováno hladinou neurotransmiteru dopaminu, zvláště pak mezo-kortikální dopaminergní projekcí (viz. kap. 6.1.4.). Proces vytváření paměti se skládá ze tří částí:

1. Tvorba paměťové stopy, při níž se vytváří spoje mezi dvěma místy v mozku, především v mozkové kůře a v hipokampu, je materiálním základem učení a paměti. Tato paměťová stopa je charakterizována změnami morfologickými (zvýšení počtu presynaptických váček s mediátory), elektrofyziologickými (zvýšení aktivity jednotlivých neuronů) a změnami biochemickými (zvýšení množství enzymů a ribonukleové kyseliny).
2. Fixace, nebo-li konsolidace paměťové stopy projevující se jako retence paměti.
3. Vybavování paměťové stopy, nebo-li vlastní užívání paměti. Při organickém poškození mozku bývá nejdříve narušena schopnost vybavování paměťové stopy (Rokyta, 2002).

Schopnost orientace v prostředí je společná pro většinu živočišných druhů. Objevem hipokampálních pyramidových neuronů bylo umožněno studium prostorové paměti, která hraje významnou roli při navigačním chování zvířat (Hess, 2003). Orientaci v prostoru vysvětluje teorie kognitivní mapy. Hipokampální buňky představují základní prvky kognitivní mapy a aktivita určité populace těchto buněk je výrazem vybavení paměťové stopy, která informuje subjekt o jeho momentální poloze (Rokyta, 2002). Například potkani s oboustranně odňatým hipokampem nenaleznou v Morrisově vodním bludišti podlážku pod hladinou vody, zatímco zvíře s normálním hipokampem ji najde snadno (Morris a kol., 1982). Navigací u zvířat rozumíme nalezení optimální cesty k cíli ve známém prostoru. Navigace předpokládá

praktické využití prostorové paměti (Bureš a Fenton, 2000).

Pomocí specificky zaměřených testů se mohou porovnávat schopnosti prostorové paměti a učení jednotlivých kmenů myši (Upchurch a Wehner, 1989). Srovnání schopnosti učit se se považuje za vhodné i pro zkoumání aspektů lidského chování. Příkladem může být výzkum některých lidských nemocí (Valenti a kol., 2001), účinku návykových látek (Cutler a kol., 1996) či působení stresu (McEvan a Sapolsky, 1995).

Své uplatnění testování prostorové paměti nachází též při studiu vlivu působení různých parazitů na hostitele. Někteří parazité u svých mezihostitelů zhoršují schopnost učení a prostorové paměti (Witting, 1979). Tato zhoršení u parazitovaných mezihostitelů může zvýšit pravděpodobnost jejich ulovení predátorem (definitivním hostitelem) a tím uzavření životního cyklu parazita.

4.2.1. Testování prostorové paměti a učení

Prostorová paměť je na behaviorální úrovni experimentálně studována pomocí různých typů prostorových bludišť. Bludiště zpočátku odpovídala běžné představě mnoha chodbiček a křižovatek. Postupně se začala používat zjednodušená bludiště obsahující jedinou křižovátku s různým počtem chodbiček (bludiště tak mělo tvar písmene T, Y, nebo vícemenné hvězdy). Základem testování pokusných zvířat v bludišti je správné dokončení požadované úlohy (Stuchlík, 2003).

Standardem pro testování prostorové paměti je Morrisovo vodní únikové bludiště (Morris, 1981). Bludiště je tvořeno kruhovitým bazénem naplněným vodou, ve kterém je umístěn ostrůvek zpravidla lokalizovaný ve středu bazénu. Potkani jsou vypouštěni z různých míst na periferii bazénu a mají za úkol doplatit k ostrůvku. Potkan ostrůvek nevidí, jeho polohu si tedy musí pamatovat vzhledem k okolním předmětům. Po několika pokusech je pak potkan schopen nalézt cíl přímou cestou z jakéhokoli místa bazénu. Důležité je, že voda je pro potkana přirozeným prostředím. Naopak myši jsou jako plavci znevýhodněny, neboť je pro ně těžší držet hlavu nad vodou a sledovat okolní orientační body (Whishaw a Tomie, 1996). Z tohoto důvodu se pro testování prostorové paměti u myši častěji používají suchozemská bludiště.

Existují samozřejmě i další testy, které mohou sledovat u hlodavců schopnost učit se. Jedním z nich je test, ve kterém mají hlodavci za úkol přejít kladinu různé šířky nad volným otevřeným prostorem. Přejít kladiny je jednoduchým testem především pro sledování motoriky a koordinace testovaných zvířat (Guenther a kol., 2001). Při opakování testu, je však

možné též pozorovat schopnost hlodavců učit se co nejrychleji uniknout ze stresujícího prostředí, kterým je volný otevřený prostor. Nejčastější postup testování je nejprve přechod širších kladin a až poté kladin užších (Contet a kol., 2001; Deacon a kol., 2002).

4.3. Lokomoční aktivita a explorace

Lokomoční aktivita a explorace umožňují živým organismům přežít v přírodě. Lokomoční aktivita je obvykle měřena jako doba strávená pohybem. Může být zjišťována v dlouhém časovém úseku v prostředí pro zvíře známém, nebo naopak po několik minut v prostředí novém. S lokomoční aktivitou souvisí explorace. Pro každé zvíře je explorace velmi důležitá, neboť umožňuje zvířeti přesně poznat neznámé prostředí a tím i zvětšit šance na přežití v něm. S pomocí explorace objevuje zvíře nové zdroje potravy, učí se rozpoznávat nová nebezpečí, pamatuje si úkryty nebo vhodná místa pro stavbu hnízda (Franck, 1996).

Důležitou úlohu v regulaci těchto prvků chování hraje motorické centrum centrální nervové soustavy. Z tohoto centra jsou řízeny vědomé, chtěné, vůlí ovládané pohyby. Odtud pak vede oboustranné spojení s mozečkem, který se uplatňuje při regulaci svalového napětí, při udržování rovnováhy a při koordinaci volných pohybů (Sternberg, 2002). Lokomoční aktivita a explorace jsou ovlivňovány hladinou neurotransmiteru dopaminu, zejména pak mezo-limbickou dopaminergní projekcí (viz. kap. 6.1.4.).

Behaviorální efekt parazitace má u zvířat často právě charakter změn v lokomoční aktivitě a exploraci nakaženého jedince. Tato behaviorální změna může výrazně ovlivnit, zda bude parazitovaný jedinec uloven predátorem a tedy i definitivním hostitelem (např. kočkovitou šelmou).

Parazitovaní jedinci se sníženou aktivitou pomaleji reagují na blížící se nebezpečí, neboť jejich snížená zdatnost jim nedovolí rychlý útěk (Rau, 1983; Rau a Putter, 1984). Na druhé straně někteří parazité způsobují u svých hostitelů hyperaktivitu. Hyperaktivní jedinci uběhnou za stejný čas mnohem větší vzdálenost než jedinci zdraví, pohyb takto hyperaktivních jedinců je ale často neorientovaný, zmatený a nápadný (Hay a kol., 1983a; Hay a kol., 1983c; Webster, 1994a).

Snížení explorace u parazitovaného jedince znamená např. nalezení menšího množství potravních zdrojů a tím i nižší příjem energie, která je potřebná pro útěk či obranu před nebezpečím. Důsledkem snížení explorační aktivity je horší a pomalejší orientace v novém prostředí (Hutchison a kol., 1980; Rau a Putter, 1984).

4.3.1. Testování lokomoční aktivity a explorace

Lokomoční aktivita a explorace je na behaviorální úrovni experimentálně studována pomocí různých typů arén. Nejpoužívanějším testem je Open-field. Testovací aréna je nejčastěji čtvercová o různé velikosti, která většinou závisí na velikosti experimentálního zvířete. Plocha arény je liniemi rozdělena na menší kvadráty (Frynta, 1992). V tomto testu experimentátor sleduje sérii prvků chování, např. počet panáček, který pravděpodobně vyjadřuje explorační aktivitu (Deacon a kol., 2002), počet proběhnutých čtverců, který odráží lokomoční aktivitu atd. Pomocí Open-field testu můžeme sledovat lokomoční aktivitu v neznámém prostředí, v tomto případě se délka pozorování pohybuje mezi 3 - 10 minutami. Lokomoční aktivita je však v tomto testu ovlivněna nejen explorační (Deacon a kol., 2002), ale zároveň i anxiétou zvířete (Rogers a kol., 1999). Interpretace výsledků v Open-fieldu je proto problematická (File, 2001).

Dalším testem sledujícím lokomoční aktivitu a exploraci je Holeboard test. Narozdíl od Open-fieldu je však pomocí Holeboard testu možné měřit tyto dva prvky chování nezávisle (File, 2001). Do testovací arény je vloženo nepravé dno, do kterého je vyvrtáno 4, 8, nebo 12 otvorů o průměru 15, 25 či 30 mm (Rogers a kol., 1999; File, 2001; Deacon a kol., 2002). Délka pozorování se pohybuje od 3-10 minut. Lokomoce se v tomto testu opět měří pomocí počtu proběhnutých čtverců, explorační aktivita se sleduje jako frekvence zkoumání otvorů a čas strávený touto činností (Deacon a kol., 2002).

Samozřejmě i další testy umožňují stanovení aktivity hlodavců. Jedním z nich je box s umístěným kovovým běhacím kolotočem, ke kterému má zvíře volný přístup. Pomocí čidel napojených na běhací kolotoč může být zaznamenáváno množství otáček, rychlost i celkový čas strávený běháním v průběhu časového úseku, který může být i několik desítek hodin (Festing a Greenwood, 1976; Lightfoot a kol., 2004).

5. Faktory které mohou ovlivnit sledované prvky chování

Existuje celá řada fyziologických faktorů, které mohou ovlivnit výše popsané prvky chování. Případný vliv těchto faktorů je tedy v průběhu etologického testování třeba brát v úvahu.

Jedním z takových faktorů jsou cirkadiální rytmy zvířat, nebo-li pravidelné střídání stavu bdělosti a odpočinku zvířete. V průběhu dne se výrazně mění přirozená aktivita zvířat. Z tohoto důvodu je třeba všechny etologické testy provádět vždy ve stejné fázi dne, nejlépe v době jejich přirozené aktivity. Myši a potkani jsou aktivní v temné fázi dne, naopak

ve světlé fázi dne jejich aktivita výrazně klesá (Nejedlý, 1965).

Druhým faktorem, který by mohl mít vliv na některé námi sledované prvky chování je estrální cyklus testovaných zvířat. Myši a potkani patří mezi polyestrické živočichy s endogenním rytmem, tzn. mezi živočichy, kteří mohou mít více říjí (estrů) do roka a u kterých je dozrávání pohlavních buněk zcela nezávislé na vnějších podmínkách. Složitý regulační mechanismus řídí opakování rozmnožovacích cyklů a estru v pravidelných intervalech po celý rok. Regulační mechanismy jsou u hlodavců stejně tak jako u většiny obratlovců zabezpečeny složitým komplexem hypotalamo-hypofyzálních funkcí.

U dospělých samic myši chovaných odděleně od samců se opakuje estrální cyklus v intervalu 4 - 5 dní s výjimkou období březosti. Estrální cyklus zahrnuje čtyři stádia, která lze od sebe přesně odlišit mikroskopicky z vaginálního výtěru - proestrus, estrus, metestrus a diestrus. Proestrus trvá asi 18 hodin, během něhož se výrazně zvětšují folikuly ve vaječnicích. Vaječnický produkují zvýšené množství estrogenu a děloha zvětšuje své rozměry. Stádium estru trvá kolem 25 hodin. V této fázi je samice schopná úspěšně se pářit. Ovulace probíhá spontánně asi 10 hodin po začátku estru. Následující fázi je metestrus, který má jen krátké trvání, pouze kolem 8 hodin. V této fázi dochází ke zmenšení velikosti a snížení vaskulizace epitelu děložní stěny. Poslední fázi je diestrus, trvající 55 hodin. V této fázi je děložní epitel nízký, žlázy endométrie jsou zmenšeny (Paleček, 1994).

V průběhu estrálního cyklu dochází k pravidelným výrazným změnám hladiny estrogenů v krvi. Od estru k metestru se hladina estrogenů mění až o 50 %. Chemicky patří estrogény k steroidním hormonům. Samičí pohlavní estrogény jsou produkovány vaječnickou zejména ve folikulární fázi estrálního cyklu. Účinky estrogenů jsou mnohostranné. Nejdéle je znám vliv estrogenů na rozmnožování a pohlavní činnost (Rokyta, 2000).

V pokusech na laboratorních potkanech v Morisově vodním bludišti se však ukázalo, že estrogény jsou důležité i pro fixaci paměťové stopy a její vybavování. Samice laboratorních potkanů mají stejně jako samice myši čtyřdenní estrální cyklus (proestrus, estrus, metestrus, diestrus). V době, kdy je hladina estrogenů nízká, měla zvířata výrazně zhoršenou vštipivost paměti i schopnost vybavování. Naopak v době, kdy je hladina estrogenů vysoká, se všechny parametry učení a paměti zlepšily (Healy a kol., 1999). V jiných pokusech byly estrogény podávány laboratorním potkanům v období mimo estrus a jejich paměť se opět výrazně zlepšila (Sandstrom a kol., 2001).

Z experimentů tedy vyplývá, že estrogény jsou velmi důležité i pro učení a paměť hlodavců. Z tohoto důvodu je proto vhodné v pokusech zaměřených na paměť a učení sledovat zároveň i fázi estrálního cyklu testovaných samic, aby byl odstraněn jakýkoli vliv

rozdílných hladin estrogenu v krvi.

6. Mechanismus působení *Toxoplasma gondii*

Jak bylo již uvedeno, pohlavní rozmnožování intracelulárního parazita *Toxoplasma gondii* probíhá pouze v trávicím traktu kočkovitých šelem (v definitivním hostiteli). Z tohoto důvodu je *Toxoplasma gondii* vystavena velmi silnému selekčnímu tlaku na vytvoření specifických mechanismů, pomocí kterých by se mohla zvyšovat pravděpodobnost přenosu do definitivního hostitele. Jedním z nejučinnějších mechanismů je vyvolání změn v chování infikovaného meziphostitele, které usnadní jeho ulovení predátorem (kočkovitou šelmou) (viz. kap. 3.2.1.).

Mechanismus působení *Toxoplasma gondii* na chování meziphostitele nebyl doposud objasněn. Jedna z hypotéz předpokládá, že cysty v mozku mají přímý efekt na centrální nervovou soustavu a tím mohou způsobovat změny chování meziphostitele (Webster, 1994a; Webster a kol., 1994b). Jiní autoři popisují, že metabolické produkty parazita v mozku způsobují zápal a encefalitidu (Ferguson a kol., 1991). Tyto změny nervové tkáně mohou být poté zodpovědné za změny v chování meziphostitele (Hay a kol., 1983a).

Výsledky některých studií však vedou k domněnce, že *Toxoplasma gondii* ovlivňuje hladinu dopaminu v mozku svých meziphostitelů. Roku 1985 Stibbs zjistil, že při latentní toxoplazmóze se v mozku myši hladina dopaminu o 14 % zvyšuje (Stibbs, 1985). Studie toxoplazmózy u lidí též naznačují, že by změny v chování jedinců s latentní toxoplazmózou mohly být způsobené vlivem parazita na dopaminergní aktivitu v mozku. Osoby infikované *Toxoplasma gondii* dosahovaly signifikantně nižších hodnot v psychobiologickém faktoru Vyhledávání nového (Novelty seeking) v Cloningerově dotazníku TCI (Flegr a kol., 2003; Skallová, 2005a). Na základě neurofarmakologických a biochemických dat se předpokládá, že tato temperamentní dimenze Novelty seeking negativně koreluje s hladinou dopaminu.

Dopamin je neurotransmitter katecholaminového typu tvořící se v mozku v dopaminergních centrech (substantia nigra, tegument), z kterých je následně distribuován do specifických mozkových oblastí (bazální ganglia, prefrontální kortex, nucleus accumbens, striatum atd.) (Tarazi, 2001). Změny dopaminu v těchto oblastech mají různý vliv na chování jedince (Nieoullon, 2002). Jeho hladina u člověka ovlivňuje emoce, psychomotorickou aktivitu, spánek, učení a paměť (Bergquist a kol., 2001). U potkanů je dopaminergní aktivita asociována s explorační, aktivitou, anxiétou a reakcí na odměnu (Vallone a kol., 2000). U myši pak působí na lokomoci, reakci na odměnu, panáčkování, paměť a učení (Stibbs, 1985).

Jedním z onemocnění souvisejícím s dopaminergní aktivitou mozku je schizofrenie, při které dochází ke zvýšení hladiny dopaminu v určitých oblastech mozku (Sedvall, 1995). Studie z roku 1957 poukázala na ojedinělý výskyt psychiatrických příznaků podobných schizofrenii při akutní fázi toxoplazmózy. Mezi schizofreniky bylo též pozorováno vysoké procento *Toxoplasma*-pozitivních osob (Jírovec a Vojtěchovský, 1957). Je tedy pravděpodobné, že pokud *Toxoplasma gondii* opravdu působí na hladinu dopaminu, může být toxoplazmóza u citlivých osob jedním z rizikových faktorů pro rozvoj schizofrenie.

Hladinu dopaminu v jednotlivých oblastech mozku infikovaných a kontrolních myší doposud nikdo neporovnával. Roku 1985 Stibbs porovnával pouze celkové množství dopaminu v mozku infikovaných a kontrolních myší (Stibbs, 1985). Jednou z metod, která by mohla sloužit k porovnání hladiny dopaminu resp. počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech mozku myší je imunohistochemická metoda detekce a následné vyhodnocování pomocí automatizované analýzy obrazu.

6.1. Dopamin

Koncem padesátých let 20. století provedl Arvid Carlsson sérii studií, které prokázaly, že dopamin je důležitým neurotransmiterem v mozku.

Neurotransmitery jsou látky uvolňované z neuronu do synaptické štěrbině a ovlivňující aktivitu (excitovatelnost) pouze jedné nebo několika prostorově blízkých buněk. Zajišťují tak mezibuněčný přenos nervového signálu. Z chemického hlediska se jedná o monoaminy, aminokyseliny a peptidy.

Monoaminergní systémy je možné rozdělit do dvou základních podsystémů: katecholaminergního (buňky systému obsahují noradrenalin, adrenalin a dopamin) a serotoninergního (buňky systému obsahují 5-hydroxytryptamin). Neurony obsahující monoaminy se nacházejí především v mozkovém kmeni a mají rozsáhlé vzdálené spoje (Trojan a kol., 2003).

6.1.1. Syntéza a degradace dopaminu

Syntéza neurotransmiterů spočívá v enzymatické úpravě jednoduchých prekursorů, které se do neuronů dostávají obvykle ve spolupráci s gliovými buňkami. Biosyntéza dopaminu začíná hydroxylací tyrozinu, kterou katalyzuje tyrozinhydroxyláza na L-DOPA, jejíž dekarboxylací vzniká dopamin. Přeměna tyrozinu na L-DOPA a L-DOPA na dopamin probíhá v cytosolu, poté je dopamin přenesen do zásobních váček (Roth a Elsworth, 1995;

Bergquist a kol., 2001; Fišar a Jiráček, 2001).

Dopamin uvolněný při nervovém impulsu do synapse je ve velké míře zpětně vychytáván do nervového zakončení prostřednictvím transportérů (DAT), nebo je odbourán intracelulárně monoaminoxidázou (MAO) nebo extracelulárně katechol-O-methyltransferázou (COMT) (Shih a kol., 1999; Kukleta a Šulcová, 2003).

6.1.2. Dopaminergní neurony

Somata dopaminergních neuronů leží převážně v mesencephalonu a diencephalonu. Dopaminergní neurony dělíme na skupiny neuronů značených jako A8 - 17. První dopaminergní skupina neuronů značená A8 leží v laterálních částech nucleus reticularis pontis oralis (rostrálně souvisí se substantia nigra, pars compacta). Poté následuje A9 - substantia nigra, pars compacta, A10 - area ventralis tegmenti, A11 - nucleus premamillaris dorsalis (hypothalamus), A12 - nucleus infundibuly, A13 - zona interna (dorsomedial hypothalamus), A14 - area hypothalamica anterior, A15 - area preoptica, A16 - bulbus olfactorius a poslední A17 - soubor dopaminových neuronů v sítnici oka. Obecně lze tedy shrnout, že skupina A8 - 10 zásobuje dopaminem bazální ganglia a kůru, A12 zásobuje neurohypofýzu, A11,13 - 15 zásobuje laterální septum, hypothalamus a míchu a A16, 17 jsou tvořeny lokálními interneurony v bulbus olfactorius v retině (Roth a Elsworth, 1995; Petrovický, 1998; Tohyama a Takatsuji, 1998).

6.1.3. Receptory dopaminu

Doposud bylo identifikováno 5 podtypů dopaminových receptorů, které se dělí do dvou skupin na farmakologicky a biochemicky podobné D1 receptoru (D1, D5) nebo D2 receptoru (D2, D3, D4) (Sedvall, 1995). Podtypy D1 a D5 jsou spojené se stimulací adenylcyklázy, podtyp D2, D3 a D4 s její inhibicí (Riedel a Platt, 2004). Dopaminové receptory jsou částečně ovlivnitelné oběma dalšími katecholaminy (adrenalinem a noradrenalinem) (Tarazi, 2001).

D1 a D2 receptory jsou oproti ostatním podtypům v mozku široce distribuovány. Afinita D3, D4 a D5 receptorů pro dopamin je v nanomolární nebo submikromolární oblasti, zatímco afinita D1 a D2 receptorů je nižší (mikromolární).

Skupina D1 receptorů

D1 receptory jsou vysoce exprimovány v neostriatu, substantia nigra, nucleus accumbens a v čichových lalocích, zatímco lokalizace D5 receptorů je mnohem více omezena (Zvolský, 1994). D5 receptory nalezneme v hipokampu, thalamu, striatu a mozkové kůře (Riedel a Platt, 2004). D1 receptory regulují kognitivní funkce (prostorová paměť, učení), kardiovaskulární funkci a pohyb. Funkce D5 receptorů není zatím zcela prozkoumána (Sedvall, 1995; Strange, 2000; Tarazi, 2001; Viggiano a kol., 2003b).

Skupina D2 receptorů

D2 receptory se vyskytují ve dvou formách - krátké presynaptické (D2S) a dlouhé postsynaptické (D2L). Stimulace D2S způsobuje poněkud větší inhibici adenylátcyklázy než D2L (Fišar a Jiráček, 2001). D2 receptory jsou exprimovány v bazálních gangliích, nucleus accumbens a ventrální části tegmentu (Zvolský, 1994; Riedel a Platt, 2004). D3 a D4 nalezneme především v oblastech limbického systému (Kerwin, 2000). D2 receptory se u savců podílejí především na kontrole aktivity. Funkce D3 a D4 receptorů není přesně známa, ačkoliv jejich lokalizace v částech limbického systému v mozku naznačuje jejich působení na kognitivní funkce a emoce (Steiner a kol., 1998; Strange, 2000; Tarazi, 2001).

6.1.3.1. Narušení funkce D receptorů

Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, každá skupina D receptorů má specifický vliv na určité prvky chování. Již mnoho studií se zabývalo změnami v chování myší, které nastávají po podání antagonistů či agonistů jednotlivých D receptorů, nebo změnami v chování myší, jež mají absenci některého z typu D receptorů.

Silná redukce panáčkování, groomingu a deficit prostorové paměti byl pozorován u myší bez D1 receptorů (D1R knockouty). Ke stejným změnám docházelo i při aplikaci selektivních D1 antagonistů. Ke snížení lokomoce, pozornosti a počtu panáček dochází u myší bez D2 receptorů. Podání selektivních D2 antagonistů vedlo rovněž k redukci lokomoce a počtu panáček. U D3R KO myší byla pozorována hyperaktivita a snížená anxieta, naopak myší bez D4 receptorů vykazovaly anxieta zvýšenou (Steiner a kol., 1998; Smith a kol., 2000; Nieoullon, 2002; Viggiano a kol., 2003a; Viggiano a kol., 2003b).

6.1.4. Dopaminergní dráhy

Dopaminergní dráhy můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin 1. mezencefalické dopaminergní neurony vysílají spoje hlavně do tří oblastí - striata, kůry a limbického bazálního telencefala. 2. diencefalické dopaminergní neurony ovlivňují především hypofýzu (Petrovický, 1998).

Mezo-striatická (nigrostriatální) dráha

Mezo-striatická projekce vychází z A8 - 10 (ze substantia nigra, pars compacta) a končí hlavně v dorzálních a středních částech striata (caudate putamen). Mezo-striatická projekce patří do soustavy spojů bazálních ganglií. V jejich hlavním okruhu (spojení ve směru: kůra - striatum - pallidum, substantia nigra reticularis - thalamus - kůra) rozlišujeme podle korového začátku 4 hlavní okruhy: senzo-motorický, okulo-motorický, asociální a limbický okruh. Mezo-striatická projekce má vliv především na emocionalitu, aktivitu, orientaci a reakci na odměnu.

Mezo-kortikální dráha

Mezo-kortikální projekce vychází především z A10 (area ventralis tegmenti) ve ventrální oblasti. Vlákná mezo-kortikálních drah probíhají ventrálním mesencephalonem a vstupují do laterálního hypothalamu. Na horním konci hypothalamu se vlákna stáčí pod corpus callosum a vstupují do cortex frontalis, cortex cingularis a cortex piriformis a entorhinalis. Tento systém má vazbu na pozornost, pohyb, exploraci, motivaci, učení a paměť.

Mezo-limbická dráha

Mezo-limbická projekce vychází z A10 (area ventralis tegmenti) a probíhá shodně s vlákny mezo-kortikální projekce. Projekce do nucleus accumbens začíná v celé střední části A10. Projekce pro amygdalu začíná ve střední laterální části A10. Projekce pro septum laterale začíná ve ventrální části A10. Projekce pro tuberculum olfactorius začíná v dorzální části A10. Tento systém souvisí s motivačním chováním, zahrnující aktivitu závislou na odměně. Mezo-limbické dráhy jsou také asociovány s lokomocí a exploračním chováním (Roth a Elsworth, 1995; Hersi a kol., 1996; Fišar a Jiráček, 2001; Tarazi, 2001; Nieouillon, 2002; Trojan a kol., 2003).

6.2. Imunohistochemie

Jednou z metod, která může sloužit k detekci aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně myši, je imunohistochemie.

Základním cílem imunohistochemických metod je detekce specifických antigenních determinant (molekul nebo jejich částí) v tkáních. Pro správnost imunohistochemické detekce má zásadní význam dokonalost fixace odebrané tkáně, neboť schopnost správné identifikace buněčných proteinů závisí na jejich zachování v tkáňových řezech. Důležitý význam má samozřejmě také správné zvolení typu imunohistochemického barvení (Cuello, 1993).

6.2.1. Fixace tkáně

Cílem fixace je zachování buněk a tkání ve stavu, který je co nejpodobnější tomu, v němž se vyskytují za živa. Fixace zastaví metabolické děje stabilizací enzymů a dalších proteinů. Toho lze dosáhnout fixačními roztoky jako je například roztok glutaraldehydu, ethanolu atd., zmrazením tkáně a eventuálně i teplem. Průkaz látky je třeba provádět *in situ*, tj. přímo v místě jejího normálního výskytu v tkáni. Při fixaci je vždy důležitý výběr správného fixativa, které je vázáno na konkrétní reakci, kterou se snažíme provádět, a na typ prokazované látky (Beranová a Tonar, 2002).

Jelikož je dopamin velmi nestabilní látka, při jeho detekci je hlavní složkou fixáže glutaraldehyd, který tvoří stabilní dopamin-glutaraldehyd komplex. Na tento komplex se poté váže monoklonální protilátka proti dopaminu (Geffard a kol., 1983; Chagnauda a kol., 1987).

6.2.2. Imunohistochemické barvení

Imunohistochemické barvení je cenná metoda pro detekci specifických antigenů v tkáních. Imunohistochemické metody využívají mono či polyklonálně značené protilátky, které lokalizují a vizualizují příslušné tkáňové antigeny na principu vazby antigenu a protilátky. Imunohistochemie je využívána ke specifitějšímu průkazu látek schopných zúčastnit se reakce jako antigeny (Cuello, 1993; Beranová a Tonar, 2002).

Imunohistochemické metody dělíme na tři nejčastěji užívané typy - přímé, nepřímé dvojstupňové a nepřímé třístupňové.

Přímá metoda je nejjednodušší způsob detekce lokalizace antigenu v tkáni. Primární protilátka je v tomto případě označena fluorochromem, enzymem nebo kovem. Přímé metody lze využít pouze tehdy, je-li antigen ve studované tkáni v dostatečně vysoké koncentraci.

Nepřímá dvojstupňová metoda je oproti přímé metodě mnohem citlivější. Na tkáňové

řezy se nejprve aplikuje neoznačená primární protilátka, která je specifická proti prokazovanému antigenu. Poté se nanáší druhá (sekundární) protilátka, která je značená fluorochromem nebo enzymem a imunologickou vazbou se váže na protilátku primární.

Nepřímé trojstupňové metody slouží k zesílení signálu, pokud je množství antigenu ve tkáni nízké. V první fázi této metody reaguje primární specifické antisérum s antigenem prokazovaným ve tkáni, v druhé fázi je aplikována specifická, neoznačená, sekundární protilátka, ve třetí pak značený komplex například PAP, tj. peroxidáza-anti-peroxidázový komplex. Tento typ imunohistochemické metody je mnohem citlivější než obě předešlé metody (Beranová a Tonar, 2002).

Jednou z nejcitlivějších a nejvíce rozšířených metod patřících mezi třístupňové nepřímé imunohistochemické metody, která se používá právě pro detekci dopaminu v nervové tkáni, je technika avidin-biotin komplex (ABC metoda). Princip této techniky spočívá v označení sekundární protilátky biotinem a jeho následné vazbě s avidin-biotinovým komplexem značeným křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivita této peroxidázy poté lokalizuje ta místa, ve kterých došlo k primární specifické reakci. Přítomnost specifické reakce se v další fázi zviditelní vhodnou reakcí, kdy produktem činnosti peroxidázy je nerozpustný pigment (www.vectorlabs.com). Je-li detekční komplex značen peroxidázou, používá se jako chromogen DAB, tj. chromogen 3,3'-diaminobenzin. Peroxidáza poté reaguje se svým substrátem, kterým je peroxid vodíku. Oxidací DAB vzniká v místě reakce stabilní hnědý produkt, který se zachovává při montování řezů (Beranová a Tonar, 2002).

6.3. Analýza obrazu

Počítačová analýza obrazu je moderní analytická metoda, která je nepostradatelnou metodou v mnoha odvětvích přes aplikace v medicíně, chemickém průmyslu až po uplatnění v kriminalistice.

Počítačová analýza obrazu začíná definováním standardních podmínek pro dané měření. Tyto podmínky musí být poté zachovány po celou dobu měření, aby bylo dosaženo opakovatelných výsledků. Obrázky pro analýzu obrazu jsou v současnosti snímány zpravidla pomocí digitální kamery.

Počítačovou analýzou obrazu můžeme měřit velké množství parametrů snímaných vzorků a to jak kvalitativních tak i kvantitativních. Za standardní funkce programu lze označit úpravy jasu, kontrastu a intensity barev, převod barevného obrazu na šedý, vyznačení oblastí zájmu (Region of Interest- ROI) a úpravy jejich vlastností. Specializovanější programy

umožňují vykonávat analýzu podle různých kritérií, měřit objekty podle vzoru, analyzovat a transformovat barvy, aritmeticky a logicky kombinovat obrazy. Výsledky těchto hodnocení jsou dále ve většině případech zpracovávány příslušnými statistickými metodami (Jiráček, 2004).

7. Vliv latentní toxoplazmózy na chování F1 kříženců myší kmenů BALB/c a C57/b

7.1. Příprava experimentálních zvířat

Jelikož u inbredních kmenů dochází ke snížení životaschopnosti a patrně i k narušení přirozených behaviorálních projevů použili jsme v baterii etologických testů F1 generaci kříženců kmenů myší BALB/c (♀) a C57/b (♂). Kříženci těchto dvou inbredních kmenů jsou izogenetičtí, narozdíl od rodičovských kmenů jsou však hybridy heterozygotní a v behaviorálních pokusech se projevují podobně jako myši outbrední.

Šedesát jedna samic a čtrnáct samců (AnLab) stáří 8 týdnů o hmotnosti 19 - 20 g bylo rozděleno po 7 - 8 (samci po jednom) do standardních chovných boxů typu T3 (samice), T2 (samci). Pro chov sloužily infekční chovy Přírodovědecké fakulty University Karlovy v Praze, Viničná 7. Voda a granulované krmivo (ST1, Velaz) byly přístupné ad libitum. V chovné místnosti byla udržována teplota v rozmezí 23 - 26°C a stálý dvanáctihodinový světelný režim (temná fáze dne od 14:00 - 02:00 hod.).

Po desetidenní habituaci bylo 31 samicím a 7 samcům perorálně podáno 0,5 ml inokula obsahující přibližně 10 tkáňových cyst *Toxoplasma gondii* cystogenního avirulentního kmene HIF. Stejným způsobem bylo podáno 0,5 ml fyziologického roztoku 30 samicím a 7 samcům kontrolním. Všech 75 myší inokulaci přežilo.

U všech experimentálních zvířat byla v pravidelných intervalech sledována hmotnost (2x týdně), vnější příznaky onemocnění (změna srsti, koordinace pohybů atd.). U samic byla v době některých experimentů sledována i fáze estrálního cyklu pomocí vaginálních výtěrů. Všechny etologické pokusy (mimo testu s běhacími kolotoči) byly provedeny 10 týdnů po infekci vždy v temné fázi světelného cyklu (mezi 15:00 - 22:00 hodinou večerní).

Po ukončení všech etologických pokusů byla zvířatům odebrána v anestezii krev ze supraorbitálního sinu. Stanovení množství protilátek v krvi bylo provedeno komplement fixační metodou (KFR). Na závěr experimentu bylo též stanoveno průměrné množství cyst v mozku 12 infikovaných samic a 3 infikovaných samců. Mozek každého infikované zvířete

byl zhomogenizován ve fyziologickém roztoku ve skleněném homogenizátoru. Prostřednictvím mikroskopu bylo poté ve vzorku homogenátu spočítáno množství cyst (10 x 15 µl) při zvětšení 40x. Počet nalezených cyst ve vzorku byl následovně přepočten na celý objem homogenátu.

Původ experimentálních zvířat použitých ve třech ze čtyř testů pachových preferencí

Test pachových preferencí byl proveden celkem čtyřikrát, ve třech případech však byl prováděn na jiných souborech laboratorních myší a tedy zcela nezávisle na baterii etologických testů popisovaných v této práci. Experimenty se lišily pouze kmenem použitých myší. Výsledky těchto experimentů (č. 1-3) jsou uváděny zároveň s výsledky experimentu č. 4, který byl proveden na F1 generaci kříženců kmenů myší BALB/c a C57/B (30 *Toxoplasma*-positivních a 30 kontrolních samic, 7 *Toxoplasma*-positivních a 7 kontrolních samců) (AnLab).

Pro experiment č. 1 bylo použito 58 samic kmene BALB/c (28 *Toxoplasma*-positivních a 30 kontrolních) (AnLab). Inokulace, průběh infekce a detekce protilátek proti *Toxoplasma gondii* je podrobně popsána v diplomové práci Šárky Kaňkové (2005). Pro experiment č. 2 a 3 bylo použito 46 (23 *Toxoplasma*-positivních a 23 kontrolních) samců a 60 samic (30 *Toxoplasma*-positivních a 30 kontrolních) F1 generace kříženců kmenů myší BALB/c a B10A (AnLab). Inokulace, průběh infekce a detekce protilátek proti *Toxoplasma gondii* je podrobně popsána v diplomové práci Anny Skallové (2005).

Všechna zvířata testovaná v těchto experimentech byla infikována přibližně 10 tkáňovými cystami stejným avirulentním cystogenním kmenem *Toxoplasma gondii* HIF (viz. kap. 6.2.). Zvířata byla v průběhu testování přibližně stejného stáří (5 měsíců). Behaviorální testování probíhalo ve všech případech cca 10-11 týdnů po infekci a vždy v tmavé fázi dne.

7.2. Příprava inokula

Experimentální myši byly infikovány tkáňovými cystami avirulentním cystogenním kmenem *Toxoplasma gondii* HIF. Tento avirulentní cystogenní kmen byl izolován z mozkomíšního moku HIV pozitivního muže roku 1993 v Praze (Kodym a kol., 2002).

Mozky tří infikovaných myší byly zhomogenizovány ve fyziologickém roztoku ve skleněném homogenizátoru. Celkový objem suspence byl 5 ml. Počet cyst byl stanoven pod mikroskopem a posléze přepočítán na celkový obsah suspence. Suspence byla dále

naředěna fyziologickým roztokem na celkový objem 20 ml. Myším bylo perorálně pipetou aplikováno 0,5 ml inokula, které obsahovalo přibližně 10 tkáňových cyst.

7.3. Stanovení množství protilátek v krvi komplement fixační reakcí (KFR)

Krev odebrána ze supraorbitálního sinu byla stočena a vzniklé sérum bylo 45 minut inaktivováno v 56°C teplé vodní lázni. Do jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 25 µl veronalového pufru (Complement fixation ditulent tables). Do každé první jamky bylo přidáno 25 µl inaktivního séra. Opakovaným přenesením 25 µl směsi séra a pufru byla séra v jednotlivých jamkách naředěna dvojkovou řadou od 1:2 až po 1:4096. První jamka ředění sloužila jako ředění pomocné, následující ředění 1:4, do kterého se přidalo 25 µl veronalového pufru, sloužilo jako kontrola antikomplementarity. Do jamek od ředění 1:8 bylo přidáno 25 µl antigenu (Sevatest toxoplasma antigen). Poté bylo do všech jamek včetně kontrol antikomplementarity napipetováno 50 µl komplementu (Sevatest toxoplasma komplement). Destičky byly 30 sekund protřepány na třepačce a dány přes noc do vlhké komůrky. Následující den byl připraven hemolytický systém z Hemolyzínu (Sevac) a 2,8 % suspence beraních erytrocytů v poměru 1:1, který byl senzibilizován ve 37°C teplé vodní lázni. Tento hemolytický systém byl přidán do všech jamek v množství 25 µl. Destičky byly protřepány a dány na 60 minut do vlhké komůrky při teplotě 37°C. Jako kontroly sloužily známé pozitivní a negativní lidská séra, standardně byla též provedena kontrola antigenu (25 µl veronalového pufru + 25 µl antigenu + 50 µl komplementu), kontrola komplementu (50 µl veronalového pufru + 50 µl komplementu) a kontrola hemolytického systému (100 µl). V polovině inkubace byly destičky opět protřepány. Přemístěním destiček do prostředí o teplotě 4°C byla celá reakce zastavena. Po dvou hodinách již byly výsledky odečítány.

Pokud sérum obsahuje specifické antitoxoplasmatické protilátky vzniká komplex antigen-protilátka, který váže komplement a tím zabraňuje lyzi krvinek. Stupeň hemolýzy tak odpovídá množství protilátek v séru. Poslední ředění, při kterém krvinky ještě sedimentují se udává jako výsledný titer. Jestliže sérum naopak neobsahuje protilátky proti *Toxoplasma gondii* nastává úplná hemolýza krvinek.

7.4. Uspořádání etologických experimentů

Etologické experimenty byly prováděny v únoru a březnu roku 2005 (test pachových preferencí č. 1 byl prováděn v květnu roku 2004, test pachových preferencí č. 2 a 3 v září roku 2004) vždy ve stejné experimentální místnosti v infekčních chovech Přírodovědecké fakulty University Karlovy (test pachových preferencí č.1 ve státním Zdravotním Ústavu v Praze). Do experimentální místnosti byla zvířata 3 hodiny před počátkem každého pokusu přenesena a ponechána v klidu, aby se tak mohla habituovat na nové prostředí. Všechna měření kromě testu s běhacími kolotoči, který probíhal 48 hodin, byla prováděna v tmavé fázi dne v rozmezí 15:00 - 22:00 hod. Test s běhacími kolotoči byl prováděn 10 dní po ukončení baterie etologických testů, neboť musela být z technických důvodů změněna temná fáze světelného režimu na 20:00 - 08:00 hod. a bylo nutno ponechat zvířatům dostatek času přizpůsobit se novým podmínkám. Samci byli testováni pouze v testu pachových preferencí.

Každý pokus byl snímán videokamerou (spontánní aktivita v běhacím kolotoči snímána čidly napojenými na počítač, která zaznamenávala počet impulsů v 30s intervalech) a vyhodnocován až po ukončení experimentů prostřednictvím programu The Observer.

Pro větší přesnost výsledků byla ve vybraných pokusech (osmiramenné radiálně bludiště, test pachových preferencí č. 4) sledována také fáze estrálního cyklu testovaných samic myší.

7.4.1. Test pachových preferencí

Test pachových preferencí byl prováděn v plastickém akváriu o rozměrech (36 x 20 x 25 cm), ve kterém byla 1 cm vysoká podestýlka čistých hoblin. V akváriu byly symetricky umístěny dvě krabičky (8 x 8 cm) s kruhovým otvorem o průměru 3 cm. Otvory krabiček byly orientovány vždy od sebe (obr. č. 1). Do každé z krabiček byl dáván pět dní starý substrát (1-2 cm) infikovaných a kontrolních zvířat.

Každé testované zvíře bylo umístěno do akvária hlavou směrem ke stěně a ponecháno v akváriu po dobu 10 minut. Poloha krabiček se substrátem *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myších byla náhodně měněna.

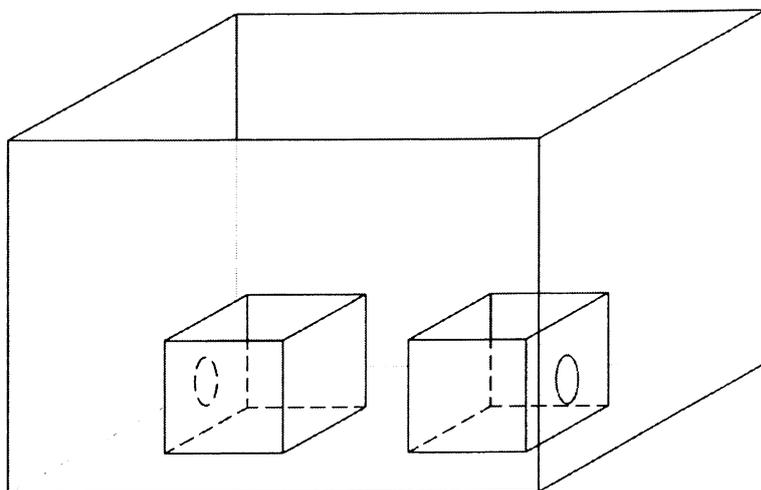
Po ukončení každého pokusu byly krabičky se substrátem vyměněny za krabičky se substrátem od zvířat jiných, celé akvárium bylo vymyto 96 % etanolem a podestýlka byla vyměněna za čistou. Akvárium bylo vždy umístěno na stejném místě v testovací místnosti

a osvětleno 240 W červenou žárovkou značky Phillips. Chování myši bylo po celých 10 minut snímáno kamerou.

V pokusu byl vyhodnocován čas strávený v jednotlivých krabičkách, frekvence návštěv jednotlivých krabiček, čas strávený inaktivitou a pohybem.

Tento pokus byl proveden celkem 4x (viz. kapitola 7.1.). V experimentu č. 1 byly hodnoceny pachové preference *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samic kmene BALB/c. Tyto samice měly na výběr mezi pachem *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samic kmene BALB/c. V experimentu č. 2 byly naopak hodnoceny pachové preference samců F1 křížence kmenů BALB/c a B10A. Tyto samci měli na výběr mezi pachem *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samců F1 křížence kmenů BALB/c a B10A. V experimentu č. 3 byly hodnoceny pachové preference samic F1 křížence kmenů BALB/c a B10A. Tyto samice měly na výběr mezi pachem *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samců F1 křížence kmenů BALB/c a B10A. Experiment č. 4 byl totožný s experimentem č. 3, avšak byly použity myši F1 křížence kmenů BALB/c a C57/b a zároveň byla u samic také sledována fáze estrálního cyklu, která může velmi ovlivňovat preference samic.

Obr. č. 1: Znárodnění testovací aparatury v testu pachových preferencí.



7.4.2. Reakce na změnu potravy

V průběhu jednoho týdne bylo vždy po 24 hodinách měřeno množství pozřené potravy u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší. Prvních šest dní bylo měřeno množství pozřené standardní potravy (krmná směs pro hlodavce, ST1, Velaz). Po šesti měřeních byla tato potrava změněna na krmnou směs pro laboratorní králíky (KO-16, Velaz) (jiný tvar, složení, pach) a opět bylo po 24 hodinách změřeno množství pozřené potravy.

Jelikož byl tento experiment zaměřen na reakci testovaných zvířat na nový podnět, kterým byla změna potravy, byl prováděn před experimentem s osmiramenným radiálním bludištěm, neboť již v tomto experimentu byla zvířatům podána odlišná potrava (jáhle) než standardní krmná směs pro hlodavce.

7.4.3. Osmiramenné radiální bludiště

Osmiramenné radiální bludiště bylo vyrobeno z průhledného plexiskla, jehož základ tvořil osmiúhelník o straně 40 cm. Z centrálního osmiúhelníku o průměru 23 cm vycházelo osm stejných ramen šířky 8 cm, délky 32 cm a výšky 20 cm (obr. č. 2).

Testovaná samice byla umístěna pokaždé na začátek stejného ramene (START) zády k centru bludiště. Úkolem každé samice bylo nalézt odměnu (3 zrnka jáhel) umístěnou na konci třetího ramene napravo od startovního ramene (CÍL). Mimo tohoto ramene byly konce všech ostatních ramen odděleny plexisklovou přepážkou.

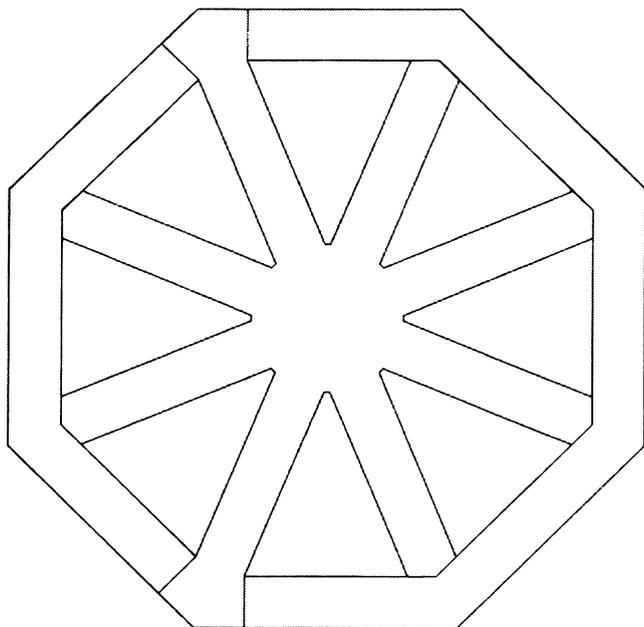
Každá samice byla před prvním testovacím dnem ponechána 24 hodin bez jídla. První večer samice podstoupila 4 pokusy za sebou (v prvním pokusu byly samice v bludišti ponechány 3 minuty, aby si mohly dostatečně prozkoumat nové prostředí), poté jí byla na 30 minut potrava vrácena a následně opět odebrána. Následující den byl postup zopakován. Každá samice byla tedy testována po dobu dvou večerů, první den byl den tréninkový, druhý den pak den prověřovací.

Bludiště bylo v průběhu pokusů umístěno vždy na stejném místě uprostřed testovací místnosti a osvětleno 240 W červenou žárovkou značky Phillips. Po každém pokusu bylo celé bludiště vyčištěno 96 % etanolem. Veškeré běhy byly zaznamenávány videokamerou.

V tomto pokuse byl hodnocen čas potřebný k nalezení cílového ramene a počet provedených chyb. Za chybu bylo považováno vběhnutí do jiného ramene než do ramene s odměnou. Pokud však zvíře do nesprávného ramene pouze vstoupilo a opět vyběhlo, bylo toto chování hodnoceno jako půl chyby. Jestliže zvíře odměnu nenašlo do 3 minut (vyjma

prvního pokusu první tréninkový den), pokus byl ukončen a zvířeti byl započítán maximální počet chyb, neboli maximální počet provedených chyb za 3 minuty (12,5 chyb).

Obr. č. 2: Znárodnění osmiramenného radiálního bludiště.



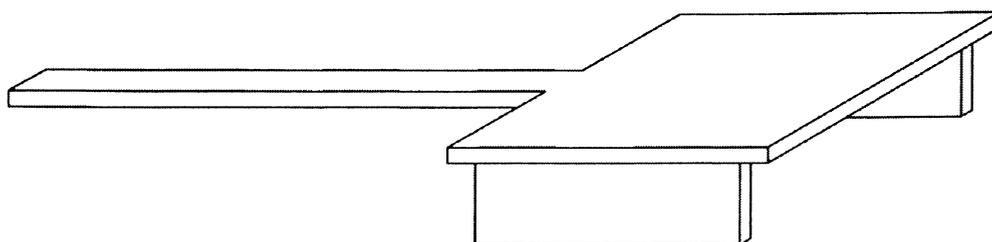
7.4.4. Přechod kladiny

Kladiny byly tvořeny dřevěnou lištou o délce 50 cm a šířce 2,5 nebo 4,3 cm. Dřevěná lišta byla vždy upevněna jedním koncem k pevné ploše o rozměrech 30 x 30 cm a vyvýšena přibližně 50 cm nad povrchem, který byl pokryt dostatečnou vrstvou čistých pilin pro případ pádu pokusného zvířete z kladiny (obr. č. 3).

Každá testovaná myš byla na počátku pokusu umístěna na volný konec kladiny, hlavou směrem od pevné plochy. V testu byla hodnocena latence otočky myši směrem k pevné ploše, čas přechodu po kladině a dále pak celkový čas strávený na kladině. Pokud myš kladinu nezdolala do 90 sekund byla rukou navedena k pevné ploše, pokus tak byl hodnocen jako za nesplněný. Testovanému zvířeti byl tak zapsán maximální čas přechodu (90 sec.) Pokus byl považován za splněný pouze v případě, jestliže myš stála všemi čtyřmi nohama na pevné ploše.

Každá myš byla testována po dobu šesti dnů. První tři dny měly myši za úkol přejít kladinu o šířce 4,3 cm, následující tři dny pak kladinu o šířce 2,5 cm. Každý den myš podstoupila pouze jeden přechod kladiny. Pořadí testovaných myší bylo náhodně měněno. Kladina byla vždy umístěna na stejném místě v testovací místnosti a osvětlena 240 W červenou žárovkou značky Phillips.

Obr. č. 3: Znárodnění testovací aparatury v testu přechodu kladin.



7.4.5. Holeboard-test

Test byl prováděn ve čtvercové aréně o rozměrech 60 x 60 x 40 cm. Aréna byla vytvořena z černého neprůhledného plexiskla, na jejíž dno bylo vloženo druhé „nepravé“ dno, ve kterém byly 4 pravidelně rozmístěné otvory o průměru 2 cm. Toto dno bylo též rozděleno na 16 čtverců o velikosti 15 x 15 cm.

Myši byly vkládány vždy do rohu arény hlavou ke stěně a ponechány v aréně po dobu 10 minut. Celý experiment probíhal po dobu 3 dnů. Každý den bylo otestováno 5 infikovaných plus 5 kontrolních myší s podaným ritanserinem a 5 infikovaných plus 5 kontrolních myší bez podání ritanserinu.

1,7 mg ritanserinu (A 68930, Sigma-aldrich) bylo rozpuštěno v 2,96 ml 5 % glukózy a v 45 μ l koncentrované kyseliny octové. Testovaným myším bylo intraperitoneálně aplikováno 100 μ l roztoku drogy v dávce 2 mg/kg. Polovině kontrolním a polovině infikovaným zvířatům bylo stejným způsobem podáno 100 μ l roztoku 5 % glukózy s přídatkem 15 μ l koncentrované kyseliny octové na 1 ml. Zvířata byla testována 80 minut po aplikaci ritanserinu (resp. roztoku 5 % glukózy s koncentrovanou kyselinou octovou).

Po každém pokusu byla aréna vyčištěna 96 % etanolem. Aréna byla v průběhu pokusů umístěna na stejném místě uprostřed testovací místnosti a osvětlena 240 W červenou žárovkou značky Phillips. Každý pokus byl zaznamenáván videokamerou.

V tomto pokuse byla hodnocena:

Délka očíhávání – celkový čas, který myš strávila očíháváním otvorů

Latence očíhávání – čas, ve kterém myš poprvé začala očíhávat některý z otvorů

Délka zkoumání – celkový čas, který myš strávila zkoumáním otvorů

Latence zkoumání – čas, kdy myš poprvé ponořila hlavu do některého z otvorů až po linii uší

Frekvence zkoumání – počet návštěv otvorů, při nichž měla myš hlavu v otvoru

Inaktivita – čas strávený pasivním sezením

Běh – čas strávený prostým pohybem bez panáčků, zkoumání atd.

Grooming – čas strávený čištěním

Latence 1. aktivity – latence opuštění čtverce, do kterého byla testovaná myš na začátku experimentu umístěna

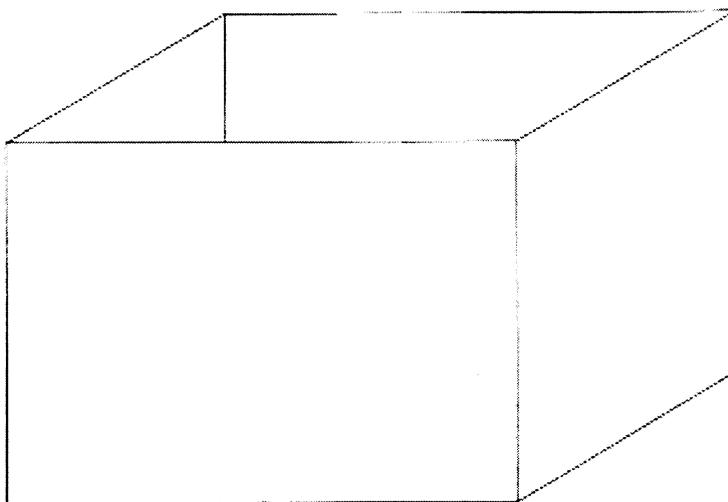
Panáčky celkem – počet všech panáčků (s oporou i bez opory)

Čtverce – počet čtverců, do kterých myš vstoupila všema čtyřma nohama

Počet vstupů do středu – kolikrát myš vstoupila do středového čtverce všema čtyřma nohama

Čas strávený ve středu – čas strávený ve středovém čtverci

Obr. č. 4: Znárodnění testovací aparatury v holeboard testu.

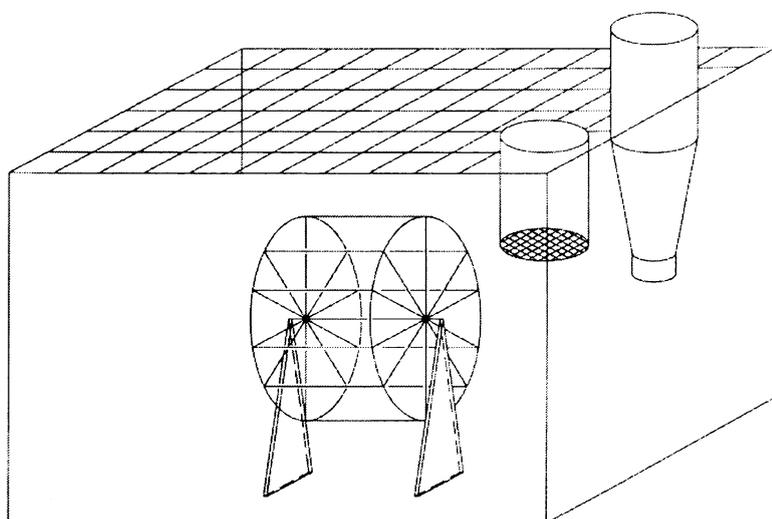


7.4.6. Test s běhacími kolotoči

Testovací aparatura byla tvořena plexisklovým akváriem o rozměrech 36 x 20 x 25 cm, ve kterém byl umístěn kovový běhací kolotoč o průměru 14 cm (obr. č. 4). Akvárium bylo uzavřeno kovovým mřížovým víkem se speciálním čidlem, které snímalo jednotlivé impulsy vycházející z pohybujícího se kolotoče. Toto čidlo bylo napojeno na počítač, který tyto impulsy z čidla v půlminutových intervalech zaznamenával. Na základě těchto zaznamenaných dat byla poté vypočítána rychlost, uběhnutá dráha a počet aktivních minut v průběhu testování. Voda a granulované krmivo byly přístupné ad libitum. V každém akváriu byla vždy umístěna pouze jedna myš po dobu 48 hodin. Začátek testování byl vždy v 10:00 hodin.

Celý experiment trval šest dní, za 48 hodin bylo otestováno celkem 10 myší, vždy 5 myší infikovaných a 5 myší kontrolních. Akvária byla po ukončení každého pokusu vymyta 96 % etanolem, a přemístěna náhodně na jiné místo v testovací místnosti.

Obr. č. 5: Znárodnění testovací aparatury v testu s běhacími kolotoči.



7.4.7. Určení fáze estrálního cyklu u samic laboratorních myší

Při určování fáze estrálního cyklu bylo postupováno následovně (protokol: Určení fáze estrálního cyklu u samic myši domácí, Dušek). Nejprve byl proveden vaginální výtěr, kdy bylo do vagíny samice opakovaně vstříknuto 4 μ l sterilního PBS a posléze byla tato suspence nasáta pipetou. Na odmaštěné podložní sklo byla suspence rozetřena a nechána uschnout. Tento suchý nátěr byl poté zpracován na trvalý preparát podle Pappenheimana. Nejprve bylo naneseno May-Gunwaldovo barvivo po dobu 3 minut. Preparát byl opláchnut pod tekoucí vodou. Poté bylo naneseno PBS po dobu 1 minuty. Na závěr byl nanesen roztok Giemsa-Romanovského (ředění 1:10) po dobu 15 minut. Preparát byl opět opláchnut pod tekoucí vodou a nechán uschnout. Tyto preparáty již byly prohlíženy a vyhodnocovány pod světelným mikroskopem.

Vyhodnocení: 1. Proestrus - velké množství epiteliálních buněk s velkými jádry, často ve svazcích. 2. Estrus - velké množství plochých hranatých keratinizovaných buněk, ostatní typy buněk nejsou přítomny. 3. Metestrus - velké množství kulovitých leukocytů (neutrofilní granulocyty) s laločnatými jádry. 4. Diestrus - velké množství drobných leukocytů a šlemu.

7.5. Statistické zpracování dat

Data získána při etologických testech byla vyhodnocena prostřednictvím programu STATISTICA 6.0. Před samotným vyhodnocením dat byly ze souborů vyřazeny odlehle hodnoty, konkrétně hodnoty lišící se od průměru pro danou skupinu o více než 2,5 násobku směrodatné odchylky. Podíl vyřazených pozorování v žádném případě nepřesáhl 10 %. Jelikož neměla některá data normální rozdělení, byla u těchto dat provedena transformace ve tvaru $X' = \log(X)$. V těchto případech byly odlehle hodnoty vyřazeny až po transformaci dat. Pokud data obsahovala nulové hodnoty byla u nich použita transformace dat ve tvaru $X' = \log(X+1)$.

Pokud není u jednotlivých etologických testů uvedeno jinak byly pro testování rozdílů mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi použity obecné lineární modely (GLM, General Linear Models). Nezávislou proměnou byla veličina TOXO, odlišující *Toxoplasma*-pozitivní a kontrolní myši. Jako kovariáta byla zvolena ve všech případech proměnná hmotnost, aby byl odfiltrován případný vliv hmotnosti na studovaný efekt. V testech ve kterých byla dále zaznamenávána fáze estrálního cyklu (osmiramenné radiální bludiště) byl případný vliv této proměnné opět odfiltrován (dosazení jako první nezávislá kategorická

proměnná). Statistické modely použité v ostatních etologických testech jsou popsány vždy ve výsledkové části diplomové práce.

Rozdíly v jednotlivých prvcích chování byly považovány za signifikantní pokud byla dosažena hladina významnosti menší než 5 %.

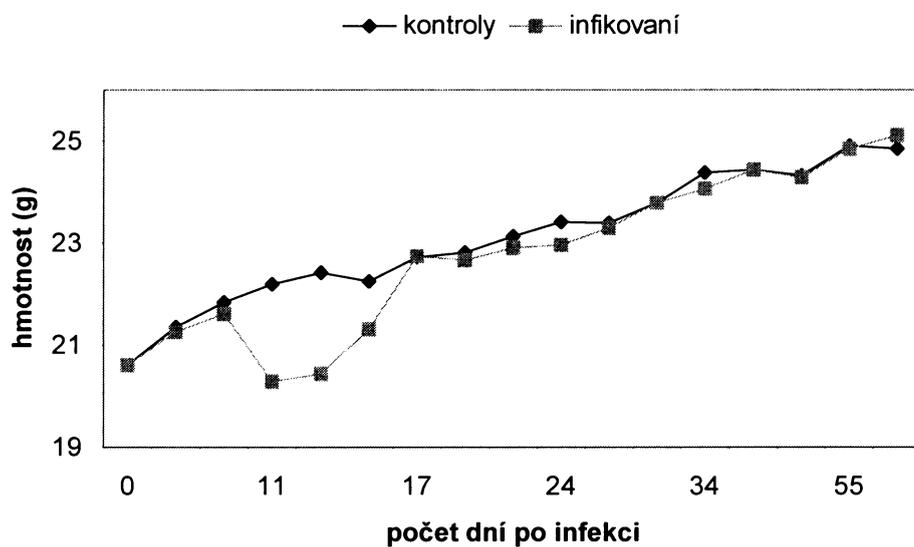
7.6. Výsledky etologických pokusů

7.6.1. Klinické příznaky onemocnění

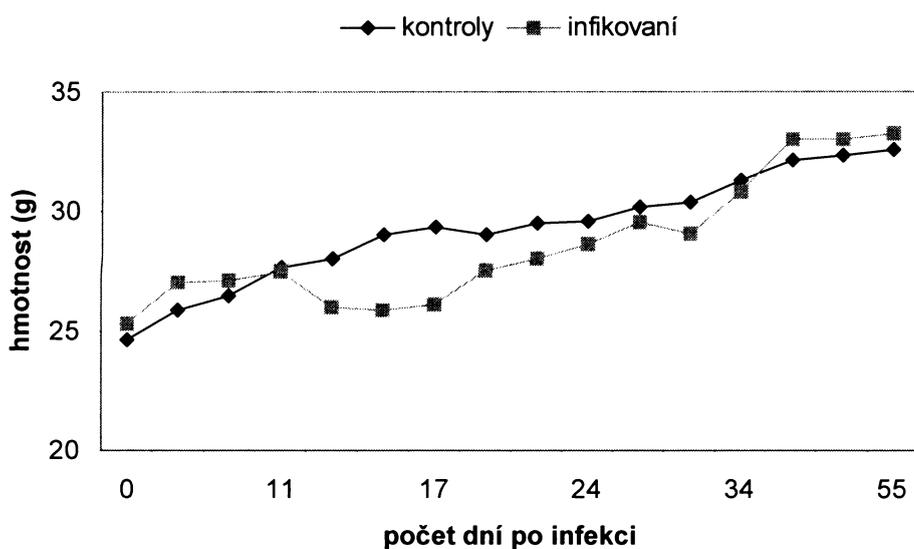
V průběhu celého pokusu byla u experimentálních zvířat v pravidelných intervalech sledována hmotnost a vnější příznaky onemocnění, u většiny infikovaných myší však žádné výrazné příznaky onemocnění pozorovány nebyly. Od 8. dne (u samic) a 11. dne (u samců) po infekci byl zaznamenán pokles váhy, kdy nejnižší hmotnost byla shledána 11. den (u samic) a 14. den (u samců) po inokulaci (graf č. 1 a 2). Váhový úbytek u samic byl statisticky významný mezi 11. – 14. dnem ($p < 0,0007$) u samců mezi 13. – 17. dnem ($p < 0,001$).

Na závěr experimentu byla u všech testovaných zvířat provedena detekce protilátek v séru komplement fixační metodou. U všech infikovaných samic i samců byla přítomnost protilátek potvrzena (100 % úspěšnost nákazy), zatímco u kontrolních samic a samců se přítomnost protilátek neprokázala. Po ukončení baterie etologických testů (17 týdnů p.i.) bylo mikroskopicky v mozcích infikovaných samic a samců nalezeno 40 - 280 tkáňových cyst ($n = 15$, $\bar{x} = 94$ cyst/mozek). Zjištěný titr protilátek koreloval s počtem nalezených cyst v mozku infikovaných samic.

Graf č. 1: Změny v průměrné hmotnosti samic F1 křížence BALB/c x C57/b po infikování prvokem *Toxoplasma gondii*. Osa x znázorňuje počet dní po inokulaci, osa y znázorňuje hmotnost v gramech.



Graf č. 2: Změny v průměrné hmotnosti samců F1 křížence BALB/c x C57/b po infikování prvokem *Toxoplasma gondii*. Osa x znázorňuje počet dní po inokulaci, osa y znázorňuje hmotnost v gramech.



7.6.2. Testy pachových preferencí

7.6.2.1. Rozdíly v samičí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samic (test pachových preferencí č. 1)

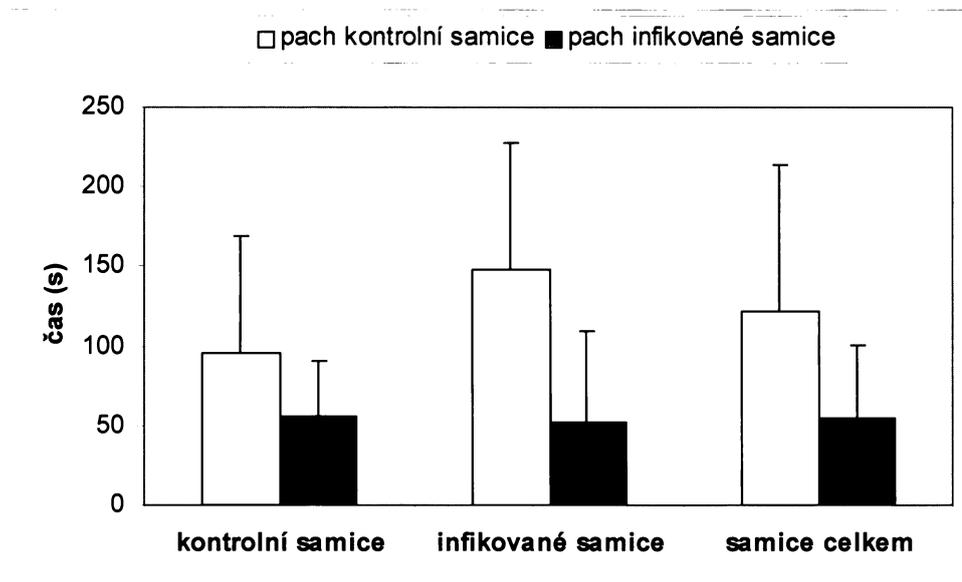
Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v celkovém čase stráveném uvnitř boxů (GLM, $p = 0,17$) ani v pachových preferencích, tj. v poměru časů strávených v boxu s pilinami infikovaných a kontrolních samic (Mann Whitney U test, $p=0,19$). Ani u ostatních sledovaných prvků chování (frekvence návštěv boxů, inaktivita, pohyb) nebyly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi prokázány žádné statisticky významné rozdíly (GLM).

Průměrné časy strávené uvnitř jednotlivých boxů jsou zaznamenány v tabulce číslo 1. Při výběru mezi pachem *Toxoplasma*-pozitivní nebo kontrolní samice, samice vždy výrazně preferovaly pach samice kontrolní (Dvouvýběrový t-test, $p=0,001$).

Tab. č. 1: Rozdíly v čase, který strávily *Toxoplasma*-pozitivní a kontrolní samice kmene BALB/c uvnitř boxů s pachem pilin od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samic. Průměrné časy strávené uvnitř boxů jsou uvedeny v sekundách, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Dvouvýběrový t-test.

Samice:	Box s pachem:				df	p
	Kontrolní samice		Infikované samice			
	průměr	SD	průměr	SD		
Kontrolní (n=30)	96,3	72,74	56,19	34,06	27	0,091
Infikované (n=28)	147,53	80,35	52,66	56,36	27	0,009
Celkem (n=58)	121,91	92,61	54,43	46,08	55	0,001

Graf č. 3: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi kmene BALB/c v čase stráveném uvnitř boxů s pilinami od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samic. Osa y znázorňuje čas v sekundách, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.



7.6.2.2. Rozdíly v samčí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samců (test pachových preferencí č. 2)

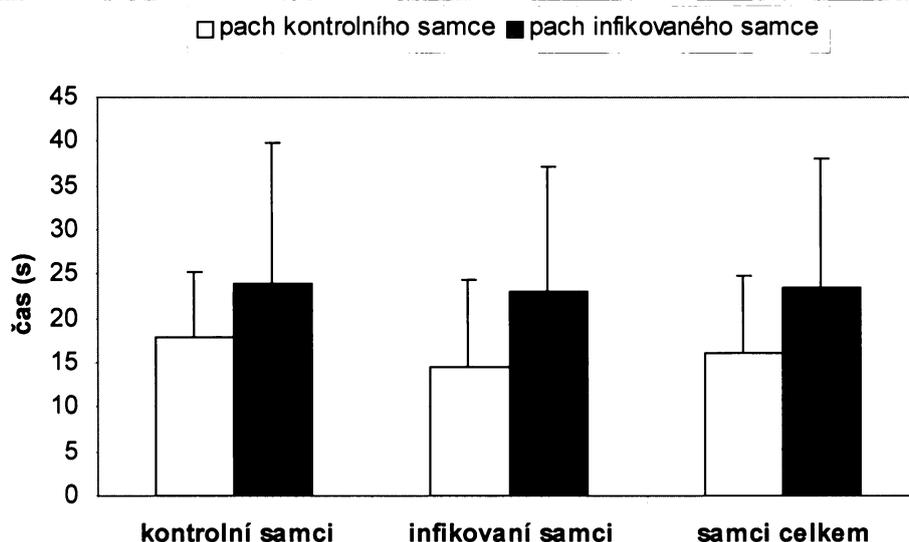
Žádný statisticky významný rozdíl mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samci nebyl prokázán v celkovém čase stráveném uvnitř boxů (GLM, $p=0,88$). Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samci nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ani v pachových preferencích, tj. v poměru časů strávených v boxu s pilinami infikovaných a kontrolních samců (Mann Whitney U test, $p=0,61$). U ostatních sledovaných prvků chování (frekvence návštěv boxů, inaktivita, pohyb) nebyly rovněž prokázány žádné statisticky významné rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi.

Průměrné časy strávené uvnitř jednotlivých boxů jsou zaznamenány v tabulce číslo 2. Při výběru mezi pachem *Toxoplasma*-pozitivního nebo kontrolního samce, vždy samci preferovali pach samce infikovaného ($p=0,023$).

Tab.č. 2: Rozdíly v čase, který strávili *Toxoplasma*-pozitivní a kontrolní samci F1 křížence kmenů BALB/c x B10A uvnitř boxů s pachem pilin od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samců. Průměrné časy strávené uvnitř boxů jsou uvedeny v sekundách, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Dvouvýběrový t-test.

Samci:	Box s pachem:				df	p
	Kontrolního samce		Infikovaného samce			
	průměr	SD	průměr	SD		
Kontrolní (n=23)	17,80	7,59	24,01	15,79	21	0,160
Infikovaní (n=23)	14,66	9,75	23,03	14,18	20	0,081
Celkem (n=46)	16,23	8,55	23,50	14,65	44	0,023

Graf č. 4: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samci F1 křížence kmenů BALB/c x B10A v čase stráveném uvnitř boxů s pilinami od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samců. Osa y znázorňuje čas v sekundách, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.



7.6.2.3. Rozdíly v samičí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samců (test pachových preferencí č. 3)

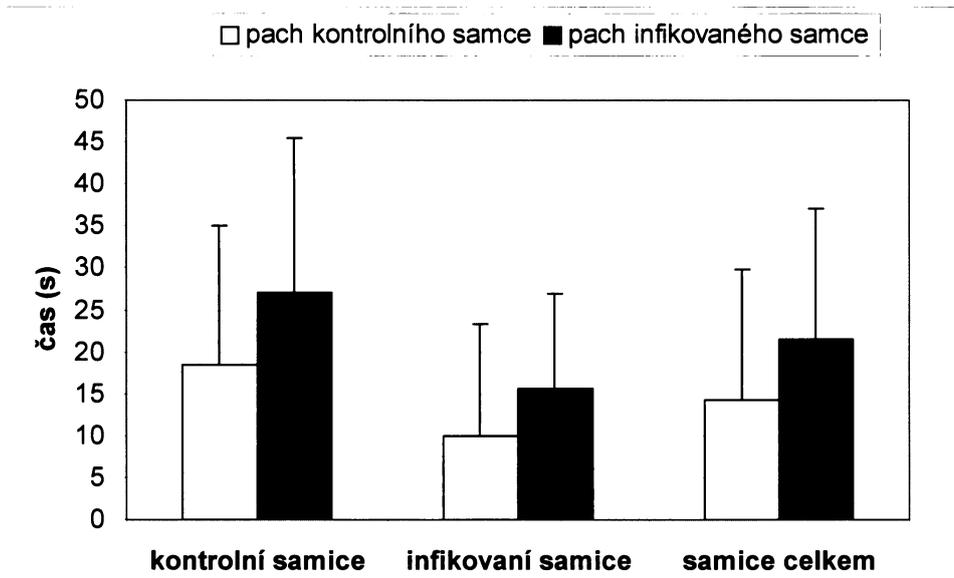
Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v celkovém čase stráveném uvnitř boxů (GLM, $p=0,28$). Statisticky významný rozdíl nebyl prokázán ani v pachových preferencích, tj. v poměru časů strávených v boxu s pilinami infikovaných a kontrolních samců (Mann Whitney U test, $p=0,50$). U ostatních sledovaných prvků chování (frekvence návštěv boxů, inaktivita, pohyb) nebyly opět prokázány žádné statisticky významné rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi.

Průměrné časy strávené uvnitř jednotlivých boxů jsou zaznamenány v tabulce číslo 3. Při výběru mezi pachem *Toxoplasma*-pozitivního nebo kontrolního samce, vždy samice výrazně preferovaly pach samce infikovaného ($p=0,008$).

Tab.č. 3: Rozdíly v čase, který strávily *Toxoplasma*-pozitivní a kontrolní samice F1 křížence kmenů BALB/c x B10A uvnitř boxů s pachem pilin od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samců. Průměrné časy strávené uvnitř boxů jsou uvedeny v sekundách, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Dvouvýběrový t-test.

Samice:	Box s pachem:				df	p
	Kontrolního samce		Infikovaného samce			
	průměr	SD	průměr	SD		
Kontrolní (n=30)	18,50	16,57	27,10	18,36	28	0,041
Infikované (n=30)	9,98	13,38	15,70	11,34	27	0,100
Celkem (n=60)	14,32	15,55	21,54	15,57	56	0,008

Graf č. 5: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x B10A v čase stráveném uvnitř boxů s pilinami od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samců. Osa y znázorňuje čas v sekundách, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.



7.6.2.4. Rozdíly v samicí preferenci pachu infikovaných a kontrolních samců (test pachových preferencí č. 4)

Žádný statisticky významný rozdíl mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl prokázán v celkových časech strávených uvnitř boxů (GLM, $p=0,55$). Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi byl prokázán statisticky významný rozdíl v jejich pachových preferencích, tj. v poměru časů strávených v boxu s pilinami infikovaných a kontrolních samců (Mann Whitney U test, $p=0,039$). *Toxoplasma*-pozitivní samice oproti samicím kontrolním preferovaly signifikantně častěji pach *Toxoplasma*-pozitivního samce.

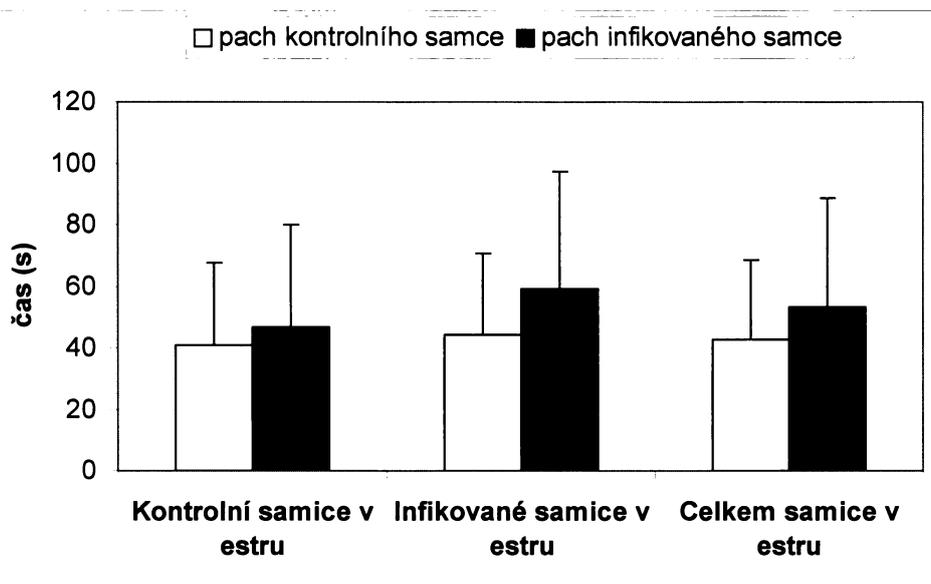
Průměrné časy strávené uvnitř jednotlivých boxů jsou zaznamenány v tabulce číslo 4. Při výběru mezi pachem *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samců, samice mimo období estru (samice v neestru) výrazně preferovaly pach samce infikovaného ($p=0,0008$).

U ostatních sledovaných prvků chování (frekvence návštěv boxů, inaktivita, pohyb) nebyly shledány žádné statisticky významné rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi.

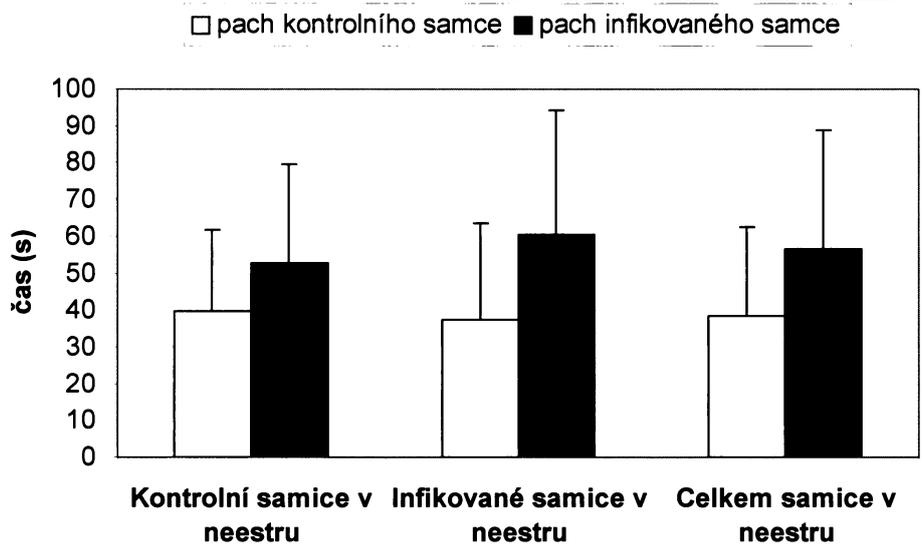
Tab. č. 4: Rozdíly v čase, který strávily *Toxoplasma*-pozitivní a kontrolní samice F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b uvnitř boxů s pachem pilin od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samců. Průměrné časy strávené uvnitř boxů jsou uvedeny v sekundách, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Dvouvýběrový t-test.

Samice:		Box s pachem:				df	p
		Kontrolního samce		Infikovaného samce			
		průměr	SD	průměr	SD		
Kontrolní (n=30)	estrus (n=8)	41,05	26,58	46,76	33,2	7	0,630
	neestrus (n=21)	39,88	21,99	52,77	26,81	20	0,047
Infikované (n=31)	estrus (n=9)	44,21	26,47	59,28	38,09	8	0,263
	neestrus (n=22)	37,35	26,17	60,38	34,04	20	0,006
Celkem (n=61)	estrus (n=17)	42,72	25,73	53,39	35,35	16	0,222
	neestrus (n=43)	38,61	23,90	56,57	32,34	41	0,0008

Graf č. 6: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b (v estru) v čase stráveném uvnitř boxů s pilinami od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samců. Osa y znázorňuje čas v sekundách, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.



Graf č. 7: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b mimo období estru (v neestru) v čase stráveném uvnitř boxů s pilinami od *Toxoplasma*-pozitivních nebo kontrolních samců. Osa y znázorňuje čas v sekundách, chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky.



7.6.3. Reakce na změnu potravy

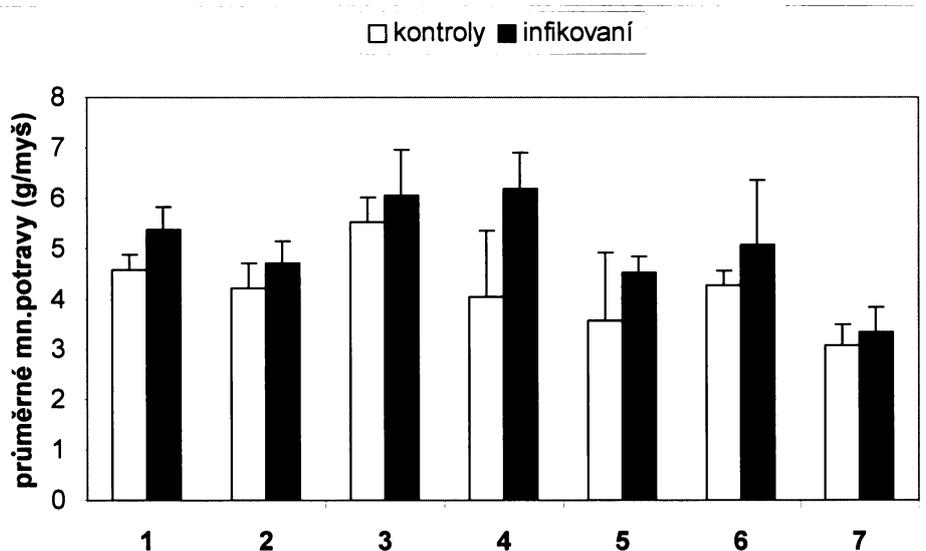
V průběhu sedmi dnů bylo měřeno množství pozřené potravy (měření č. 1-6: standardní krmná směs pro hlodavce, měření č. 7: krmná směs pro králíky) u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samic. Průměrné hodnoty množství pozřené standardní krmné směsi pro hlodavce a krmné směsi pro laboratorní králíky během jednotlivých měření jsou uvedeny v tabulce číslo 5. Po všechny dny pokusu zkonsumovaly infikované samice více standardní krmné směsi pro hlodavce než samice neinfikované. V prvním a čtvrtém měření byl tento rozdíl statisticky významný (GLM, $p=0,039$ resp. $p=0,042$).

Po záměně standardního krmiva pro hlodavce za nový typ potravy (krmivo pro králíky) spotřeba krmiva poklesla u infikovaných i neinfikovaných myší. Tento pokles množství potravy byl výraznější u myší infikovaných. Rozdíl v poklesu spotřeby krmiva mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi však nebyl signifikantní (GLM, $p=0,150$).

Tab. č. 5: Rozdíly v množství požitého krmiva za 24 hodin u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samic F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b. Průměrná množství krmiva jsou uvedena v gramech, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Měření č. 1-6 znázorňuje množství spotřebovaného granulovaného krmiva pro hlodavce v prvních 6 dnech pokusu. Měření č. 7 znázorňuje množství spotřebované potravy sedmý den pokusu, tj. po záměně krmiva pro hlodavce za krmivo pro králíky. Hodnoty statistické významnosti (p) byly získány metodou GLM.

Měření	Kontrolní (n=30)		Infikovaní (n=31)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
1	4,58	0,29	5,38	0,44	7,6	0,039
2	4,22	0,49	4,71	0,44	1,95	0,220
3	5,52	0,50	6,05	0,91	1,20	0,322
4	4,05	1,31	6,19	0,71	4,66	0,042
5	3,57	1,34	4,52	0,33	1,67	0,251
6	4,28	0,28	5,06	1,29	1,18	0,326
7	3,08	0,41	3,34	0,50	0,78	0,410

Graf č. 8: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v množství krmiva spotřebovaného za 24 hodin. Měření č. 1-6 znázorňuje množství spotřebovaného granulovaného krmiva pro hlodavce v prvních 6 dnech pokusu. Měření č. 7 znázorňuje množství spotřebovaného granulovaného krmiva pro králíky (během 7. dne pokusu). Osa x znázorňuje číslo měření, osa y znázorňuje množství krmiva v gramech, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



7.6.4. Sledování prostorové paměti a schopnosti učení v osmiramenném radiálním bludišti

Průměrné časy nalezení cílového ramene s odměnou v osmiramenném radiálním bludišti a počet vstupů do nesprávných ramen (počet provedených chyb) u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší v jednotlivých bězích jsou zaznamenány v tabulkách číslo 6 a 7.

Signifikantní rozdíl mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi byl pozorován ve druhém a třetím běhu druhý prověřovací den. *Toxoplasma*-pozitivním samicím oproti samicím kontrolním trvalo signifikantně delší dobu než našly cílové rameno s odměnou (GLM, $p=0,041$ resp. $p=0,035$). *Toxoplasma*-pozitivní samice v těchto bězích též dosáhly signifikantně vyššího počtu chyb než samice kontrolní (GLM, $p=0,047$ resp. $p=0,013$).

U *Toxoplasma*-pozitivních samic došlo k signifikantně menšímu poklesu počtu provedených chyb při hledání cílového ramene, tj. procesu učení, v průběhu 7 běhů oproti samicím kontrolním (Repeated Measures Anova, $p=0,028$). Bez zahrnutí výsledků prvního běhu druhý prověřovací den (4. běh) byl efekt menšího poklesu počtu provedených chyb při hledání cílového ramene s odměnou u *Toxoplasma*-pozitivních samic výraznější (Repeated Measures Anova, $p=0,014$). Statisticky významný rozdíl v poklesu času potřebného k nalezení potravy v průběhu 7 resp. 6 běhů mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl pozorován.

Žádný statisticky významný rozdíl mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl zaznamenán v prostorové paměti, tj. rozdílu času nalezení cílového ramene ani v počtu provedených chyb při hledání cílového ramene, v 3. běhu prvního tréninkového dne a v 1. běhu druhého dne prověřovací, tedy po 24 hodinové prodlevě (Repeated Measures Anova, čas nalezení cílového ramene: $p=0,64$; počet provedených chyb: $p=0,45$).

Do statistického modelu Repeated Measures Anova byla zahrnuta jako závislá proměnná čas nalezení cílového ramene resp. počet provedených chyb při hledání cílového ramene v hodnocených bězích, nezávislou proměnnou byla veličina TOXO. Hodnota p uvádí statistickou významnost R1 x TOXO interakce.

Nebyl zaznamenán žádný vliv fáze estrálního cyklu na schopnost prostorového učení .

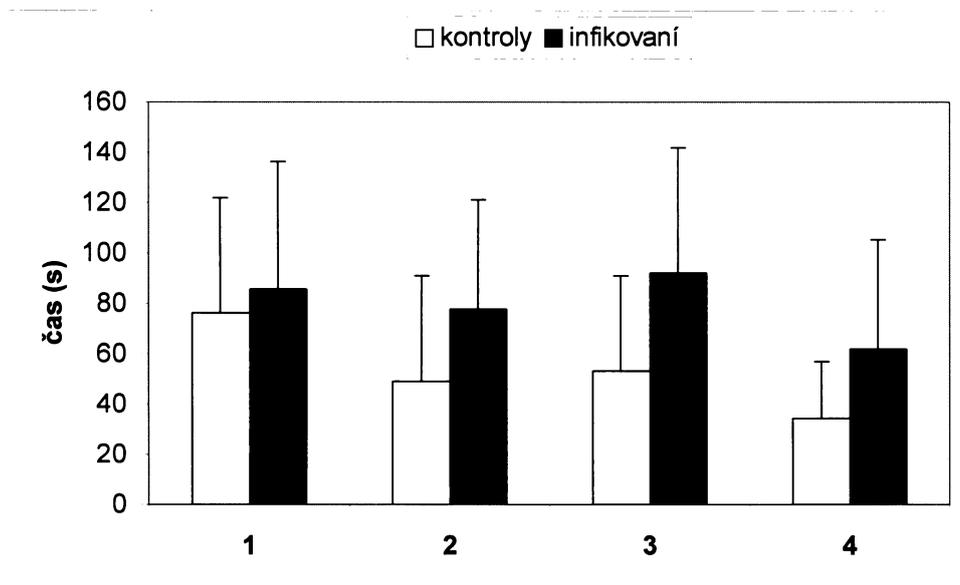
Tab. č. 6: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v časech nalezení cílového ramene v osmiramenném radiálním bludišti. Průměrné časy nalezení cílového ramene jsou vyjádřeny v sekundách, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Výsledné hodnoty p byly vypočteny metodou GLM po odfiltrování vlivu estrálního cyklu pro transformovaná (logaritmovaná) data.

Pokus	Den	Kontrolní (n=30)		Infikovaní (n=31)		F	p
		průměr	SD	průměr	SD		
1	1	56,5	35,35	66,48	42,40	0,18	0,660
2	1	56,7	42,09	50,4	43,25	1,34	0,260
3	1	50,13	23,58	69,80	40,13	0,20	0,640
1	2	76,26	45,71	85,58	50,81	1,19	0,271
2	2	49,14	41,76	77,6	43,68	4,37	0,041
3	2	53,26	37,59	92,22	49,80	4,66	0,035
4	2	34,2	22,73	62,00	43,19	1,69	0,190

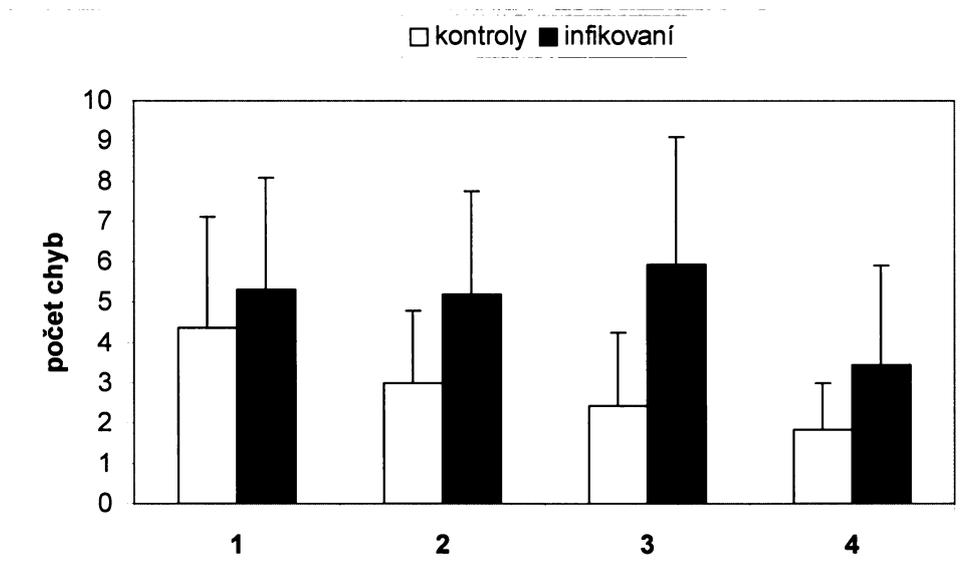
Tab. č. 7: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v počtu vstupů do nesprávných ramen (počet provedených chyb) při hledání cílového ramene v osmiramenném radiálním bludišti. Výsledné hodnoty p byly vypočteny metodou GLM po odfiltrování vlivu estrálního cyklu pro transformovaná (logaritmovaná) data.

Pokus	Den	Kontrolní (n=30)		Infikovaní (n=31)		F	p
		průměr	SD	průměr	SD		
1	1	3,43	2,52	3,69	2,71	0,24	0,620
2	1	3,31	2,69	2,40	2,80	3,99	0,050
3	1	2,43	1,92	3,46	3,14	0,01	0,900
1	2	4,38	2,74	5,33	2,75	1,99	0,276
2	2	3,00	1,79	5,20	2,56	4,09	0,047
3	2	2,43	1,83	5,93	3,16	6,53	0,013
4	2	1,85	1,15	3,46	2,46	1,12	0,292

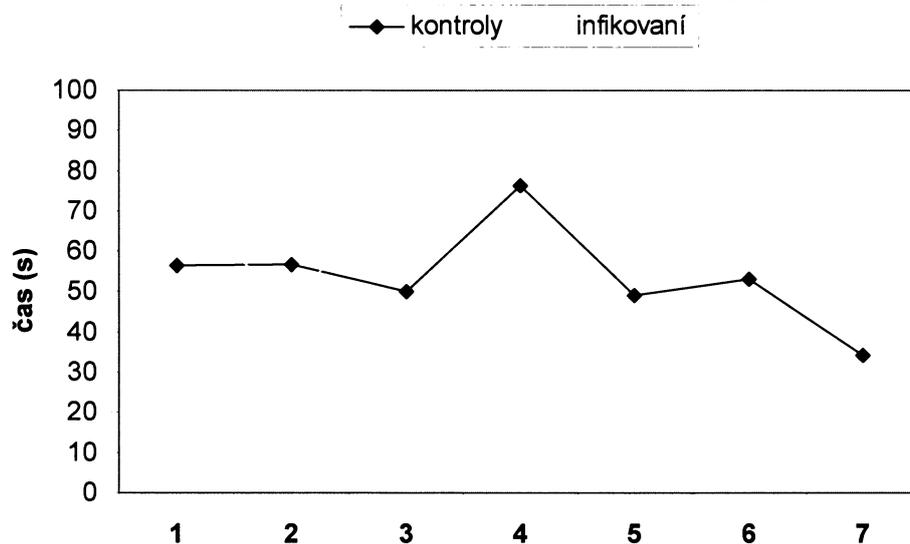
Graf č. 9: Rozdíly mezi kontrolními a *Toxoplasma*-positivními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v celkovém čase stráveném hledáním cílového ramene v osmiramenném radiálním bludišti druhý prověřovací den. Osa y značí čas v sekundách, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.



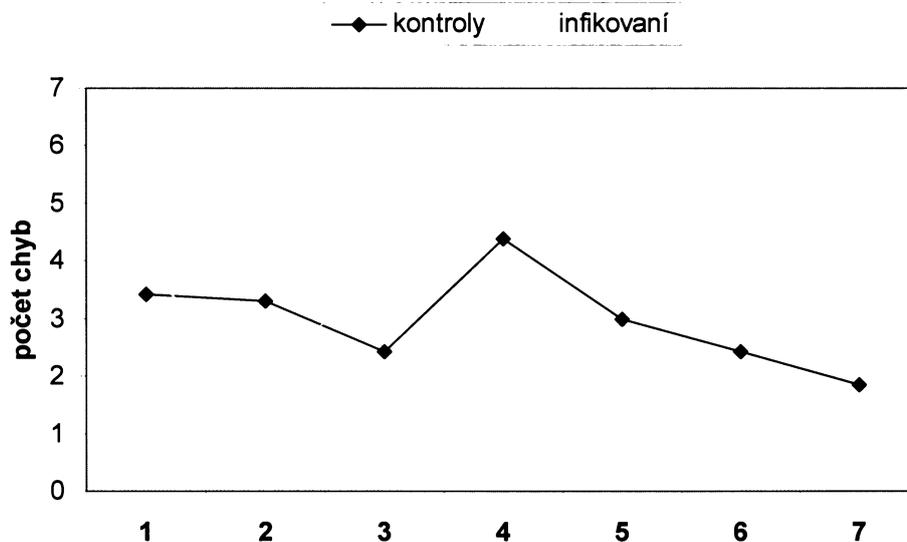
Graf č. 10: Rozdíly mezi kontrolními a *Toxoplasma*-positivními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v počtu vstupů do nesprávných ramen (počet provedených chyb) při hledání cílového ramene v osmiramenném radiálním bludišti druhý prověřovací den. Osa y značí počet provedených chyb, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.



Graf č. 11: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v čase hledání cílového ramene v osmiramenném radiálním bludišti v průběhu testování první den tréninový (pokus č. 1-3) a druhý den prověřovací (pokus č. 4-7). Osa x znázorňuje číslo pokusu, osa y znázorňuje čas strávený hledáním cílového ramene v sekundách.



Graf č. 12: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v počtu vstupů do nesprávných ramen (počet provedených chyb) při hledání cílového ramene v osmiramenném radiálním bludišti v průběhu testování první den tréninový (pokus č. 1-3) a druhý den prověřovací (pokus č. 4-7). Osa x znázorňuje číslo pokusu, osa y znázorňuje počet chyb provedených při hledání cílového ramene.



7.6.5. Přejchod kladin

Průměrné hodnoty jednotlivých prvků chování na kladině o různé šířce jsou zaznamenány v tabulce číslo 8 a 9.

V prvním a druhém pokusu na kladině o šířce 43 mm nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi. Ve třetím pokusu na kladině o šířce 43 mm byl zaznamenán signifikantní rozdíl v celkovém čase stráveném na kladině a v čase potřebném k přechodu kladiny mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi. *Toxoplasma*-pozitivní samice strávily na kladině v obou případech signifikantně delší čas než samice kontrolní (GLM, $p=0,016$ resp. $p=0,030$). Celkový čas potřebný k přechodu kladiny o šířce 43 mm v prvním pokusu u samic negativně koreloval s hmotností (GLM, $p=0,034$).

V druhém a třetím pokusu na kladině o šířce 25 mm byly zaznamenány rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi v čase potřebném k přechodu této kladiny. *Toxoplasma*-pozitivním samicím trvalo signifikantně delší čas než tuto kladinu zdolaly (GLM, $p=0,037$ resp. $p=0,039$).

Latence otočky směrem k plošině se mezi infikovanými a kontrolními samicemi myší v žádném pokusu nelišila.

Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi byl zaznamenán signifikantní rozdíl v procesu učení, tj. poklesu celkového času potřebného k přechodu kladiny o šířce 43 mm a 25 mm v průběhu testování. U *Toxoplasma*-pozitivních samic docházelo signifikantně k nižšímu poklesu času potřebného k přechodu kladin v průběhu testování oproti samicím kontrolním (Repeated Measures Anova, $p=0,020$).

Do statistického modelu Repeated Measures Anova byla zahrnuta jako závislá proměnná čas potřebný k přechodu kladin v jednotlivých pokusech, nezávislou proměnou byla veličina TOXO. Hodnota p uvádí statistickou významnost R1 x TOXO interakce.

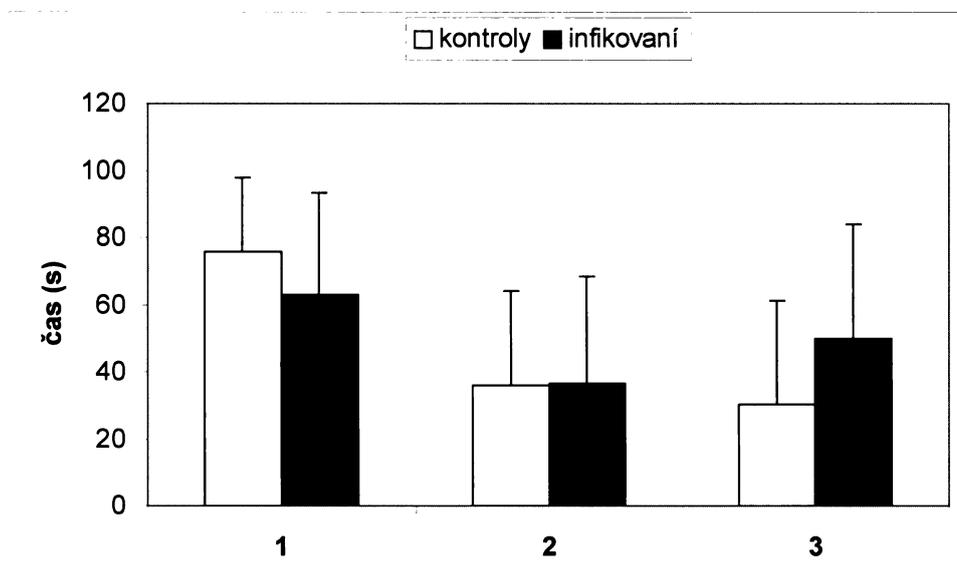
Tab. č. 8: Rozdíly v průměrných časech jednotlivých aktivit sledovaných na kladině šířky 43 mm u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samic F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b. Průměrné hodnoty aktivit jsou vyjádřeny v sekundách, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Hodnoty statistické významnosti (p) byly získány metodou GLM.

Prvky chování	Pokus	Šířka lávky (mm)	Kontrolní (n=30)		Infikovaní (n=31)		F	p
			průměr	SD	průměr	SD		
Otočka	1	43	7,82	2,95	8,88	7,29	0,70	0,405
Přechod	1	43	71,55	24,95	59,52	33,39	2,36	0,121
Celkový čas	1	43	75,64	22,11	63,01	30,42	3,27	0,075
Otočka	2	43	7,41	5,89	6,07	4,76	0,87	0,352
Přechod	2	43	28,05	30,63	32,21	33,95	0,24	0,613
Celkový čas	2	43	36,00	28,06	36,62	31,73	0,01	0,934
Otočka	3	43	5,98	6,18	7,110	7,50	0,41	0,520
Přechod	3	43	26,58	32,64	45,70	36,43	4,92	0,030
Celkový čas	3	43	30,25	31,11	50,00	33,88	6,11	0,016

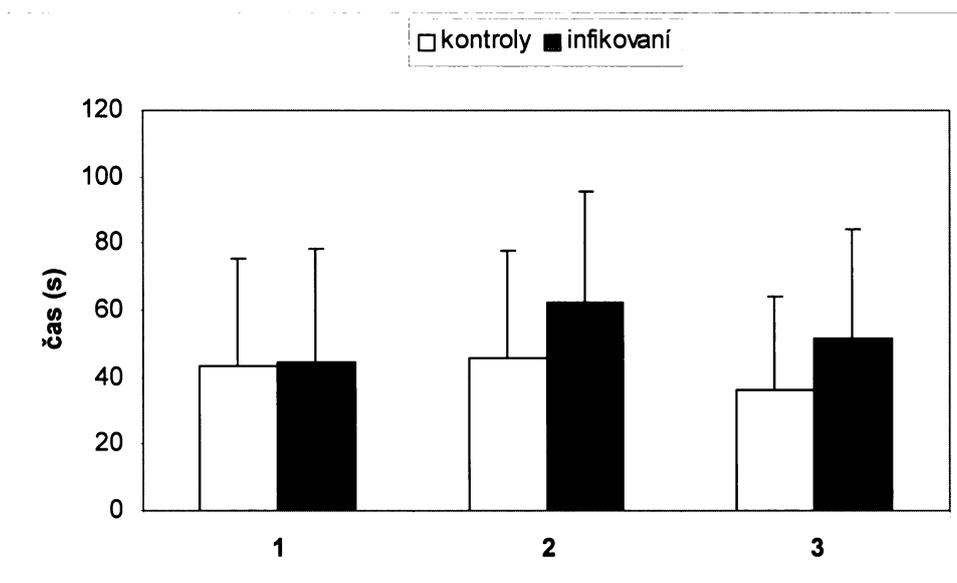
Tab. č. 9: Rozdíly v průměrných časech jednotlivých aktivit sledovaných na kladině šířky 25 mm u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samic F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b. Průměrné hodnoty aktivit jsou vyjádřeny v sekundách, k těmto hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Hodnoty statistické významnosti (p) byly získány metodou GLM.

Prvky chování	Pokus	Šířka lávky (mm)	Kontrolní (n=30)		Infikovaní (n=31)		F	p
			průměr	SD	průměr	SD		
Otočka	4	25	5,15	4,65	7,94	13,07	1,16	0,280
Přechod	4	25	39,82	33,84	39,11	35,40	0,0004	0,980
Celkový čas	4	25	43,3	32,34	44,41	34,18	0,12	0,728
Otočka	5	25	7,72	6,81	6,63	5,63	0,35	0,553
Přechod	5	25	40,76	34,09	60,14	34,37	4,53	0,037
Celkový čas	5	25	45,94	31,61	62,44	32,92	3,72	0,058
Otočka	6	25	5,07	4,92	5,09	3,77	0,0001	0,990
Přechod	6	25	31,99	30,15	49,57	33,83	4,42	0,039
Celkový čas	6	25	36,44	28,05	51,74	32,35	3,69	0,059

Graf č. 13: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v časech přechodu kladiny šířky 43 mm. Osa x znázorňuje číslo pokusu, osa y znázorňuje čas v sekundách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



Graf č. 14: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v časech přechodu kladiny šířky 25 mm. Osa x znázorňuje číslo pokusu, osa y znázorňuje čas v sekundách, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



7.6.6. Holeboard test po aplikaci ritanserinu

Průměrné hodnoty jednotlivých prvků chování sledovaných v Holeboard testu bez aplikace a po aplikaci ritanserinu u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních samic jsou zaznamenány v tabulkách číslo 10 a 11.

Mezi infikovanými a kontrolními samicemi, kterým nebyl aplikován ritanserin, byly zaznamenány signifikantní rozdíly v prvcích *Očichávání*, *Latence očichávání*, *Inaktivita* a *Počet proběhnutých čtverců* (tab. č. 10). Infikované samice začaly signifikantně dříve očichávat otvory ($p=0,008$) a strávily očicháváním signifikantně delší čas než samice kontrolní ($p=0,033$). Infikované samice též strávily signifikantně delší čas inaktivitou ($p=0,048$) a proběhly signifikantně více čtverců než samice kontrolní ($p=0,042$).

Tab. č. 10: Průměrné hodnoty prvků chování sledovaných v holeboard testu u samic F1 křížence kmene C57/b x BALB/c bez aplikace ritanserinu. U prvků *Frekvence zkoumání*, *Panáčky*, *Počet proběhnutých čtverců* a *Počet vstupů do středu* je uveden počet, ostatní prvky vyjadřují délku trvání daného chování v sekundách. Ke všem hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Hodnoty statistické významnosti (p) byly získány metodou GLM analýzou modelu, který zahrnoval závislou proměnnou jednotlivé prvky chování, nezávislou proměnnou veličinu TOXO, jako kovariáta byla zvolena proměnná hmotnost.

Prvky chování	Kontrolní (n=15)		Infikovaní (n=15)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
Očichávání	55,86	9,12	66,65	14,3	5,10	0,033
Latence očichávání	33,89	8,094	20,66	13,37	8,52	0,008
Zkoumání	25,31	19,61	35,63	28,95	0,69	0,412
Latence zkoumání	147,33	47,32	135,92	13,72	0,39	0,531
Frekvence zkoumání	11,00	5,79	12,35	5,35	0,34	0,562
Inaktivita	19,92	8,53	28,03	9,92	4,40	0,048
Běh	400,21	49,26	378,00	21,13	2,52	0,125
Grooming	6,45	5,55	7,32	6,17	0,174	0,671
Latence 1. aktivity	8,52	4,00	7,96	5,41	0,09	0,763
Panáčky	49,08	15,94	52,93	19,24	0,74	0,395
Počet proběhnutých čtverců	185,75	29,68	205,26	18,51	4,63	0,042
Počet vstupů do středu	44,33	15,44	50,00	14,94	4,04	0,317
Čas strávený ve středu	96,31	25,76	93,87	26,71	0,06	0,804

Mezi infikovanými a kontrolními samicemi po aplikaci ritanserinu byl zaznamenán signifikantní rozdíl pouze v prvku *Grooming* (tab. č. 11). Infikované samice po aplikaci ritanserinu strávily signifikantně delší čas groomingem než samice kontrolní po aplikaci ritanserinu ($p=0,035$).

Tab. č. 11: Průměrné hodnoty prvků chování sledovaných v holeboard testu po aplikaci ritanserinu u samic F1 křížence kmene C57/b x BALB/c. U prvků *Frekvence zkoumání*, *Panáčky*, *Čtverce* a *Počet vstupů do středu* je uveden počet, ostatní prvky vyjadřují délku trvání daného chování v sekundách. Ke všem hodnotám jsou uvedeny příslušné směrodatné odchylky (SD). Hodnoty statistické významnosti (p) byly získány metodou GLM analýzou modelu, který zahrnoval závislou proměnnou jednotlivé prvky chování, nezávislou proměnnou veličinu TOXO, jako kovariáta byla zvolena proměnná hmotnost.

Prvky chování	Kontrolní (n=15)		Infikovaní (n=15)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
Očichávání	35,34	20,41	25,63	20,74	1,71	0,201
Latence očichávání	38,81	28,58	46,74	34,69	0,80	0,378
Zkoumání	1,96	1,52	0,84	0,60	2,38	0,132
Latence zkoumání	102,3	89,52	51,27	34,19	1,758	0,191
Frekvence zkoumání	2,00	1,27	0,84	0,70	2,87	0,103
Inaktivita	164,5	116,6	228,58	185,96	1,35	0,241
Běh	365,88	84,36	309,95	153,84	1,62	0,212
Grooming	8,03	6,28	16,4	10,66	4,86	0,035
Latence 1. aktivity	12,83	11,38	16,85	16,31	0,54	0,464
Panáčky	16,06	15,33	15,12	14,23	0,025	0,87
Počet proběhnutých čtverců	128,9	58,21	118,18	76,65	0,20	0,652
Počet vstupů do středu	19,92	10,42	20,28	15,06	0,005	0,944
Čas strávený ve středu	48,48	30,44	36,14	31,46	1,01	0,324

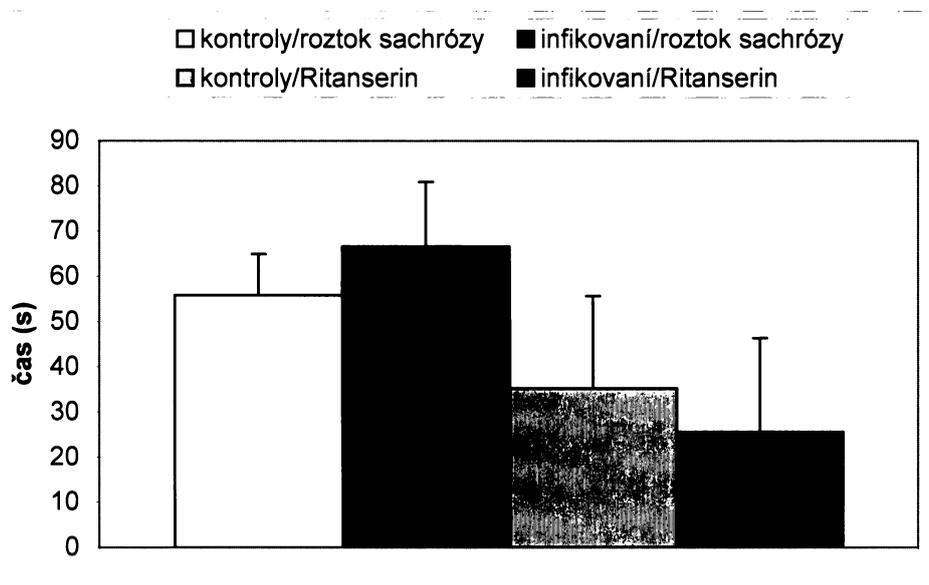
Signifikantní vliv interakce infekce x ritanserin na chování byl zaznamenán pouze u prvku *Očichávání* ($p=0,029$) a prvku *Grooming* ($p=0,033$). V ostatních prvcích chování nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl (tab. č. 12).

Čas strávený groomingem byl u infikovaných myší vlivem ritanserinu statisticky významně zvýšen (Tukeyho post hoc test, $p=0,0007$), u kontrolních myší neměl ritanserin na čas strávený groomingem účinek (Tukeyho post hoc test, $p=0,626$). U infikovaných i kontrolních myší došlo vlivem ritanserinu ke statisticky významnému snížení času stráveného očicháváním ($p=0,0001$ resp. $p=0,0037$) a zkoumáním otvorů ($p=0,001$ resp. $p=0,012$), u těchto zvířat také došlo k statisticky významnému snížení frekvence zkoumání otvorů ($p=0,0001$ resp. $p=0,0003$), snížení počtu panáčků ($p=0,0001$ resp. $p=0,0002$), počtu vstupů do středu ($p=0,001$ resp. $p=0,029$) a počtu proběhnutých čtverců ($p=0,0003$ resp. $p=0,006$) (Tukeyho post hoc test). Naopak vlivem ritanserinu došlo u infikovaných i kontrolních myší k statisticky významnému zvýšení času stráveného inaktivitou ($p=0,0005$ resp. $p=0,006$) (Tukeyho post hoc test).

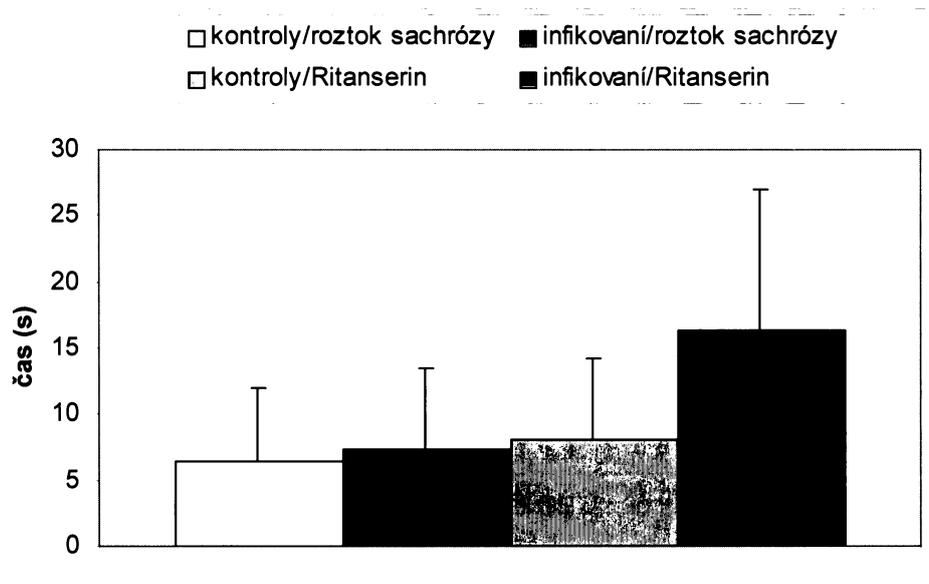
Tab. č. 12: Hodnoty p vyjadřují statistickou významnost interakce infekce x ritanserin na jednotlivé sledované prvky chování v holeboard testu u samic F1 křížence kmene C57/b x BALB/c.

Prvky chování	F	p
Očichávání	5,01	0,029
Latence očichávání	2,19	0,144
Zkoumání	0,01	0,907
Latence zkoumání	0,10	0,740
Frekvence zkoumání	1,25	0,260
Inaktivita	0,76	0,380
Běh	0,24	0,620
Grooming	4,812	0,033
Latence 1. aktivity	0,0001	0,993
Panáčky	0,97	0,320
Počet proběhnutých čtverců	1,13	0,290
Počet vstupů do středu	0,39	0,530
Čas strávený ve středu	0,02	0,880

Graf č. 15: Vliv ritanserinu na očichávání otvorů v holeboard testu u *Toxoplasma*-positivních a kontrolních samic myší F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b. Osa y značí čas v sekundách, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku. Průměrné časy strávené očicháváním otvorů jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulkách č. 10 a 11.



Graf č. 16: Vliv ritanserinu na čas strávený groomingem v holeboard testu u *Toxoplasma*-positivních a kontrolních samic myší F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b. Osa y značí čas v sekundách, chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku. Průměrné časy strávené groomingem jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulkách č. 10 a 11.



7.6.7. Sledování spontánní aktivity v testu s běhacími kolotoči

Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi v uběhnuté vzdálenosti, průměrné rychlosti pohybu a počtu minut strávených pohybem (počet aktivních minut) v běhacím kolotoči v průběhu 48 hodin jsou zaznamenány v tabulce číslo 13.

Toxoplasma-positivní samice uběhly signifikantně delší vzdálenost než samice kontrolní po oba dva testované dny (GLM, $p=0,027$ resp. $p=0,038$). *Toxoplasma*-positivní samice též běžely po oba dva dny signifikantně vyšší rychlostí než samice kontrolní (GLM, $p=0,020$ resp. $p=0,011$). Statisticky významný rozdíl mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi nebyl prokázán v počtu aktivních minut v průběhu testovaných dnů (GLM, $p=0,399$ resp. $p=0,139$).

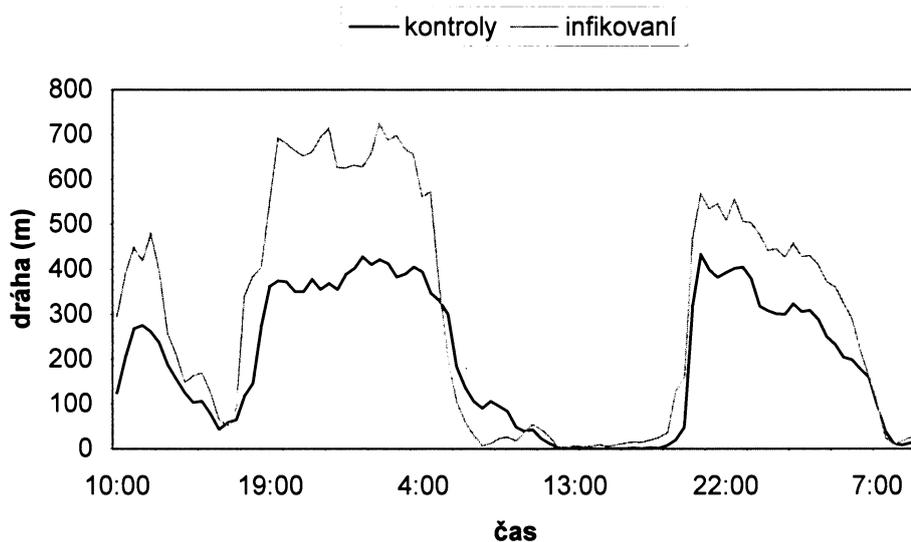
Mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi byl zaznamenán výrazný signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti a rychlosti pohybu v průběhu prvních 30 minut testování (GLM; uběhnutá vzdálenost: $p=0,0028$; rychlost pohybu: $p=0,003$).

Všechny hodnoty p vyjadřují rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi v jednotlivých prvcích chování po odfiltrování proměnné veličiny hmotnosti (GLM). Bez odfiltrování proměnné veličiny hmotnosti nedošlo k výrazným změnám ve výsledcích. Uběhnutá dráha, rychlost pohybu a počet aktivních minut v žádném případě nijak nekoreloval s hmotností.

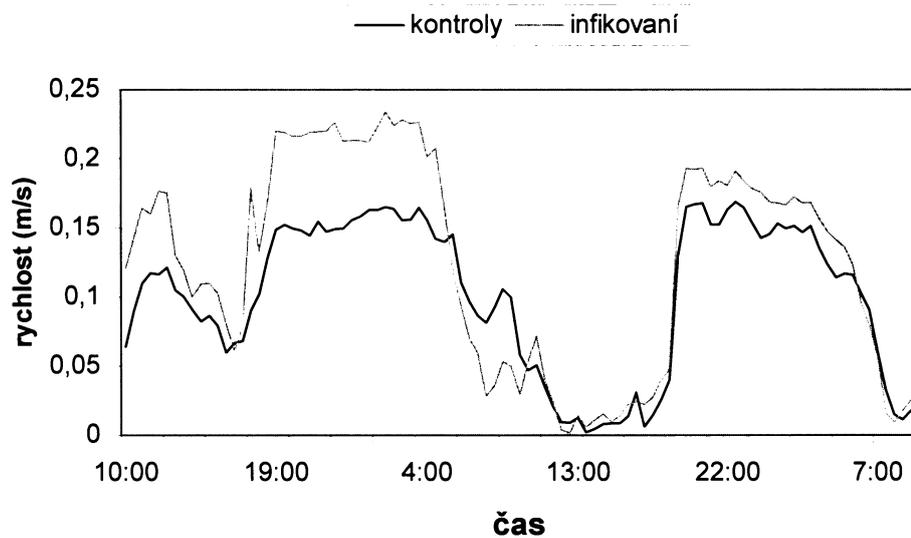
Tab. č. 13: Rozdíly v uběhnuté vzdálenosti, rychlosti a počtu aktivních minut v běhacím kolotoči u *Toxoplasma*-positivních a kontrolních samic F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b. Uběhnuté vzdálenosti jsou vyjádřeny v metrech, průměrné rychlosti pohybu jsou uvedeny v metrech za sekundu. Hodnoty statistické významnosti (p) byly získány metodou GLM.

Sledovaný prvek:	Kontrolní (n=30)		Infikovaní (n=31)		F	p
	průměr	SD	průměr	SD		
dráha 1. den	6198,3	3923,9	8411,1	2849,6	5,20	0,027
dráha 2. den	3030,4	1756,8	4010,2	1493,1	4,51	0,038
dráha za oba dva dny	9228,7	4744,3	12421	3403,9	7,05	0,010
rychlost 1. den	0,130	0,066	0,164	0,039	5,70	0,020
rychlost 2. den	0,096	0,043	0,110	0,028	6,98	0,011
rychlost po oba dva dny	0,116	0,053	0,142	0,030	6,19	0,016
počet aktivních min. 1. den	791,2	326,7	850,7	124,9	0,72	0,399
počet aktivních min. 2. den	525,9	236,2	601,32	84,30	2,25	0,139
počet aktivních min. za oba dva dny	1317,1	470,0	1452,0	143,19	2,20	0,144

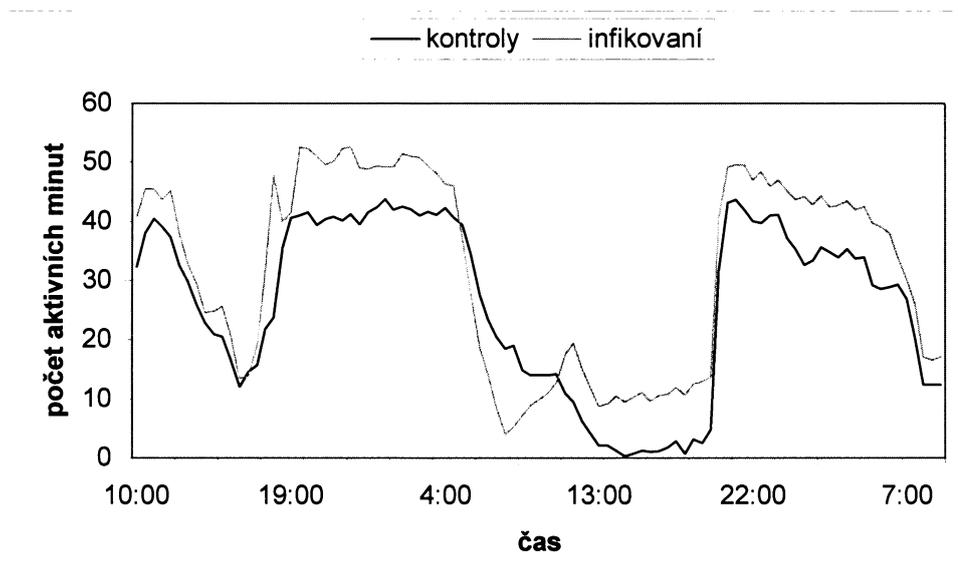
Graf č. 17: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v drahách uběhnutých v průběhu 48 hodin v běhacím kolotoči. Osa x znázorňuje denní čas (v hodinách), osa y značí průměrnou dráhu v metrech. Temná fáze dne od 20:00-08:00 hodin.



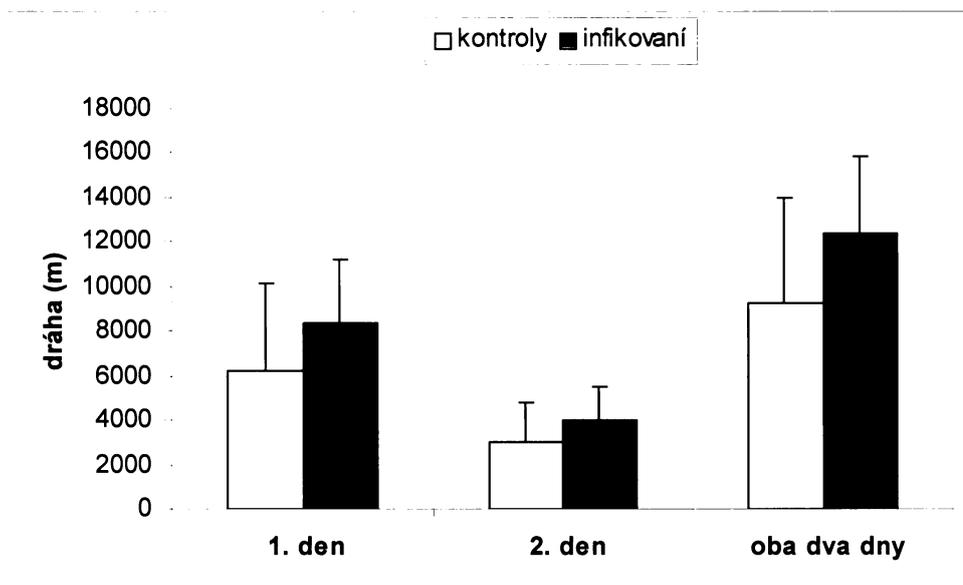
Graf č. 18: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmene BALB/c x C57/b v průměrných rychlostech pohybu v průběhu 48 hodin v běhacím kolotoči. Osa x znázorňuje denní čas (v hodinách), osa y značí průměrnou rychlost v metrech za sekundu. Temná fáze dne od 20:00-08:00 hodin.



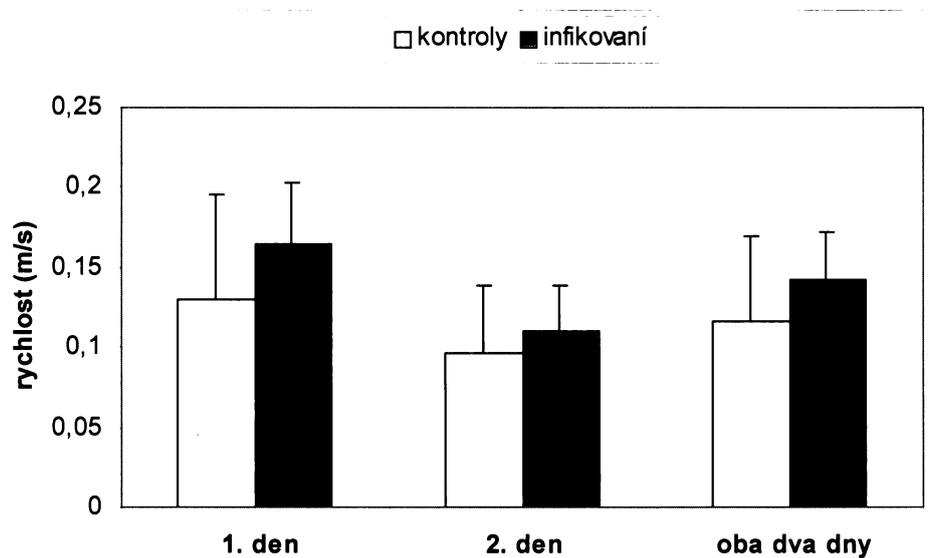
Graf č. 19: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v čase stráveném pohybem v kolotoči (počet aktivních minut) v průběhu 48 hodin. Osa x znázorňuje denní čas (v hodinách), osa y značí průměrný počet aktivních minut v kolotoči. Temná fáze dne od 20:00-08:00 hodin.



Graf č. 20: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-positivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v uběhnuté dráze v běhacím kolotoči. Osa y znázorňuje dráhu v metrech, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



Graf č. 21: Rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi F1 křížence kmenů BALB/c x C57/b v rychlosti pohybu v běhacím kolotoči. Osa y znázorňuje rychlost v metrech za sekundu, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



8. Porovnání počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně myši s latentní toxoplazmózou a myši kontrolních

Fixace mozků experimentálních zvířat a imunohistochemické barvení byly prováděny postupem používaným při detekci dopaminu v nervové tkáni (Ikemoto, 1997; Czyrak a kol., 2000; Baker a kol., 2005).

Detekce počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech mozku myši byla provedena celkem třikrát.

Fixace mozků a následné imunohistochemické barvení byly provedeny nejprve u 14 samic myši F1 křížence BALB/c x C57/b (AnLab) stáří 11 měsíců o hmotnosti 24 - 26 g, které byly testovány v etologických pokusech uvedených v první části diplomové práce. Bylo použito 7 samic s latentní toxoplazmózou (8 měsíců p.i.) a 7 samic kontrolních.

V druhém experimentu bylo použito 12 samic myši F1 křížence BALB/c x B10/A (AnLab) stáří 24 měsíců o hmotnosti 24 - 26 g. Tato experimentální zvířata byla testována v baterii etologických testů odlišných od souborů testů použitých v této práci (Skallová, 2005). Bylo testováno 6 samic s latentní toxoplazmózou (18 měsíců p.i.) a 6 samic kontrolních.

Ve třetím experimentu byly použity 4 samice kmene BALB/c x B10/A (Velaz) stáří 1,5 měsíce o hmotnosti 20 - 21 g. Ve třetím pokusu jsme sledovali pouze vliv stáří myši na histochemický obraz; myši tedy nebyly nakaženy *Toxoplasma gondii*.

Na závěr experimentu bylo provedeno přehledné, histologické barvení každého třetího řezu kresyl violetí. Toto histologické barvení sloužilo k přesné diferenciaci jednotlivých oblastí nervové tkáně.

8.1. Fixace mozku

Fixace všech mozků proběhla vždy ve stejný den (v rámci pokusů 1, 2 a 3). V průběhu pokusu bylo zachováno pořadí infikovaná, kontrolní, infikovaná myš (kromě experimentu č. 3, ve kterém byly použity pouze myši kontrolní).

Každá myš byla hluboce uspána Natkotanem (Zentiva) a intraperitoneálně injekcí v latentní dávce anestezie (5 mg/kg). Po anestezii byla myš upevněna na pitevní misku. Nejprve byla nastřižena tělní dutina, rozstřihnuta žebra a odklopen hrudník tak, aby byl snadný přístup k srdci. Po zpřístupnění srdce byl do levé předsíně nastřižen otvor, aby mohlo

docházet k odtoku přebytečné tekutiny. Do takto připraveného srdce byla zavedena do pravé srdeční komory jehla napojená na přívodní hadičku. Nejdříve byla myš perfundována teplým (37°C) fyziologickým roztokem s heparinem (cca. 60 ml fyziologického roztoku na myš) a poté fixována studenou (4 - 8°C) fixází (cca. 60 ml fixáže na myš).

Za dobře provedenou fixaci mozku jsme považovali situaci, při které došlo k zesvětlení jater a celkovému ztuhnutí těla a vnitřních orgánů. Po perfúzi byla provedena disekce mozku z lebky, který byl dále fixován ve stejném fixačním roztoku 60 - 90 minut. Po provedení postfixace byl mozek vložen nejprve do zkumavky s kryoprotektivním roztokem 20 % sacharózy a následně pak do zkumavky s kryoprotektivním roztokem 30 % sacharózy (každý roztok cca. 1 den). Důkladné prosycení sacharózou se projevilo poklesem mozku na dno zkumavky. Zafixovaný mozek byl prosycen sacharózou, jelikož sacharóza narozdíl od vody netvoří ve tkáni krystaly a tím tkáň nepoškozuje.

8.2. Krájení zafixovaného mozku

V prvním experimentu byl každý zafixovaný mozek nasycený sacharózou zalit do teplé (70°C) želatiny. Takto vytvořený želatinový bloček s tkání byl připraven ke krájení na kryostatu (Leica). Výhodou tohoto postupu bylo, že želatina sloužila jako přichycovací část ke stojánku při krájení na kryostatu.

V druhém a třetím experimentu byl každý zafixovaný mozek nejprve na 5 minut vložen do -70°C a poté byl nechán v -20°C až do doby krájení na kryostatu (Leica). Nevýhodou tohoto postupu byla ztráta koncové části nervové tkáně, která sloužila k přichycení ke stojánku při krájení na kryostatu.

Vlastní krájení řezů bylo prováděno při -23°C až -30°C. Šířka jednotlivých řezů byla 35 µm. Řezy byly systematicky ukládány do šesti-jamkové kultivační destičky s acetátovým pufrem s přísadkou 0,1 % azidu a následně byly uchovávány ve 4°C dokud neproběhlo imunohistochemické barvení. Pro delší uchování řezů byl každý 3. řez přenesen do kryoprotektivní směsi, ve které mohou být zafixované tkáně uchovávány až po dobu 1 roku.

8.3. Imunohistochemické barvení kryožezů

Pro detekci aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší byla použita nepřímá, třístupňová, free-floating ABC imunohistochemická technika dle protokolu „Imunohistochemické barvení protilátkou na dopamín.“ (Slovenská akademie věd, Ivanka při Dunaji). Na imunohistochemické barvení byl vybrán vždy každý 3. řez nervové tkáně.

Postup imunohistochemického barvení byl následující:

1. Nejprve byly vybrané vzorky přeneseny do předem označených lahviček obsahujících 5 ml promývacího pufru. Promývání bylo provedeno 3x po 10 minutách.
2. Po důkladném promytí byly vzorky inkubovány s 1 % H₂O₂. Inkubace trvala 30 minut v peroxidázovém pufru. Do lahviček bylo opět dáváno 5 ml roztoku.
3. Po inkubaci byly vzorky promyty v promývacím pufru (3 x 2 a 2 x 10 minut).
4. Po promytí byly vzorky blokovány v blokovacím pufru. Vždy 1 ml na lahvičku po dobu 30 minut.
5. Po 30 minutách blokování byla přidána primární protilátka anti-dopamine rabbit 1:2500 do protilátkového pufru, vždy 1ml na lahvičku. Takto připravené vzorky byly inkubovány přes noc na třepačce při 4°C.
6. Následující den byly vzorky opět promyty v promývacím pufru (3 x 2 a 2 x 20 minut).
7. Po promytí byla ke vzorkům přidána sekundární protilátka: biotinylovaná IgG mouse anti-rabbit 1:200 (Biotinylated anti-Rabbit IgG, Vector Laboratories). Sekundární protilátka byla přidána do sekundárního protilátkového pufru s přídavkem 1 % NGS. Do lahviček bylo opět dáváno 5 ml roztoku. Vzorky jsme poté nechali na dobu 2 hodin inkubovat.
8. Po dvouhodinové inkubaci se sekundární protilátkou byly vzorky promyty v promývacím pufru (3 x 2 a 2 x 20 minut).
9. Po promytí byl ke vzorkům přidán avidin-biotin komplex: 1 % A a 1 % B (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories) do primárního protilátkového pufru, vždy 5 ml roztoku na lahvičku. Vzorky byly poté inkubovány na dobu 1 hodiny.
10. Po inkubaci byly vzorky promyty v promývacím pufru (3 x 2 a 2 x 20 minut).
11. Po posledním důkladném promytí bylo přistoupeno k samotnému barvení. Na barvení byl použit DAB tetrachlorid (rozpuštěný v H₂O). Roztok DAB byl vytvořen těsně před použitím (2,5 - 3 mg DAB na 5 ml promývacího pufru). Samotná reakce byla spuštěna přidáním 3 % H₂O₂ (15 µl 30 % H₂O₂). Přibližně po 4 - 10 minutách došlo

k vybarvování specifických částí mozku. Po vybarvení byly řezy přeneseny do promývacího pufru, aby došlo k zastavení reakce (2 x 4 minuty). U všech vzorků došlo k zastavení specifické reakce ve stejný čas.

12. Vybarvené a promyté řezy byly přeneseny do velké Petriho misky s promývacím pufrům, poté byly řezy seřazeny podle atlasu (Franklin, 1997) a přesouvány štětcem na podložní skla.
13. Podložní skla byla následně sušena volně na vzduchu přibližně 10 minut. Po vysušení bylo každé podložní sklo ponořeno do kádinky s destilovanou vodou a opět necháno sušit (2x), aby došlo k důkladnému vymytí solí z pufru. Následně byla vysušená podložní skla ponořena do kyvety s xylenem na odmaštění a prosvětlení (cca. 15 sekund). Na odmaštěná a prosvětlená podložní skla s řezy bylo poté nanášeno montovací médium DPX (Fluka) a přiložena skla krycí. Takto připravené preparáty již byly použity k určování počtu dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech mozku u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší.

Kroky 1 - 5 byly prováděny v ledě, kroky 6 - 11 byly prováděny při laboratorní teplotě.

8.4. Histologické barvení kryořezů kresyl violetí

Pro morfologické rozlišení jednotlivých oblastí nervové tkáně byl vždy 3. řez zafixovaného mozku obarven kresyl violetí. Toto barvení kresylovou violetí barví cytoplasmu nervových buněk světle modře a hrudky tigroidní substance a jádérka tmavomodře.

Histologické barvení bylo upraveno na barvení kryořezů. Nejprve byly řezy přesunuty podle atlasu (Franklin, 1997) na podložní skla, která byla potažena želatinou pro lepší přichycení řezů. Takto uspořádané řezy na podložních sklech byla barvena.

Postup histologického barvení kryořezů kresyl violetí byl následující.

1. Podložní skla s řezy byla vložena do destilované vody na dobu 24 hodin.
2. Po důkladném promytí byla podložní skla s řezy dána do 70 % alkoholu na dobu 48 hodin, následně pak do 96 % alkoholu opět na dobu 48 hodin.
3. Podložní skla s řezy byla poté vložena na 30 sekund do destilované vody.
4. Po vyndání z destilované vody byla podložní skla s řezy ponořena do barvy kresyl violetí na dobu 15 minut.
5. Po patnácti minutách byla skla přenesena do roztoku kyseliny octové I. dokud nedošlo k diferenciaci nervové tkáně (cca. 30 sekund).

6. Takto diferenciované řezy byly vloženy do 70 % alkoholu na dobu 5 minut, následně poté do 96 % alkoholu na dobu 5 minut.
7. Vložením řezů do roztoku kyseliny octové II. došlo k druhé diferenciaci nervové tkáně.
8. Diferenciované řezy byly následovně přeneseny do 100 % alkoholu na dobu 5 minut (2x).
9. Po vyjmutí z alkoholu byly řezy ponořeny do xylenu na dobu 5 minut (2x).
10. V posledním kroku bylo na takto obarvené řezy umístěné na podložním sklu přidáno montovací médium DPX (Fluka) a přikryty sklem krycím.

8.5. Použité chemikálie

Fyziologický roztok- 0,9 % NaCl v destilované vodě.

Anesteze- 5 % ketamin (Narkomon) + 2 % xylazin (Rometar) + fyziologický roztok.

Acetátový pufr- 0,1M roztok kyseliny octové + 0,1M roztok octanu sodného.

Fixační tekutina- 5 % glutaraldehyd + 1 % paraformaldehyd v acetátovém pufru, 4,3 pH.

Zalévací želatina- 200 ml destilované vody + 20 g želatiny + 60 g sacharózy + 200 µl azidu.

Želatina na potahování podložních skel- 0,1 g želatiny + 200 ml destilované vody + 0,1 g $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$.

Kryoprotektivní směs- 700 ml destilované vody + 300 g sacharózy + 10 g polyvinylpyrolidónu + 300 ml etylenglykolu.

Roztok kyseliny octové I.- 0,5 l dH_2O + 0,5 ml CH_3COOH

Roztok kyseliny octové II.- 0,5 l 96 % alkoholu + 0,5 ml CH_3COOH

Promývací pufr- 0,05M Tris + 0,9 % NaCl, pH 7,6.

Peroxidázový pufr- 0,05M Tris + 0,9 % NaCl + 1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, pH 7,6.

Blokovací pufr- 0,05M Tris + 0,9 % NaCl (pH 7,6) + 10 % NGS + 0,5 % TritonuX.

Protilátkový pufr- 0,05M Tris + 0,9 % NaCl + 0,5 % TritonuX , pH 7,4.

Jestliže bylo při přípravě pufrů třeba pH snížit, byl přidán roztok HCl. Naopak pokud bylo třeba pH zvýšit byl přidán roztok NaOH.

8.6. Analýza obrazu

Vybrané oblasti řezů nervové tkáně byly snímány pomocí videokamery do programu obrazové analýzy AnalySiS five při zvětšení 20x. Prostřednictvím tohoto programu byl ve vybraných oblastech nervové tkáně zaznamenáván počet aktivních dopaminergních neuronů. Počet aktivních dopaminergních neuronů jednotlivých skupin byl hodnocen vždy ve 3-4 řezech nervové tkáně. Získaný počet aktivních dopaminergních neuronů z jednotlivých měření byl následně přepočten na stejnou plochu nervové tkáně.

8.7. Průběh studie

Jelikož v prvním experimentu neproběhla specifická reakce v posledním kroku imunohistochemického barvení, nemohlo být prováděno další vyhodnocování prostřednictvím analýzy obrazu.

V druhém experimentu specifická reakce v posledním kroku imunohistochemického barvení proběhla. Zabarvené oblasti nervové tkáně byly nejprve identifikovány na základě srovnání řezů barvených kresyl violetí a schémat v atlase (Takyama a Takatsuji, 1998). Při důkladném prohlédnutí všech imunohistochemicky barvených preparátů však bylo zjištěno, že nervová tkáň testovaných zvířat vykazuje degenerativní změny projevující se mimo jiné výrazným poklesem počtu aktivních dopaminergních neuronů. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli hodnotit počet aktivních dopaminergních neuronů pouze v oblastech, kde byla tkáň minimálně poškozena a kde počet aktivních dopaminergních neuronů byl dostatečně vysoký ke spolehlivému hodnocení.

Oblasti ve kterých byl hodnocen počet aktivních dopaminergních neuronů:

1. oblast *substantia nigra, pars compacta*, ve které se vyskytují dopaminergní neurony skupiny A9.
2. oblast *periventricular hypothalamic nucleus*, ve které se vyskytují dopaminergní neurony skupiny A14
3. oblast *media preoptic area*, ve které se vyskytují dopaminergní neurony skupiny A15

Jako možné vysvětlení degenerace nervové tkáně a dopaminergních neuronů připadalo v úvahu vysoké stáří testovaných zvířat v experimentu číslo 2. Abychom ověřili naši domněnku, provedli jsme experiment třetí, ve kterém jsme sledovali pouze vliv stáří myši na množství aktivních dopaminergních neuronů. U kontrolních myši stáří 1,5 měsíce byl hodnocen počet aktivních dopaminergních neuronů ve stejných oblastech nervové tkáně jako

v experimentu číslo 2. Získané výsledky byly následně porovnány s výsledky získanými z předcházejícího experimentu.

8.8. Statistické zpracování dat

Získaná data byla z důvodu malého N vyhodnocována pomocí exaktních testů v programu STATXAT 4.0. Pro testování rozdílů mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi (experiment č. 2) a mezi kontrolními samicemi stáří 24 a 1,5 měsíce (experiment č. 3) byl použit Wilcoxon-Mann-Whitney test (Two-sided p-value). Nezávislou proměnou v experimentu č. 2 byla veličina TOXO, odlišující *Toxoplasma*-pozitivní a kontrolní myši. V experimentu č. 3 byla nezávislou proměnou zvolena veličina STARI, odlišující kontrolní myši stáří 24 měsíce a kontrolní myši stáří 1,5 měsíce.

Rozdíly v počtu aktivních dopaminergních neuronů byly považovány za signifikantní pokud byla dosažena hladina významnosti menší než 5 %. Aby bylo možno posoudit efekt nízkého počtu N jsou ve všech případech uvedeny jak výsledky exaktního testu, tak i výsledky asymptotického testu.

8.9. Výsledky detekce počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně myší s latentní toxoplazmózou a myší kontrolních

8.9.1. Experiment č. 2

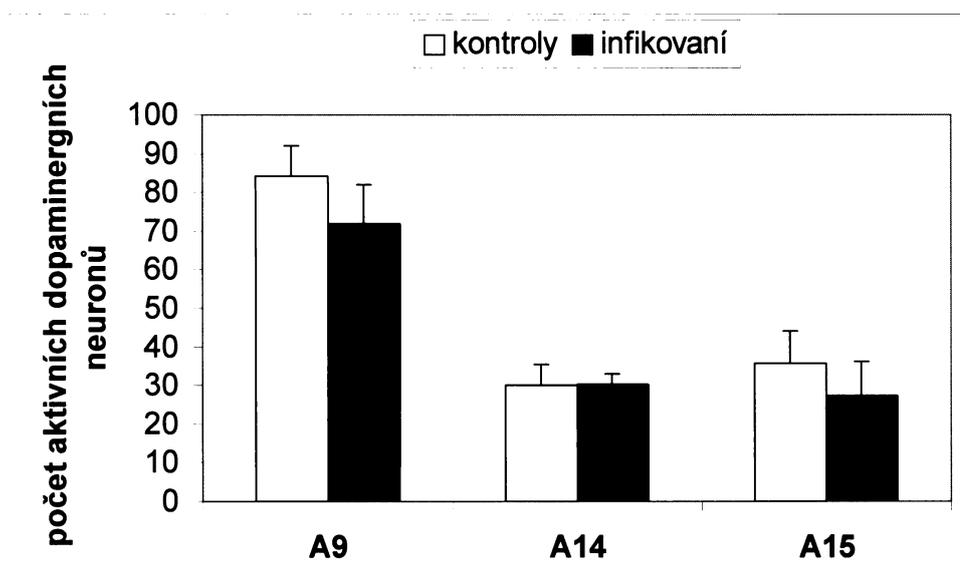
Počet aktivních dopaminergních neuronů ve sledovaných oblastech nervové tkáně u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší je zaznamenán v tabulce číslo 14.

Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl v počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých sledovaných oblastech nervové tkáně.

Tab. č. 14: Rozdíly v počtu aktivních dopaminergních neuronů ve sledovaných oblastech nervové tkáně u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší F1 křížence kmenů BALB/c x B10A stáří 24 měsíce. Průměrné počty neuronů jsou ve všech případech vztaheny ke stejné ploše nervové tkáně. Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Skupina dopaminergních neuronů	Kontroly (n=6)		Infikovaní (n=6)		P (exaktní)	P (asymptotické)
	průměr	SD	průměr	SD		
A9	84,33	7,84	72,00	10,04	0,116	0,099
A14	29,94	5,56	30,40	2,68	0,967	0,920
A15	35,75	8,29	27,30	9,03	0,177	0,144

Graf č. 22: Rozdíly v počtu dopaminergních neuronů ve sledovaných oblastech nervové tkáně u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myší F1 křížence kmenů BALB/c x B10A stáří 24 měsíce. Osa x znázorňuje skupinu dopaminergních neuronů, osa y znázorňuje průměrný počet aktivních neuronů v dané sledované oblasti, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



7.6.2. Experiment č.3

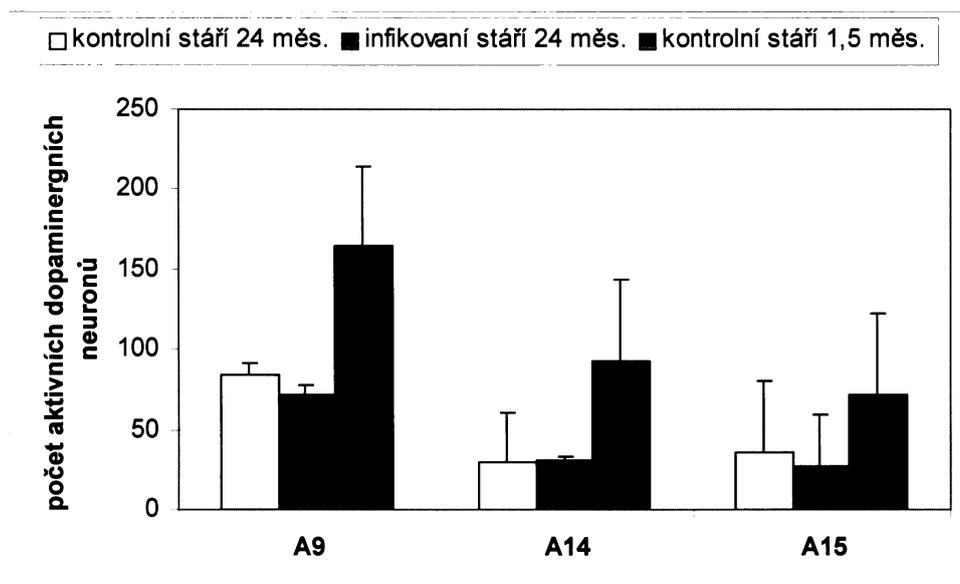
Průměrný počet aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně u 1,5 měsíce a 24 měsíce starých kontrolních samic myší je zaznamenán v tabulce číslo 15.

Mezi kontrolními samicemi stáří 1,5 měsíce a kontrolními samicemi stáří 24 měsíce byl ve všech případech pozorován signifikantní rozdíl v počtu aktivních dopaminergních neuronů ve sledovaných oblastech nervové tkáně. U kontrolních myší stáří 1,5 měsíce byl pozorován vždy signifikantně vyšší počet aktivních dopaminergních neuronů než u kontrolních myší stáří 24 měsíce.

Tab. č. 15: Rozdíly v počtu aktivních dopaminergních neuronů ve sledovaných oblastech nervové tkáně u kontrolních myši odlišného stáří (1,5 měsíce x 24 měsíce) F1 křížence kmenů BALB/c x B10A. Průměrné počty neuronů jsou ve všech případech vztaženy ke stejné ploše nervové tkáně. Wilcoxon-Mann-Whitney test.

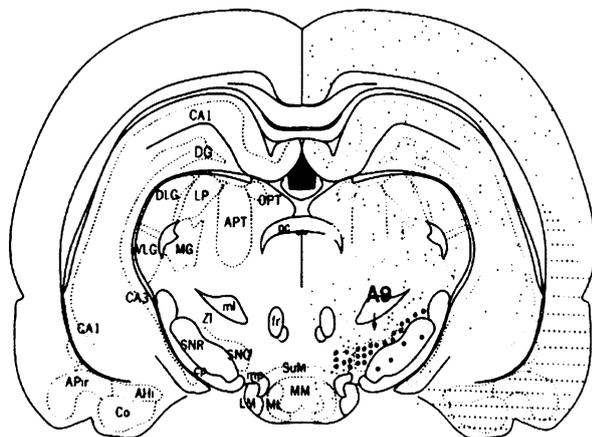
Skupina dopaminergních neuronů	Kontroly (n=6) stáří 24 měsíců		Kontroly (n=4) stáří 1,5 měsíce		p (exaktní)	p (asymptotické)
	průměr	SD	průměr	SD		
A9	84,33	7,84	164,06	44,92	0,009	0,0103
A14	29,94	5,56	93,41	32,25	0,009	0,0105
A15	35,75	8,29	72,00	5,78	0,009	0,0105

Graf č. 23: Rozdíly v počtu dopaminergních neuronů ve sledovaných oblastech nervové tkáně u *Toxoplasma*-pozitivních a kontrolních myši stáří 24 měsíce a kontrolních myši stáří 1,5 měsíce F1 křížence kmenů BALB/c x B10A. Osa x znázorňuje skupinu dopaminergních neuronů, osa y znázorňuje průměrný počet aktivních neuronů v dané sledované oblasti, chybové úsečky značí směrodatnou odchylku.



Příloha:

Obr. č. 1: Zobrazení dopaminergních neuronů skupiny A9 v oblasti *substanci nigra* v nervové tkáni (Takyama a Takatsuji, 1998).

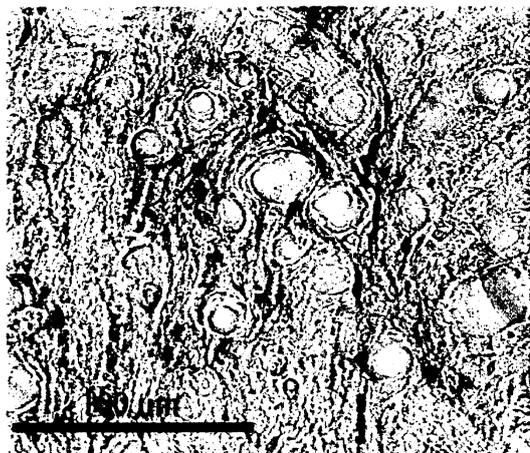


Obr. č. 2: Aktivní dopaminergní neurony skupiny A9 v oblasti *substanci nigra* v nervové tkáni myši F1 křížence kmenů BALC/c x B10A stáří 1,5 měsíce (a) a stáří 24 měsíce (b). Foceno při zvětšení 10x.

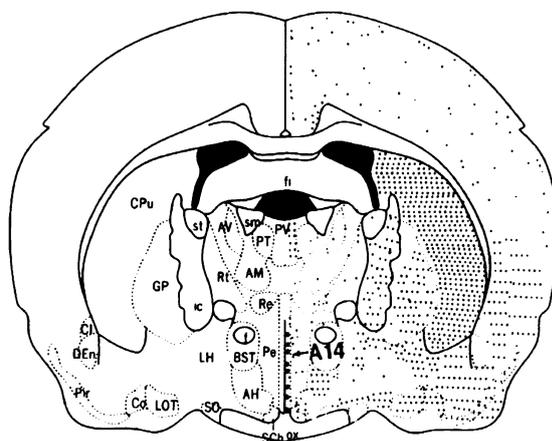
a)



b)

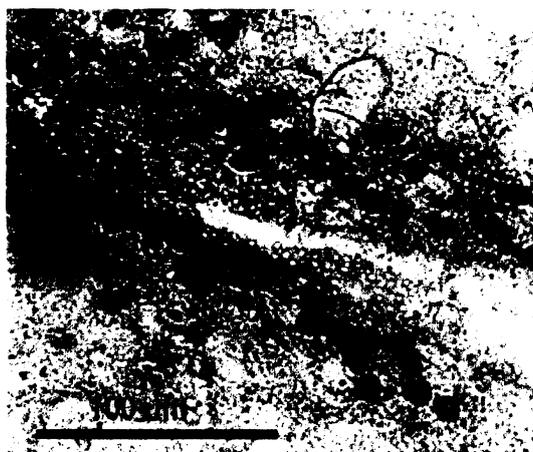


Obr. č. 3: Zobrazení dopaminergních buněk skupiny A14 v oblasti *periventricular hypothalamic nucleus* v nervové tkáni (Takyama a Takatsuji, 1998).

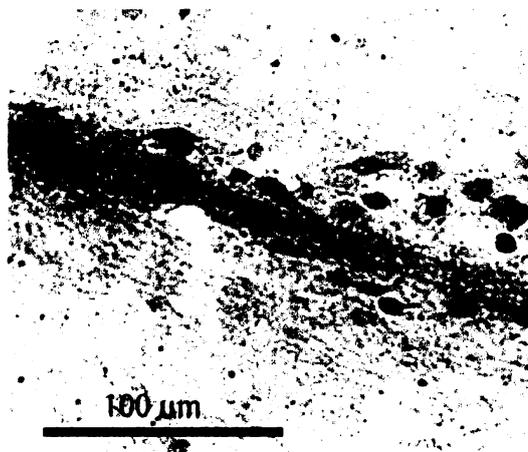


Obr. č. 4: Aktivní dopaminergní neurony skupiny A14 v oblasti *periventricular hypothalamic nucleus* v nervové tkáni myši F1 křížence kmenů BALC/c x B10A stáří 1,5 měsíce (a) a stáří 24 měsíce (b). Foceno při většení 10x.

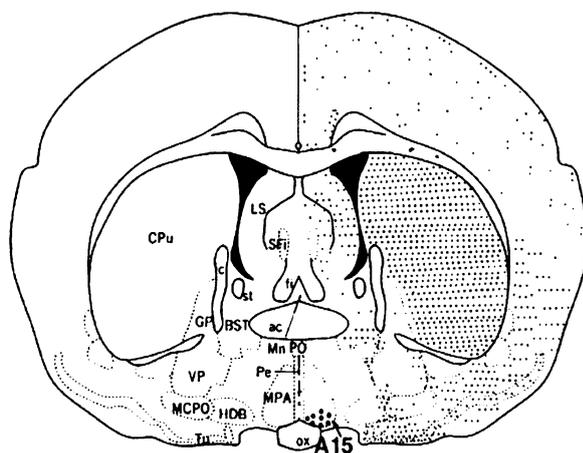
a)



b)

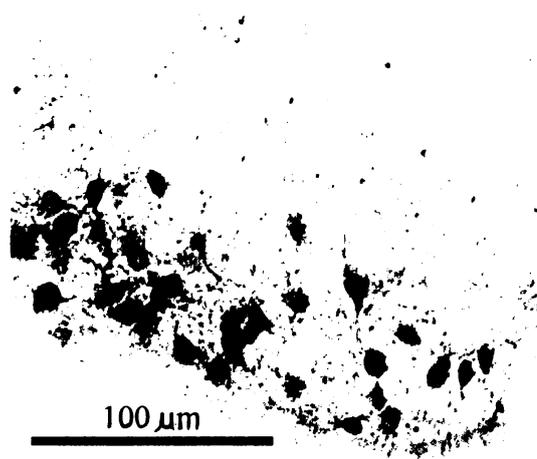


Obr. č. 5: Zobrazení dopaminergních buněk skupiny A15 v oblasti *media preoptic area* v nervové tkáni (Takyama a Takatsuji, 1998).

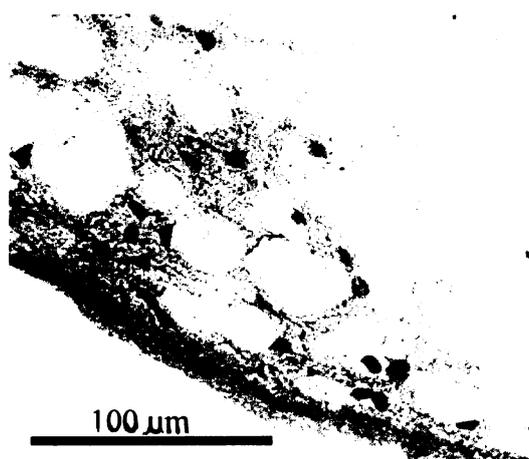


Obr. č. 6: Aktivní dopaminergní neurony skupiny A15 v oblasti *media preoptic area* v nervové tkáni myši F1 křížence kmenů BALC/c x B10A stáří 1,5 měsíce (a) a stáří 24 měsíce (b). Foceno při většení 10x.

a)



b)



9. DISKUSE

9.1. Průběh infekce *Toxoplasma gondii* u myší

Průběh infekce *Toxoplasma gondii* závisí nejen na virulenci kmene tohoto intracelulárního parazita, ale také na velikosti infekční dávky, na způsobu infikování a na druhu a kmeni hostitele, kterého parazit napadá.

Vzhledem k tomu, že naším úkolem bylo sledování změn v chování myší s latentní toxoplazmózou (10 týdnů p.i.), bylo důležité minimalizovat patologické působení parazita. Z tohoto důvodu byly testované myši infikovány avirulentním cystogenním kmenem HIF *Toxoplasma gondii*. Tento avirulentní kmen narozdíl od kmenů virulentních, které usmrcují infikované myši do 10 dnů po inokulaci, tvoří v tkáních infikovaného hostitele tkáňové cysty (Kodym a kol., 2002).

Většina doposud publikovaných výsledků byla získána na myších infikovaných intraperitoneálně, tedy nepřírozenou cestou nákazy. Navíc byly v těchto studiích použity vysoké infekční dávky. Například Hutchison a kol. (1980a, c) používali k infekci 20 tkáňových cyst, Witting a kol (1979) dokonce 30 tkáňových cyst. Myši nakažené intraperitoneálně vysokým počtem tkáňových cyst mohou vykazovat jiné projevy chování než myši infikované perorálně nízkým počtem tkáňových cyst. Jelikož jsme se v našich experimentech chtěli co nejvíce přiblížit přirozeným podmínkám, zvolili jsme perorální inokulaci deseti tkáňovými cystami.

Průběh experimentální infekce závisí na kmeni myší, který je infikován. Araujo a kol. (1976) pozoroval rozdílnou vnímavost inbredních myší k infekci *Toxoplasma gondii*. Například myši kmene DAB/1 jsou k infekci poměrně rezistentní, zatímco myši kmene BALB/c jsou velmi vnímavé. Větší vnímavost inbredních kmenů myší k infekci v porovnání s F1 kříženci dvou inbredních kmenů pozorovala Zitková (1996). F1 kříženci jsou k infekci ve srovnání s inbredními kmeny relativně rezistentní, neboť netrpí projevy inbreedingové deprese, nebo-li zhoršením zdatnosti v důsledku kumulace recesivních mutací v homozygotním stavu (Flegr, 2005). Z tohoto důvodu jsme v baterii etologických testů použili F1 křížence kmenů myší BALB/c (♀) a C57/b (♂).

Průběh infekce *Toxoplasma gondii* kmene HIF byl rychlejší u F1 generace kříženců kmenů myší BALB/c a C57/b než u samic inbredního kmene CBA/J infikovaných stejným kmenem parazita (Kodym a kol., 2002). To by mohlo souviset s přítomností genů pocházejících od velmi vnímavého kmene BALB/c. Rychlejší pokles váhy u F1 generace

kříženců by však také mohl odrážet nikoli vyšší vnímavost F1 kříženců, ale vyšší intenzitu jejich imunitních procesů. Statisticky významný váhový úbytek byl zaznamenán u samic mezi 11.-14. dnem p. i., u samců byl maximální pokles váhy zaznamenán 14.-15. den p.i.. U samců byl průběh infekce pomalejší než u samic, což bylo pravděpodobně způsobeno vyšší průměrnou hmotností samců. V mozcích infikovaných myší bylo 17 týdnů p.i. nalezeno 40 - 280 tkáňových cyst (n = 15, \bar{X} = 94 cyst/mozek). Průměrný počet tkáňových cyst v mozcích infikovaných myší F1 křížence BALB/c a C57/b byl o polovinu nižší než průměrný počet tkáňových cyst pozorovaný při stejné naze inbredního kmene myší CBA/J (\bar{X} = 225 cyst/mozek) (Kodym a kol., 2002). Opět se tedy potvrdilo, že F1 kříženci jsou ve srovnání s inbredními kmeny myší k infekci *Toxoplasma gondii* relativně rezistentní.

9.2. Vliv latentní toxoplazmózy na chování F1 kříženců myší kmenů

BALB/c a C57/b

První část této práce byla zaměřena na ty změny v chování *Toxoplasma*-pozitivních myší, které by mohly přispět k snadnějšímu přenosu parazita do definitivního hostitele. Jelikož jsme se ve druhé části této práce soustředili na ověření jedné z hypotéz mechanismu působení *Toxoplasma gondii* na svého meziphostitele, která předpokládá, že v mozku *Toxoplasma*-pozitivních myší dochází ke změnám dopaminergní aktivity, byla z tohoto důvodu část etologických testů zaměřena také na prvky chování, které mohou být dopaminergní aktivitou ovlivněny: paměť a učení (osmiramenné radiální bludiště, přechod kladin), aktivita v novém a domácím prostředí (kolotoče), horizontální lokomoce v neznámém prostředí, zvědavost nezávislá na lokomoci (holeboard).

9.2.1. Testy pachových preferencí

Z výsledků testů pachových preferencí je patrné, že samci i samice rozlišují pach infikované myši od pachu myši neinfikované. Na základě čeho myši tento pach infikovaného jedince rozeznávají není přesně známo.

V několika studiích bylo prokázáno, že pach může mimo jiné odrážet i zdravotní stav jedince (Kavaliars a Colwell, 1993; Kavaliars a Colwell, 1995a). Zvířata mohou rozpoznávat infekcí pozměněný repertoár peptidů, které jsou uvolňovány z komplexů MHC antigenů do moče (Ehman a Scott, 2002). Jinými rozpoznávanými látkami mohou být opioidy produkované jedincem v průběhu infekce (zejména v akutní fázi), která pro zvíře představuje určitou formu stresu (Kavaliars a Colwell, 1993). Jelikož jsme v našich experimentech

nepozorovali, že by se testovaná zvířata pachu infikovaných jedinců vyhýbala (vyjma experimentu č. 1, ve kterém infikované samice preferovaly pach samic kontrolních), tento způsob identifikace infikovaných jedinců se nám nezdá příliš pravděpodobný.

Zvířata mohou v pachu druhého jedince rozpoznávat také přítomnost feromonů, látek určených k pachové komunikaci mezi příslušníky stejného druhu. Množství vylučovaných feromonů závisí na hladině androgenů v krvi jedince. Více feromonů vylučují ti samci, kteří mají hladinu androgenů v krvi zvýšenou (Achiraman a Archunan, 2005). Jak bylo již v této práci zmíněno, vyšší hladina testosteronu (jeden z androgenů) koreluje se zvýšenou dominancí a agresivitou jedince (Barnard, 1994). Samice při výběru sexuálního partnera všeobecně preferují samce s vyšší hladinou testosteronu tedy samce dominantnější (Mossman a Dickerman, 1996).

U *Toxoplasma*-pozitivních samců myši kmene STR byla pozorována zvýšená agresivita vůči druhému samci. U těchto infikovaných samců se též zvýšilo teritoriální chování a výrazně se rozvinula dominance (Arnott a kol., 1990). Je tedy pravděpodobné, že pokud by *Toxoplasma gondii* u svých mezipřenositelů skutečně zvyšovala míru dominance a sociálního postavení, budou infikovaní samci samicemi preferováni. Tuto hypotézu podporují i výsledky našeho experimentu, ve kterém samice opravdu strávily více času v boxu s pachem infikovaného samce (experiment č. 3, $p=0,008$).

Jelikož však není infekce *Toxoplasma gondii* kontaktem přenosné onemocnění, není zcela jasné, jaký prospěch by mohla přinést taková změna chování (zvýšená dominance v důsledku vyšší hladiny testosteronu) mezipřenositele parazitovi. Z evolučního hlediska by pro parazita bylo pravděpodobně výhodnější spíše sociální postavení mezipřenositelů ve skupině snižovat, neboť právě sociálně níže postavení jedinci jsou vystaveny vyššímu riziku predace (Berday, 1994). Je však možné, že zvýšená hladina testosteronu by mohla ovlivnit (snižit) intenzitu imunitních reakcí hostitele a tím tedy zvýšit množství bradyzoitů v těle hostitele.

Důležitou roli v pachových preferencích samic samozřejmě hraje i fáze estrálního cyklu. Dominantní a sociálně výše postavené samce preferují samice především v období estru, tedy v době, kdy mohou být tímto samcem oplodněny (Mossman a Dickamer, 1996).

Z tohoto důvodu jsme u testovaných samic v experimentu č. 4 zaznamenávali fázi estrálního cyklu. Infikované samce preferovaly pouze ty samice, které byly v době testování v období mimo estrus (experiment č. 4, $p=0,0008$). Oproti původnímu předpokladu se ukázalo, že infikovaní samci jsou pro samice atraktivnější než samci kontrolní pouze v období, kdy nemůže dojít k oplodnění. Pro tento výsledek v současnosti nemáme žádné vysvětlení.

V ostatních experimentech (č. 1 a 2) byly sledovány pachové preference k jedincům stejného pohlaví, tedy preference „sociální“. V přírodě samice preferují kontakt se samicemi, které mají podobné MHC antigeny (Penn, 1999). Kooperace (stavění hnízda, hledání potravy atd.) mezi nimi poté zvyšuje jejich reprodukční úspěšnost v přírodě (König, 1993). Na druhé straně samci v přirozených podmínkách preferují samce, kteří mají nižší sociální postavení (samce méně dominantní a méně agresivní) a nemohou je tak nijak ohrozit (Penn, 1999).

V experimentu č. 1 infikované samice výrazně preferovaly pach samice kontrolní ($p=0,009$). Preference infikovaných samic k pachu samice kontrolní mohla být důsledkem zvýšené zvědavosti. Zvýšená zvědavost u infikovaných samic byla zaznamenána v holeboard testu popsaném v této práci. Infikované samice byly v holeboard testu hodnoceny jako zvědavější také Skallovou (2005). V tomto případě se tedy pravděpodobně jedná spíše o preferenci nového (nikoli zdravého).

Samci naopak preferovali především pach samce infikovaného ($p=0,023$). Je možné, že samci rozpoznávají, že infikovaná zvířata jsou v horším zdravotním stavu (bez ohledu na pravděpodobně zvýšenou hladinu testosteronu) a zdánlivá preference infikovaných samců je ve skutečnosti projevem vyhýbání se zdravým samcům. Jelikož jsme však u testovaných samců hladinu testosteronu ani vzájemné interakce nezaznamenávali, je interpretace výsledku tohoto i ostatních testů velmi obtížná.

Zda vlivem *Toxoplasma gondii* skutečně dochází ke změně vylučovaných feromonů, které jsou zodpovědné za následné pachové preference myši pozorované v našich experimentech je potřeba objasnit biochemickými testy.

9.2.2. Reakce na změnu potravy

V tomto experimentu jsme mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi zaznamenali rozdíly v denní spotřebě krmiva, tedy patrně v energetických nárocích testovaných zvířat. Infikované samice po všechny dny pokusu spotřebovaly více krmiva než samice neinfikované. V prvním a čtvrtém měření byl tento rozdíl statisticky signifikantní ($p=0,039$ resp. $p=0,042$).

Původní pokles hmotnosti zaznamenaný mezi 11.-14. dnem p.i. u *Toxoplasma*-pozitivních samic byl v době začátku testu již kompenzován, průměrná hmotnost infikovaných a kontrolních myší se tedy nelišila. Zvýšená spotřeba krmiva u *Toxoplasma*-pozitivních samic byla tedy patrně způsobena zvýšením energetických nároků hostitele vlivem parazitace, případně posuny v mechanismech regulace příjmu potravy (pocit nasycení

atd.). Endoparazité jsou na svých hostitelích zcela metabolicky závislí, proto i energie získaná hostitelem z potravy z části připadá právě jim (Barber, 2005). Energeticky nákladný je současně také stále aktivovaný imunitní systém infikovaných mezihostitelů (Sheldon a Verhulst, 1996). Není vyloučena ani možnost, že zvýšený příjem potravy u infikovaných myší je projevem manipulační aktivity *Toxoplasma gondii*.

Již v několika studiích bylo pozorováno, že infikovaní hostitelé mají vlivem některých parazitů zvýšené energetické nároky. Tyto jedinci musí poté v rámci svých energetických nároků v přírodě strávit i více času hledáním potravy, což může představovat vyšší riziko ulovení predátorem (Milinski, 1985; Godin a Sproul, 1988).

Po záměně potravy poklesla spotřeba krmiva u infikovaných i kontrolních myší. Jelikož jsou myši považovány za zvířata neofilní, pozorovaný pokles spotřeby nového krmiva byl pravděpodobně způsoben tím, že nová potrava pro myši nebyla příliš chutná. Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v reakci na neznámou potravu ($p=0,15$).

K odlišným výsledkům došla Websterová a kol. (1994b), která pozorovala u *Toxoplasma*-pozitivních divokých potkanů (*Rattus norvegicus*) sníženou averzi k neznámé potravě oproti potkanům neinfikovaným. Neofobie však byla v této studii vyjádřena jako „index neofobie“ zahrnující reakci jak na novou potravu tak i reakci na nový pach a na novou misku. Je tedy pravděpodobné, že případnou změnu v neofobii nezachytí pouze reakce zvířete na jediný nový podnět (v našem případě pouze změna potravy), ale reakce zvířete na více nových podnětů, které spolu úzce souvisí. Narozdíl od myší, které jsou v porovnání s jinými druhy savců extrémně neofilní, jsou potkani považováni ve vztahu k potravě za neofobní.

K obdobným výsledkům jako Websterová došli i Hutchison a kol (1980b) a Hay a kol. (1984). V těchto studiích byla u *Toxoplasma*-pozitivních myší pozorována snížená reakce na nové, neznámé rameno v Y-bludišti. Autoři těchto studií však předpokládají, že snížená reakce na nový podnět u infikovaných jedinců je v tomto případě způsobena sníženou schopností zvířete zapamatovat si podněty (snížená pracovní paměť), s kterými se již setkala v minulosti (staré rameno v Y-bludišti).

9.2.3. Sledování prostorové paměti a schopnosti učení v osmiramenném radiálním bludišti

Toxoplasma-pozitivní samice našly ve druhém a třetím běhu druhý prověřovací den cílové rameno s odměnou za signifikantně delší dobu než samice kontrolní. Samice v těchto bězích též signifikantně vícekrát vstoupily do nesprávných ramen (více chybovaly) než samice kontrolní.

Schopnost učit se, v našem případě co nejrychleji si zapamatovat nejjednodušší cestu k odměně, závisí na schopnosti zvířete orientovat se v prostoru, tedy na prostorové paměti. Tyto dvě složky chování jsou spolu úzce spjaty a nelze je tedy od sebe přesně oddělit (Kukleta a Šulcová, 2003).

Schopnost prostorové paměti zvířete se pravděpodobně nejvíce projeví po určité časové pauze mezi testy. Z tohoto důvodu jsme zvolili k vyjádření této schopnosti rozdíl mezi třetím během v prvním tréninkovém dni a prvním během druhého prověřovacího dne (po 24 hodinách). Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi v tomto případě nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v čase ani počtu provedených chyb při hledání odměny ($p=0,64$ resp. $p=0,45$).

Schopnost učit se jsme poté vyjádřili jako pokles času a počtu provedených chyb při hledání cílového ramene v průběhu jednotlivých běhů. U infikovaných samic byl pozorován signifikantně menší pokles počtu provedených chyb oproti samicím kontrolním ($p=0,028$). Infikované samice se tedy pravděpodobně učily pomaleji, neboť k poklesu času a počtu provedených chyb při hledání cílového ramene s odměnou došlo u těchto samic narozdíl od samic kontrolních až v posledním běhu druhý prověřovací den (7 běh).

Významnou roli v učení hraje míra motivace testovaných zvířat dokončit požadovanou úlohu. Je tedy možné, že pozorované rozdíly mezi kontrolními a infikovanými samicemi mohly být zčásti způsobeny také sníženou motivací infikovaných myší hledat cílové rameno s odměnou. Jelikož však bylo u infikovaných myší zaznamenáno zlepšení v posledním běhu testování, případný rozdíl mezi kontrolními a infikovanými samicemi v jejich motivaci dokončit požadovanou úlohu nebyl pravděpodobně příliš výrazný.

V experimentu jsme nezaznamenali žádný vliv fáze estrálního cyklu na schopnost prostorového učení.

Zhoršená prostorová paměť a učení je mimo jiné spojována se sníženou dopaminergní aktivitou v meso-kortikální dráze, především v hipokampu a prefrontálním kortexu. Motivace

je též asociována s dopaminergní aktivitou v meso-kortikální projekci (Gasbarri a kol., 1996; Viggiano a kol., 2003b).

Sníženou schopnost učení a zhoršenou prostorovou paměť u *Toxoplasma*-pozitivních myší pozoroval Piekarski a kol. (1978) a Witting (1979). V obou z uvedených studií byla testována zvířata 14.-55. dní p.i. Výsledky těchto studií prokázaly, že stupeň zhoršení schopnosti učení a prostorové paměti se s dobou od infekce snižuje.

Z našich výsledků je patrné, že určité snížení schopnosti prostorového učení u infikovaných myší přetrvává i 12 týdnů (84 dnů) p.i.. Ačkoli toto zhoršení již není tak výrazné jako v časných fázích infekce (Piekarski a kol., 1978; Witting, 1979), může i přesto zvyšovat pravděpodobnost ulovení infikovaného mezihostitele predátorem.

9.2.4. Přejít kladin

Signifikantní rozdíly mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi byly pozorovány ve třetím testu na kladině o šířce 43 mm a v druhém a třetím na kladině o šířce 25 mm. V uvedených případech trvalo *Toxoplasma*-pozitivním samicím oproti samicím kontrolním delší čas než kladinu zdolaly.

Jelikož jsme v jednotlivých měřeních nezaznamenali mezi infikovanými a kontrolními samicemi rozdíly v defekaci, která je považována za odraz anxiety u hlodavců (Contet a kol., 2001), lze předpokládat, že rozdíly v čase přechodu kladin byly pravděpodobně způsobeny zhoršenými motorickými a koordinačními schopnostmi infikovaných samic. Tuto naši domněnku podporuje i častější záznam signifikantních rozdílů mezi infikovanými a kontrolními samicemi při přechodu užší kladiny, neboť ve fyzicky obtížnějších úlohách jsou motorické a koordinační rozdíly vždy zaznamenány s vyšší pravděpodobností.

Zhoršenou motoriku a koordinaci u myší s latentní toxoplazmózou pozoroval i Hutchison a kol. (1980c). V jeho studii infikované myši v porovnání s kontrolami signifikantně častěji padaly z rotujícího válce. Ke stejným výsledkům došel i Hay a kol. (1983b) u kongenitálně infikovaných myší.

Při opakovaném testování však u infikovaných samic současně docházelo k méně výraznému poklesu v čase potřebném k přechodu kladin než u samic kontrolních ($p=0,020$). Nižší pokles času v průběhu testování byl tedy způsoben nejen zhoršením motoriky a koordinace u infikovaných samic, ale pravděpodobně i sníženou schopností naučit se co nejrychleji uniknout ze stresujícího prostředí (reprezentovaném v tomto experimentu kladinou). Schopnost učit se je v tomto případě představována zdokonalováním či zrychlením

pohybů. Tato forma učení je samozřejmě ovlivněna motorickými a koordinačními schopnostmi zvířete.

Z výsledků tedy vyplývá, že infikované samice mají patrně jak zhoršené koordinační a motorické schopnosti, tak i zhoršenou schopnost učit se. Všechny tyto pozorované změny v chování opět mohou přispět k tomu, aby se stal infikovaný mezipřenositel snadnější kořistí predátora.

9.2.5. Holeboard test po aplikaci ritanserinu

Polovině testovaným myším byl v tomto experimentu aplikován ritanserin. Ritanserin je všeobecně známý jako selektivní antagonist 5HT_{2A}/HT_{2C} receptorů. Podání ritanserinu v kombinaci s haloperidolem vede k celkové úpravě lokomoce a exploračního chování potkana s modelovou psychózou (Páleníček, 2003). Ritanserin způsobuje blokádu 5HT₂ receptorů, která vyvolává zvýšení uvolňování dopaminu v meso-kortikální dráze (Svensson a kol., 1997; Fišar a Jiráček, 2001; Horáček, 2004). Mikrodializační technikou bylo opravdu zjištěno, že podání ritanserinu zvyšuje hladinu dopaminu v prefrontálním kortexu potkana (Pehek, 1996).

U infikovaných i kontrolních samic, kterým byl aplikován ritanserin v dávce 2 mg/kg došlo k výraznému zvýšení času stráveného inaktivitou, snížení času stráveného očicháváním a zkoumáním otvorů, snížení počtu panáček a počtu proběhnutých čtverců. Z těchto výsledků vyplývá, že aplikace ritanserinu způsobila u kontrolních i infikovaných myší celkovou hypoaktivitu, která byla pravděpodobně způsobena aplikací příliš vysoké dávky ritanserinu. Aplikace vysoké dávky ritanserinu patrně vyvolala výrazné zvýšení hladiny dopaminu v prefrontálním kortexu, která mohla následně inhibovat dopaminergní aktivitu v ostatních oblastech nervové tkáně a způsobit tak hypoaktivitu zvířat (Bubeníková, osobní sdělení).

I přes výraznou hypoaktivitu byly zaznamenány signifikantní rozdíly v působení ritanserinu na infikované a kontrolní samice u prvku *Očichávání* ($p=0,029$) a prvku *Grooming* ($p=0,033$). Po aplikaci ritanserinu došlo u infikovaných samic k signifikantně většímu snížení času stráveného očicháváním otvorů než u samic kontrolních. Naopak čas strávený groomingem byl po aplikaci ritanserinu u infikovaných samic signifikantně zvýšen, u kontrolních samic *Grooming* statisticky významně ovlivněn nebyl. Tyto výsledky tedy naznačují, že infikované myši na podaný lék reagovaly odlišně od myší kontrolních.

Zvýšení času stráveného groomingem po aplikaci ritanserinu u *Toxoplasma*-pozitivních myší může ukazovat na zvýšenou senzitivitu dopaminergních D1 receptorů (Bubeníková, osobní sdělení).

Statisticky rozdílný vliv ritanserinu na kontrolní a infikované myši byl zaznamenán též u prvku *Očichávání* otvorů. Infikované myši bez aplikace ritanserinu strávily signifikantně delší čas očicháváním otvorů než myši kontrolní (bez aplikace ritanserinu) ($p=0,033$). Zvýšený zájem o nové objekty je spojován se zvýšenou aktivitou D4 receptorů v prefrontálním kortexu (Powell a kol., 2003). Po aplikaci ritanserinu došlo u infikovaných myší k výraznému poklesu času stráveného očicháváním otvorů ($p=0,001$). Výrazné zvýšení hladiny dopaminu vlivem vysoké dávky ritanserinu mohlo způsobit u infikovaných myší utlumení pravděpodobně senzitivních dopaminergních D4 receptorů v prefrontálním kortexu (Bubeníková, osobní sdělení). To však nevysvětluje pokles času stráveného očicháváním otvorů, který byl zaznamenán také u myší kontrolních.

Jelikož byl ritanserin podán patrně v příliš vysoké dávce, která může působit zcela odlišným způsobem než dávka optimální je velmi těžké uvedené výsledky interpretovat. Porovnání výsledků s literaturou je též velmi problematické, jelikož ve většině dostupných studií byl ritanserin aplikován v kombinaci s jiným farmakem a to především potkanům s modelovou psychózou. Abychom získali alespoň dílčí výsledky tohoto experimentu, porovnávali jsme chování mezi infikovanými a kontrolními samicemi bez aplikace ritanserinu.

Mezi infikovanými a kontrolními samicemi, kterým nebyl aplikován ritanserin, byly zaznamenány rozdíly v několika prvcích chování. I v tomto případě je však třeba brát v úvahu, že těmto myším byl, ve stejné dávce jako druhé skupině myší ritanserin, aplikován roztok sacharózy. Tato samotná aplikace mohla zvířata určitým způsobem stresovat a ovlivnit tak zčásti i jejich chování v holeboard testu.

Infikované samice strávily signifikantně delší čas inaktivitou ($p=0,048$), avšak v průběhu testu proběhly signifikantně více čtverců než samice kontrolní ($p=0,042$). Z těchto výsledků tedy vyplývá, že infikované samice navzdory vyššímu času stráveného inaktivitou vykazují v novém prostředí vyšší horizontální lokomoční aktivitu než samice kontrolní (File, 2001). Zvýšená lokomoční aktivita v novém prostředí, vyjádřená počtem proběhnutých čtverců, je spojována s vyšší dopaminergní aktivitou v limbickém systému, především v nucleus accumbens (Kabbaj a Akil, 2001). Hay a kol. (1983c) též u *Toxoplasma*-pozitivních myší zaznamenal zvýšenou lokomoční aktivitu projevující se větším počtem proběhnutých čtverců.

Infikované samice začaly také signifikantně dříve očichávat otvory ($p=0,008$) a strávily očicháváním signifikantně delší čas než samice kontrolní ($p=0,033$). Na základě tohoto pozorování lze infikované samice považovat ve srovnání s kontrolními samicemi za zvědavější. S explorační novými objekty u laboratorních myší je spojena především aktivita D4 receptorů v prefrontálním kortexu (Powell a kol., 2003). Vyšší zvědavost u infikovaných samic v holeboard testu zaznamenala i Skallová (2005).

9.2.6. Sledování spontánní aktivity v testu s běhacími kolotoči

Po oba dva testované dny uběhly infikované samice signifikantně delší vzdálenost než samice kontrolní ($p=0,027$ resp. $p=0,038$). Infikované samice též v kolotoči běžely po oba dva dny signifikantně vyšší rychlostí ($p=0,020$ resp. $p=0,011$).

Z výsledků tedy vyplývá, že infikované samice jsou oproti samicím kontrolním aktivnější jak v prostředí novém (1. testovací den) tak v prostředí známém (2. testovací den). V tomto případě tedy nelze považovat habituaci za prvek, který by ovlivňoval sledované chování. K podobným výsledkům došel i Hay a kol. (1985), který pozoroval zvýšenou spontánní aktivitu v běhacím kolotoči u kongenitálně infikovaných samců.

Výrazný rozdíl mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi byl zaznamenán v uběhnuté vzdálenosti a rychlosti pohybu ($p=0,0028$ resp. $p=0,003$) v průběhu prvních 30 minut testování, tedy v době, kdy bylo prostředí pro testovaná zvířata doposud zcela neznámé. Počáteční záznam chování myší v novém prostředí vypovídá o reakci zvířat na nový podnět. Pozorovaná počáteční hyperaktivita u infikovaných samic tedy pravděpodobně odráží sníženou averzi infikovaných zvířat k novému prostředí. Infikované samice jsou tedy oproti samicím kontrolním, stejně jako v holeboard testu, hodnoceny jako zvědavější.

Někteří autoři předpokládají, že aktivita v běhacím kolotoči nestanovuje lokomoční aktivitu jak se ve většině studií předpokládá, ale závislost zvířete na odměně. Tento názor se opírá například o výsledky studie, ve které byl zkoumán účinek amfetaminu. Aplikace amfetaminu zlatým křečkům (*Mesocricetus auratus*) výrazně zvýšila jejich lokomoční aktivitu v open-field testu, naopak aktivita v kolotoči po aplikaci amfetaminu mnohonásobně poklesla (Della Maggiore a Ralph, 2000). Autoři předpokládají, že jedinci se sníženou dopaminergní aktivitou ve striatu, musejí běhat za cenu stejného uspokojení rychleji a delší čas než jedinci s dopaminergní aktivitou normální (Tarr a kol., 2004).

Abychom důkladněji otestovali výše zmíněnou hypotézu, zaznamenávali jsme v našem experimentu také čas strávený pohybem zvířat v kolotoči. Výsledky skutečně

potvrdily, že delší uběhnutá vzdálenost v průběhu testování u infikovaných jedinců nezávisela pouze na vyšší rychlosti pohybu těchto zvířat, ale také na delším čase, který zvířata strávila pohybem v kolotoči. I když rozdíl mezi infikovanými a kontrolními samicemi v čase stráveném pohybem v běhacím kolotoči nebyl statisticky signifikantní, výsledky naznačují, že zvýšená aktivita v kolotoči u infikovaných myší bude patrně opravdu souviset s jejich zvýšenou touhou po odměně, a tedy i s jejich sníženou dopaminergní aktivitou ve striatu.

Aktivita v běhacím kolotoči přináší myším podobné uspokojení jako jídlo (Höschl, 1996; Rhodes a kol., 2005). Jak bylo již výše popsáno, infikované samice v testu „reakce na změnu potravy“ po všechny dny testování spotřebovaly více krmiva než samice kontrolní. Je tedy možné, že infikované myši, aby dosáhly stejného uspokojení (zvýšení hladiny dopaminu ve striatu) jako myši kontrolní musejí sežrat i více potravy.

Z výsledků experimentu s běhacími kolotoči je mimo jiné také patrné, že u *Toxoplasma*-pozitivních myší nebyla zaznamenána žádná změna v preferenci světlé či tmavé fáze dne, nebo-li v rozložení aktivity v průběhu dne. Nejvyšší vzestup aktivity u všech testovaných myší nastal vždy v temné fázi dne, zatímco ve světlé fázi dne došlo naopak k výraznému poklesu této aktivity (Nejedlý, 1965).

9.3. Detekce počtu aktivních dopaminergních neuronů v jednotlivých oblastech nervové tkáně myší

Výsledky etologických pokusů samy o sobě nemohou mechanismus působení *Toxoplasma gondii* vysvětlit. Jelikož většina behaviorálních změn pozorovaná u infikovaných myší pravděpodobně souvisí s dopaminergní aktivitou, rozhodli jsme se tyto změny v chování porovnat s aktivitou dopaminergních neuronů ve specifických oblastech mozku infikovaných zvířat.

Jelikož se první pokus o detekci dopaminergních neuronů myší testovaných v sérii etologických testů zmíněných v této práci, nezdařil, následující experiment byl proveden na souboru myší testovaných v jiných etologických testech (Skallová, 2005b). Tyto myši však byly velmi staré, takže imunohistochemické nálezy byly dosti nejasné. Ve třetím experimentu jsme sledovali pouze vliv stáří myší na histochemický obraz. Z tohoto důvodu byly porovnávány mladé (stáří 1,5 měsíce) myši, které nebyly nenakaženy *Toxoplasma gondii*, se starými nenakaženými myši stejného kmene (z experimentu č. 2).

9.3.1. Experiment č. 1

Příčina našeho neúspěchu v prvním experimentu byla s největší pravděpodobností vysoká teplota želatiny, do které byl každý zafixovaný mozek zaléván. Zvýšená teplota vyvolává v tkáni řadu změn, včetně denaturace některých proteinů, z tohoto důvodu je první část imunohistochemického barvení protilátkou na dopamin prováděna při 4 °C (Benarová a Tonar, 2002).

Metoda zalévání do želatiny se v histologii používá především z důvodu zpevnění zafixované tkáně. Výhodou tohoto postupu je ale také to, že želatinový bloček slouží zároveň k přichycení ke stojánku mikrotomu a díky tomu nedochází ke ztrátám koncových částí tkáně, tak jak je tomu při pouhém zmrazení.

9.3.2. Experiment č. 2

Jelikož byla nervová tkáň všech zvířat testovaných v experimentu č. 2 degenerovaná (vakuolizace) a počet dopaminergních neuronů byl vlivem této degenerace celkově velmi nízký, byli jsme nuceni detekovat počet dopaminergních neuronů pouze ve třech oblastech nervové tkáně (skupiny A9, A14, A15).

První hodnocenou skupinou byly dopaminergní neurony skupiny A9, lokalizované ve ventrální části středního mozku v oblasti substantia nigra. Axony těchto neuronů jsou vysílány především do striata a vytvářejí tak mezo-striatální (nigrostriatální) dopaminergní projekci. Tato dopaminerní dráha má vliv především na emocionalitu, reakci na odměnu, orientaci a aktivitu jedince (Arnold, 1996).

Dalšími skupinami dopaminergních neuronů, které jsme měli v tomto experimentu možnost porovnávat, byly skupiny A14 a A15. Uvedené skupiny dopaminergních neuronů, lokalizované v mediobazálním regionu hypothalamu inervují laterální septum, hypothalamus a míchu. Dopaminergní dráha vycházející z hypothalamu moduluje produkci a uvolňování hypofyzálních hormonů. Hypothalamus se podílí na regulaci cirkadiálních rytmů, tělesné teploty, hladu atd. (Czyrak a kol., 2000; Kobayashi a Sano, 2000).

V mozku *Toxoplasma*-pozitivních myší byla zaznamenána o 14 % vyšší hladina dopaminu než v mozku myší kontrolních (Stibbs, 1985). Tato studie by mohla ukazovat na možnost, že infikované myši mají zvýšený počet určitých skupin dopaminergních neuronů, které jsou zodpovědné za pozorovanou zvýšenou hladinu dopaminu v nervové tkáni. Hladina dopaminu v mozku nezávisí však pouze na počtu dopaminergních neuronů, ale také na množství přítomné tyrozinhydroxylázy a specifických prekursorů (tyrozinu) v neuronech,

kteře jsou nedílnou součástí tvorby neurotransmiteru dopaminu (Karasawa a kol., 1999). Je třeba také zdůraznit, že zvýšení hladiny dopaminu v celém mozku o 14 % je z neurofyziologického hlediska považováno za prakticky nevýznamné. Za neurofyziologicky významné je obvykle pokládáno až zvýšení hladiny dopaminu v celém mozku o desítky procent (Bubeníková, osobní sdělení).

Mezi *Toxoplasma*-pozitivními a kontrolními samicemi nebyl pozorován signifikantní rozdíl v počtu aktivních dopaminergních neuronů (skupin A9, A14, A15) v hodnocených oblastech nervové tkáně.

Zajímavé však je, že počet dopaminergních neuronů skupiny A9 byl u infikovaných samic viditelně (nesignifikantně) nižší než u samic kontrolních ($p=0,099$). Nesignifikantní výsledek testu mohl být v tomto případě způsoben nízkým počtem dopaminergních neuronů, které bylo možno v mozcích (starých) myši detekovat. Nižší počet dopaminergních neuronů v substantia nigra může způsobit snížení dopaminergní aktivity ve striatu (Arnold, 1996). Snížená dopaminergní aktivita ve striatu, je zodpovědná za zvýšenou závislost jedince na odměně (Tarr a kol., 2004). Na druhé straně snížená dopaminergní aktivita v nigrostriatální projekci může mít za následek celkové snížení aktivity zvířete (Arnold, 1996).

Detekce počtu dopaminergních neuronů v experimentu č. 2 byla prováděna v nervové tkáni kontrolních a infikovaných myši testovaných v baterii etologických testů odlišné od souboru testů použitých v této práci (Skallová, 2005b). Z tohoto důvodu je třeba tyto výsledky porovnávat především s výsledky těchto etologických testů.

Infikované myši v testu s běhacími kolotoči uběhly signifikantně delší vzdálenost než myši kontrolní (Skallová, 2005b). Použitím přesnější aparatury v experimentu popsaném v této práci jsme prokázali, že tato delší uběhnutá vzdálenost je způsobena jak vyšší rychlostí pohybu infikovaných myši tak i delším časem stráveným pohybem v běhacím kolotoči. Na základě těchto dvou experimentů lze předpokládat, že infikované myši mají oproti myším kontrolním pravděpodobně zvýšenou touhu po odměně, která může být způsobena sníženou dopaminergní aktivitou ve striatu. Výsledky imunohistochemické studie tuto hypotézu podporují.

Dopaminergní aktivita v nigrostriatální projekci však také ovlivňuje aktivitu jedince. U infikovaných myši Skallová (2005b) zaznamenala sníženou lokomoční aktivitu v open-field testu, vyjádřenou nižším počtem proběhnutých čtverců. Zvýšená lokomoční aktivita u infikovaných myši, vyjádřená vyšším počtem proběhnutých čtverců, byla naopak zaznamenána v této práci při použití holeboard testu. Rozdíly ve výsledcích mohou být způsobeny nejen odlišnou testovací aparaturou, ale také nízkým počtem testovaných jedinců

v holeboard testu a rozdílným experimentálním uspořádáním etologických testů. Snížená lokomoční aktivita v neznámém prostředí, vyjádřena počtem proběhnutých čtverců, souvisí především se sníženou dopaminergní aktivitou v limbickém systému (nucleus accumbens) (Kabbaj a Akil, 2001). Z tohoto důvodu tedy nelze určit, zda námi pozorované snížení počtu dopaminergních neuronů v substantii nigra by mohl mít vliv na změnu lokomoční aktivity infikovaných myší.

Abychom ověřili zda opravdu dochází u infikovaných myší ke změnám hladiny dopaminu v určitých oblastech nervové tkáně je nutné tento experiment zopakovat a porovnávat počet všech skupin dopaminergních neuronů, a to především těch, které se účastní hlavních dopaminergních projekcí (skupiny A8, A10). Pro maximální přesnost výsledků je nezbytné zaznamenávat počet dopaminergních neuronů na každém řezu nervové tkáně a jak také ukázaly výsledky pokusu č. 3 (viz. níže) používat myši vhodného stáří.

9.3.3. Experiment č. 3

Jedním z možným vysvětlením degenerace nervové tkáně myší v experimentu č. 2 bylo vysoké stáří testovaných zvířat. Z tohoto důvodu byl také proveden experiment č. 3, ve kterém jsme sledovali pouze vliv stáří na histochemický obraz nervové tkáně.

Pokles hladiny dopaminu u starších myší byl prokázán v mnoha předchozích studiích (Dean a Fowkes, 1992; Kish a kol., 1992). Existuje několik příčin, které mohou být zodpovědné za pokles hladiny tohoto neurotransmiteru. Jednou z nich je zvýšená aktivita monoaminoxidázy, která ve větší míře odbourává dopamin a tak přispívá k degeneraci dopaminergních neuronů (Dollemore, 2002). Druhou příčinou je snížení hladiny tyrozinu, který je prekursorem dopaminu. Třetí možností je pak nedostatečná hydroxylace tyrozinu, která může způsobit deficit aktivity tyrozinu (Karasawa a kol., 1999).

V experimentu č. 3 jsme prokázali, že všeobecně nízký počet dopaminergních neuronů pozorovaný v nervové tkáni myší v experimentu č. 2 je opravdu způsoben jejich vysokým stářím. Z výsledků experimentu č. 3 je patrné, že u myší ve věku 24 měsíce dochází až k 50 % poklesu počtu dopaminergních neuronů ve srovnání se situací u myší věku 1,5 měsíce.

Do stáří 5 měsíců nejsou u laboratorních myší pozorovány žádné změny v počtu dopaminergních neuronů, ovšem od stáří 8 měsíců začíná počet dopaminergních neuronů u laboratorních myší rychle klesat (Karasawa a kol., 1999). Není úplně jasné, zda má tento jev nějaký biologický význam, neboť v přírodě se myši dožívají obvykle stáří 10-12 měsíců (Nejedlý, 1965), tedy o polovinu méně než bylo stáří testovaných myší v experimentu č. 2.

K ověření zda skutečně dochází u *Toxoplasma*-pozitivních myších ke změnám v počtu dopaminergních neuronů ve specifických oblastech nervové tkáně a tedy i k změnám hladiny dopaminu, bude potřeba tento pokus zopakovat na mladých laboratorních myších (do věku 5 měsíců).

9.4. Mechanismus působení *Toxoplasma gondii*

Touto prací jsme se snažili nepřímým i přímým důkazem ověřit, zda *Toxoplasma gondii* ovlivňuje chování svých mezipřenositelů prostřednictvím neurotransmiteru dopaminu.

Výsledky našich etologických a imunohistochemických experimentů ukazují, že změny v chování infikovaných laboratorních myší by mohly být opravdu způsobeny změnami v dopaminergním systému.

Zhoršená prostorová paměť a schopnost učení je spojována se sníženou dopaminergní aktivitou v meso-kortikální dráze, především v hipokampu a prefrontálním kortexu (Gasbarri a kol., 1996; Viggiano a kol., 2003b). Zvýšená horizontální lokomoční aktivita v novém prostředí (v našem případě reprezentovaném holeboard arénou) je spojována s vyšší dopaminergní aktivitou v limbickém systému (Kabbaj a Akil, 2001). Zvýšená explorace nových objektů je u laboratorních myší asociována se zvýšenou aktivitou D4 receptorů v prefrontálním kortexu (Powell a kol., 2003). Zvýšená aktivita v běhacím kolotoči je spojována se sníženou dopaminergní aktivitou ve striatu (Tarr a kol., 2004). Předpoklad, že dochází u infikovaných myší k poklesu dopaminergní aktivity ve striatu podporují i výsledky imunohistochemického experimentu.

Naše výsledky naznačují, že infikované myši mají pravděpodobně sníženou dopaminergní aktivitu v meso-striální a meso-kortikální projekci. Snížená dopaminergní aktivita může být u infikovaných myší kompenzována zvýšenou senzitivitou dopaminergních receptorů. Některé prvky chování pozorované u infikovaných myší v holeboard testu jsou spojovány se zvýšenou senzitivitou dopaminergních receptorů (D1 a D4 receptory). Jelikož však tento pokus nebyl proveden za zcela optimálních podmínek (aplikace příliš vysoké dávky ritanserinu x samotná aplikace roztoku sacharózy) nelze pozorované chování testovaných zvířat považovat za zcela průkazné.

Na základě etologických testů se také Skallová (2005b) domnívá, že u infikovaných myší dochází pravděpodobně k poklesu dopaminergní aktivity v meso-striální projekci.

Ačkoliv etologické testy i provedený imunohistochemický experiment naznačují, že *Toxoplasma gondii* u svých mezipřenositelů pravděpodobně snižuje dopaminergní aktivitu

v určitých oblastech nervové tkáně, je třeba k ověření této domněnky provést další imunohistochemické experimenty zaměřené nejen na srovnávání počtu jednotlivých skupin dopaminergních neuronů, ale také na detekci dopaminergních receptorů případně prekursorů dopaminu.

10. Závěrečné shrnutí

1. Prokázali jsme, že kříženci dvou inbredních kmenů (F1 kříženci kmenů BALB/c a C57/b) jsou odolnější proti infekci *Toxoplasma gondii* než myši inbredního kmene CBA/J (Kodym a kol., 2002).

2. Samice i samci v testech pachových preferencí rozlišovali pach infikovaných jedinců od pachu jedinců kontrolních. Zda vlivem *Toxoplasma gondii* skutečně dochází ke změně vylučovaných feromonů, které jsou zodpovědné za následné pachové preference myši pozorované v našich experimentech je potřeba objasnit biochemickými testy.

3. Mezi infikovanými a kontrolními samicemi jsme nepozorovali statisticky významný rozdíl v reakci na neznámou potravu. Infikované samice po všechny dny měření spotřebovaly více krmiva než samice kontrolní. Zvýšené energetické nároky infikovaných myši byly pravděpodobně způsobeny parazitací.

4. U infikovaných samic byla oproti samicím kontrolním i 12 týdnů p. i. zaznamenaná snížená schopnost učení a prostorové paměti v osmiramenném radiálním bludišti. Rozdíly mezi infikovanými a kontrolními samicemi již nebyly tak výrazné jako v časných fázích infekce (Piekarski a kol., 1978; Witting, 1979). Snížená schopnost prostorového učení může být způsobena sníženou dopaminergní aktivitou v meso-kortikální projekci (Gasbarri a kol., 1996).

5. Infikované samice při přechodu různě širokých kladin dosahovaly horších výsledků než samice kontrolní. Delší čas potřebný k překonání lávky mohl být způsoben zhoršenou motorickou schopností infikovaných zvířat, ale také pravděpodobně zhoršenou schopností učit se co nejrychleji opustit otevřený prostor.

6. U infikovaných samic došlo po aplikaci ritanserinu k signifikantnímu zvýšení času stráveného groomingem, u kontrolních samic *Grooming* statisticky významně ovlivněn nebyl. Zvýšený čas strávený groomingem by mohl být u infikovaných myši způsoben zvýšenou senzitivitou jejich dopaminergních D1 receptorů (Bubeníková, osobní sdělení). U infikovaných samic (bez aplikace ritanserinu) byla oproti samicím kontrolním (bez aplikace ritanserinu) zaznamenána zvýšená lokomoční aktivita v neznámém prostředí, která je

spojována s vyšší dopaminergní aktivitou v limbickém systému (Kabbaj a Akil, 2001). Tyto infikované samice byly v holeboard testu také hodnoceny jako zvědavější. Zvýšená zvědavost je asociována se zvýšenou aktivitou dopaminergních D4 receptorů v prefrontálním kortexu (Powel a kol., 2003).

7. Na základě výsledků z testu s běhacími kolotoči lze infikované samice narozdíl od samic kontrolních považovat za aktivnější a pravděpodobně více závislé na odměně. Zvýšená závislost na odměně je spojována se sníženou dopaminergní aktivitou ve striatu (Tarr a kol., 2004). U infikovaných samic ve srovnání s kontrolami byla mimo jiné zaznamenána výrazná hyperaktivita v počátku testování, která je patrně odrazem snížené averze infikovaných zvířat k novému prostředí.

8. Mezi infikovanými a kontrolními samicemi jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl v počtu dopaminergních neuronů skupiny A9, A14 a A15. Zajímavé je však zjištění nižšího počtu dopaminerních neuronů skupiny A9 v substantia nigra u infikovaných myší. Snížený počet dopaminerních neuronů v substantia nigra může mít za následek sníženou dopaminergní aktivitu ve striatu, která je spojována se zvýšenou závislostí na odměně. Výsledky imunohistochemické studie tedy podporují výsledky získané v testu s běhacími kolotoči.

9. Prokázali jsme, že u laboratorních myší ve věku 24 měsíce dochází až k 50 % poklesu počtu dopaminergních neuronů ve srovnání se situací u myší stáří 1,5 měsíce. V imunohistochemických experimentech zaměřených na dopamin je tedy potřeba testovat pouze mladé laboratorní myši.

10. Výsledky behaviorálních a imunohistochemických experimentů jsou celkově v souladu s naší výchozí hypotézou, že *Toxoplasma gondii* ovlivňuje chování svých mezipřenositelů prostřednictvím neurotransmiteru dopaminu. Pozorované změny v chování i záznam nižšího počtu dopaminergních neuronů v substantia nigra u infikovaných myší ukazují na patrně sníženou dopaminergní aktivitu v meso-striatální a meso-kortikální projekci. Tento pokles dopaminergní aktivity může být kompenzován zvýšenou citlivostí některých dopaminergních receptorů.

11. Použitá literatura

Aford CH. A., Stagno S., Reynolds D. W. (1974)- Congenital toxoplasmosis: Clinical laboratory and therapeutic considerations with special reference to subclinical disease. Bulletin of the New York Academy of Medicine 50, 160-181.

Achiraman S., Archunan G. (2005)- 3-Ethyl-2,7-dimethyl octane, a testosterone dependent unique urinary sex pheromone in male mouse (*Mus musculus*). Animal Reproduction Science 87, 151-161.

Araujo F. G., Williams D. M., Gurmet F. C., Remington J. S. (1976)- Strain-dependent differences in murine susceptibility to toxoplasma. Infection and Immunity 13, 1528-1530.

Arnold J. M. (1996)- Time course and regional specificity of neurochemical changes in the rat brain following intra-accumbal and intra-striatal injection of 6,7-ADTN. Mémoire présenté á la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de maitre es sciences.

Arnott M. A., Cassella J. P., Aitken P. P., Hay J. (1990)- Social interactions of mice with congenital *Toxoplasma*-infection. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 84, 149-156.

Baker S. A., Stanford L. E., Brown R. E., Hagg T. (2005)- Maturation but not survival of dopaminergic nigrostriatal neurons is affected in developing and aging BDNF-deficient mice. Brain Research 1039, 177-188.

Barber I. (2005)- Parasites grow larger in faster growing fish hosts. International Journal for Parasitology 35, 137-143.

Barnard C. J., Benke J. M., Sewell J. (1994)- Social behaviour and susceptibility to infection in house mice (*Mus musculus*): effects of group size, aggressive and status-related hormonal responses prior to infection on resistance to *Babesia microti*. Parasitology 108: 487-496.

Benarová M., Tonar Z. (2002)- Principy a příklady imunohistochemie. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni.

Berdoy M. (1994)- Making decisions in the wild: constraints, conflicts and communication in foraging wild rats. Behavioral aspects of feeding, pp. 289-313.

Berdoy M., Webster J. P., McDonald D. W. (1995)- Parasite-altered behaviour: is the effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific? Parasitology 111, 403-409.

Berdoy M., Webster J. P., McDonald D. W. (2000)- Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. Proceeding of Royal Society of London, series B- Biological Sciences 267, 1591-1594.

Bergquist J., Ściubisz A., Kaczor A., Silberring J. (2001)- Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids. Journal of Neuroscience Method 113, 1-13.

Brown R. E. (1995)- What is the role of the immune systems in determining individually distinct body odours? International Journal of immunopharmacology 17, 655-661.

Bureš J., Fenton A. A. (2000)- Neurophysiology of spatial cognition. News Physiology Science 15, 233-240.

Carlsson A. C. (50.léta)- www.encyclopedia.laorlawtalk.com/Arvid-Carlsson.

Clayton D. H. (1991)- The influence of parasites on host sexual selection. Parasitology Today 7, 329-334.

Cloninger C. R. (1987)- A systematic method for clinical description and classification of personality variants. Archives of General Psychiatry 44, 573-588.

Cloninger C. R., Svrakic D. M., Przybeck T. R. (1993)- A psychobiological model of temperament and character. Archives of General Psychiatry 50, 975-990.

Contet C., Rawlins J. N. P., Deacon R. M. J. (2001)- A comparison of 129S2/SvHsd and C57BL/6JolaHsd mice on a test battery assessing sensorimotor, affective and cognitive behaviours: implications for the study of genetically modified mice. *Behavioural Brain Research* 124, 33-46.

Corllis J. O. (1994)- An interim utilitarian hierarchial clasification and characterazion of the Protists. *Acta Protozoologica* 33, 1-51.

Cuello A. C. (1993)- *Imunohistochemistry II*. Willey Press, NY. Převzatá citace-
www.sigmaaldrich.com

Cutler A. R., Wilkerson A. E., Gingras J. L., Levin E. D. (1996)- Prenatal cocaine and/or nicotine exposure in rats: Preliminary findings on long-term cognitive outcome and genital development in birth. *Neurotoxicology and Teratology* 18 (6), 635-643.

Czyrak A., Chocyk a., Mackowiak M, Krzysztof W. (2000)- Distribution of dopamine D1 receptors in the nucleus paraventricularis of the hypothalamus in the rats: an immunohistochemical study. *Molecular Brain Research* 85, 209-217.

Deacon R. M. J., Croucher A., Rawlins J. N. (2002)- Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behavioural Brain Research* 132, 203-213.

Dean W., Fowkes S. (1992)- Deprenyl: a universal anti-aging strategy? *Smart Drug News* 1(6).

Della Maggiore V., Ralph M. R. (2000)- The effect of amphetamine on locomotion depends on motor device utilized: the open field vs. running wheel. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 65, 585-590.

Dollemore D. (2002)- Mouse experiments link folic acid deficiency to Parkinson's disease. *National institute on aging*.

Dubey J. P. (1986)- Toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189 (2), 160-170.

Ebstein R. P., Benjamin J., Belmaker R. H. (2000)- Personality and polymorphisms of genes involved in aminergic neurotransmission. *European Journal of Pharmacology* 410, 205-214.

Ehman K. D., Scott M. E. (2001)- Urinary odour preferences of MHC congenic female mice *Mus domesticus*: implication for kin recognition and detection of parasitized males. *Animal Behaviour* 62, 781-789.

Ehman K. D., Scott M. E. (2002)- Female mice mate preferentially with non-parasitized males. *Parasitology* 125, 461-466.

Ferguson D. J. P., Graham D. I., Hutchison W. M. (1991)- Pathological changes in the brains of mice infected with *Toxoplasma gondii*: a histological, immunocytochemical and ultrastructural study. *International Journal Experimental Pathology* 72, 463-474.

Festing M. F. W., Greenwood R. (1976)- Home-cage wheel activity recording in mice. *Laboratory Animals* 10, 81-85.

File S. E. (2001)- Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in mouse. *Behavioral Brain Research* 125, 151-152.

Fišar Z., Jiráček R. (2001)- *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie*. Grada publishing.

Flegr J. (2005)- *Evoluční biologie*. Academia.

Flegr J., Havlíček J. (1999)- Changes in the personality profile of young women with latent toxoplasmosis. *Folia Parasitologica* 46, 22-28.

Flegr J., Havlíček J., Kodým P., Malý M., Šmahel Z. (2002)- Increased risk of traffic accidents in subjects with latent toxoplasmosis: a retrospective case-control study. *BMC Infections Diseases* 2, 11-17.

Flegr J., Hrdý I. (1994)- Influence of chronic toxoplasmosis on some human personality factors. *Folia Parasitologica* 41, 122-126.

Flegr J., Kodym P., Tolarová V. (2000)- Correlation of duration of latent *Toxoplasma gondii* infection with personality changes in women. *Biological Psychology* 53, 57-68.

Flegr J., Preiss M., Klose J., Havlíček J., Vitáková M., Kodym P. (2003)- Decreased level of psychobiological factors novelty seeking and lower intelligence in men latently infected with the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*, a missing link between schizophrenia and Toxoplasmosis? *Biological Psychology* 63 (3), 253-268.

Flegr J., Zitková Š., Kodym P., Frynta D. (1996)- Induction of changes in human behaviour by parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *Prasitology* 13, 49-54.

Franck D. (1996)- *Etologie*. Karolinum.

Franklin K. B. J., Paxinos G. (1997)- *The mouse brain: in stereotaxic coordinates*. Academia Press.

Frenkel J. K. (1974)- Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 50, 182-191.

Frenkel J. K. (1988)- Pathophysiology of Toxoplasmosis. *Parasitology Today* 4, 273-278.

Frynta D. (1992)- „Open field“ behaviour in seven mice (*Muridae: Apodemus Mus*) species. *Prague studies in mammalogy*, 31-38.

Gange S. S. (2001)- Toxoplasmosis. *Primary Care Update Ob/Gyns* 3, 122-126.

Gasbarri A, Sulli A., Innocenzi R., Pacitti C., Brioni J. D. (1996)- Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. *Neuroscience* 74, 1037-1044.

Geffard M., Buijs R. M., Seguela P., Pool Ch. W., Le Moal M. (1983)- First demonstration of highly specific and sensitive antibodies against dopamine. *Brain Research* 294, 161-165.

Godin J. G. J., Sproul C. D. (1988)- Risk taking in parasitized sticklebacks under threat of predation: effects of energetic need and food availability. *Canadian Journal Zoology* 66, 2360-2367. Převzatá citace- Barber I. (2005)- Parasites grow larger in faster growing fish hosts. *International Journal for Parasitology* 35, 137-143.

Gross U. (1996)- *Toxoplasma gondii* Research in Europe. *Parasitology Today* 12 (1), 1-4.

Guenther K., Decon R. M., Perry V. H., Rawlins J. N. (2001)- Early behavioural changes in scrapie-affected mice and the influence of dapsone. *The European Journal of Neuroscience* 14, 401-409.

Hamilton W. D., Zuk M. (1982)- Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites? *Science* 218, 384-387.

Havlíček J., Gašová Z., Smith A. P., Zvára K., Frynta D. (2001)- Decrease of psychomotor performance in subjects with latent "asymptomatic" toxoplasmosis. *Parasitology* 122, 515-520.

Hay J., Aitken P. P., Arnott M. A. (1985)- The influence of congenital *Toxoplasma*-infection on the spontaneous running activity of mice. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 71, 456-462.

Hay J., Aitken P. P., Graham D. I. (1984)- *Toxoplasma*-infection and response to novelty in mice. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 70, 575-587.

Hay J., Aitken P. P., Hair D.M., Hutchison W. M., Graham D. I. (1983a)- The effect of congenital and adult-acquired *Toxoplasma*-infections on the motor performance of mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 77, 261-277.

Hay J., Aitken P. P., Hutchison W. M., Graham D. I. (1983b)- The effect of congenital and adult-acquired *Toxoplasma*-infections on activity and responsiveness to novel stimulation in mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 77, 483-495.

- Hay J., Hutchison W. M., Aitken P. P. (1983c)- The effect of *Toxocara canis* infection on the behaviour of mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 77, 543-544.
- Healy S. D., Braham S. R., Braithwaite V. A. (1999)- Spatial working memory in rats: No differences between the sexes. *Proceeding of Royal Society of London, series B- Biological Sciences* 266 (1435), 2303-2308.
- Heitman B. B., Irizarry A. F. (1997)- Recognition and management of toxoplasmosis. *The Nurse Practitioner* 22, 79-86.
- Hess L., Straus J. (2003)- K významu paměťové stopy. *Kriminalistika* 35, 4.
- Hersi A. I., Jacques D., Gaudreau P., Quirion R. (1996)- Comparative distribution of D1-like receptors in the hippocampal formation of rat, monkey and human brains. *Neuroscience-Net Article*.
- Holliman R. E. (1997)- Toxoplasmosis, Behaviour and Personality. *Journal of Infection* 35, 105-110.
- Horáček J. (2004)- Mechanismus účinku atypických antipsychotic a neurobiologie schizofrenie. *Psychiatrie* 8, 293-303.
- Höschl C. (1996)- Syndrom narušené závislosti na odměně. *Vesmír* 75, 485.
- Höschl C., Balon R. (1980)- Výsledky psychiatrického vyšetřování nemocných toxoplazmózou. *Časopis lékařů českých* 119 (12-13), 366-368.
- Hrdá Š., Votýpka J., Kodým P., Flegr J. (2000)- Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral change in mice. *Journal of Parasitology* 86, 657-663.
- Hutchison W. M., Aitken P. P., Wells B. W. P. (1980a)- Chronic *Toxoplasma*-infections and motor performance in the mouse. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 74, 507-510.

Hutchison W. M., Aitken P. P., Wells B. W. P. (1980b)- Chronic *Toxoplasma*-infections and familiarity-novelty discrimination in the mouse. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 77, 145-150.

Hutchison W. M., Bradley M., Cheyne W. M., Wells B. W. P., Hay J. (1980c)- Behavioral abnormalities in *Toxoplasma*-infected mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 74, 337-345.

Chagnaud J. L., Mons N., Tuffet S., Grandier X. V., Geffard M. (1987)- Monoclonal antibodies against glutaraldehyde-conjugated dopamine. *Journal of Neurochemistry* 49, 487-494.

Ikemoto K. (1997)- Dopaminergic innervation of the monkey caudal nucleus accumbens. *Brain research bulletin* 43(4), 417-423.

Isles A. R., Baum M. J., Ma D., Keverne E. B., Allen N. D. (2001)- Genetic imprinting: Urinary odour preferences in mice. *Nature* 409, 783-784.

Jiráček E. (2004)- Analýza obrazu- moderní prostředek pro technickou praxi. *Automa* 5.

Jíra J., Rosický B. (1983)- Imunodiagnostika a epidemiologie toxoplazmózy. *Academia Praha*, pp. 11-262.

Jírovec J., Vojtěchovský M. (1957)- Zkušenosti s toxoplazminovým testem u psychiatrických pacientů. *Hraniční problémy psychiatrie* 67, 67-76.

Johnson A. M. (1988)- Pathogenicity of *Toxoplasma gondii* cyst and oocysts measured by fever and weight loss in mice. *International Journal for Parasitology* 18, 865-868.

Kabbaj M., Akil M. (2001)- Individual differences in novelty-seeking behavior in rats: a c-fos study. *Neuroscience* 106, 535-545.

Kaňková Š. (2005)- Vliv latentní toxoplazmózy na průběh těhotenství. Diplomová práce. PřF UK.

Kavaliers M., Colwell D. D. (1993)- Aversive responses of female mice to the odours of parasitized males: neuromodulatory mechanisms and applications for mate choice. *Ethology* 95, 202-212.

Kavaliers M., Colwell D. D. (1995a)- Discrimination by female mice between the odours of parasitized and non-parasitized males. *Proceedings of the Royal Society of London, series B- Biological Sciences* 261, 31-35.

Kavaliers M., Colwell D. D. (1995b)- Odours of parasitized males induce aversive response in female mice. *Animal Behaviour* 50, 1161-1169.

Karasawa N., Yamawaki Y., Nagarsu T., Kawase T., Nishiyama K., Watanabe K., Onozuka M., Nagatsu I. (1999)- Age-associated changes in the dopamine synthesis as determined by GTP cyclohydrolase I inhibitor in the brain of senescence-accelerated mouse-prone inbred strains (SAMP8). *Neuroscience Research* 35, 31-36.

Kerwin R. (2000)- From pharmacological profiles to clinical outcomes. *International Clinical Psychopharmacology* 15 (4), S1-S4.

Kish S. J., Rajput A., Deck J. H., Hornykiewicz O. (1992)- Aging produces a specific pattern of striatal dopamine loss: implications for the etiology of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 58, 642-648.

Kobayashi K., Sano H. (2000)- Dopamine deficiency in mice. *Brain & Development* 22, S54-S60.

Kodym P., Blažek K., Malý M., Hrdá Š. (2002)- Pathogenesis of experimental toxoplasmosis in mice whit strains differing in virulence. *Acta Parasitologica* 47, 239-248.

Kodym P., Tolarová V. (1998)- Laboratorní diagnostika toxoplasmosy. *Remedia- Klinická mikrobiologie* 7, 224-226.

König B. (1993)- Maternal investment of communally nursing female house mice (*Mus musculus domesticus*). *Behavioural Processes* 30, 61-74.

Kukleta M., Šulcová A. (2003)- Texty k přednáškám z neurověd. Lékařská fakulta MU, Brno.

Kulišťák P. (2003)- Neuropsychologie. Portál.

Lee J. J., Leedale G. F., Bradbury P. (2000)- The illustrated guide to the Protozoa, second edition. The society of Protologists, USA.

Lightfoot J. T., Turner M. J., Daves M., Vordermark A., Kleeberger S. R. (2004)- Genetic influence on daily wheel running activity level. *Physiological genomics* 19, 270-276

McEvan B., Sapolsky R. (1995)- Stress and cognitive function. *Current Opinion in Neurobiology* 5, 205-216.

Milinski M. (1985)- Risk of predation of parasitised sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.) under competition for food. *Behaviour* 93, 203-216. Převzatá citace- Barber I. (2005)- Parasites grow larger in faster growing fish hosts. *International Journal for Parasitology* 35, 137-143.

Minto A., Roberts R. J. (1959)- The psychiatric complication of toxoplasmosis. *The Lancet* 6, 1180-1182.

Morris R. G. M. (1981)- Spatial localisation does not depend on the presence of local cues. *Learning Motivation* 12, 239-261.

Morris R. G. M., Garud P., Rawlins J. N. P. (1982)- Place navigation in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.

Mossman C. A., Dickamer L. C. (1996)- Odor preferences of female house mice (*Mus Domesticus*) in seminatural enclosures. *Journal of Comparative Psychology* 110, 131-138.

Nejedlý K. (1965)- Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat. Praha, SPN.

Nieoullon A. (2002)- Dopamine and regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology* 67, 53-83.

Paleček J. (1994)- *Biologie vývoje živočichů*. Skripta PřF UK Praha.

Páleníček T., Horáček J., Bubeníková V., Šťastný F. (2003)- The effect of specific ligands of 5HT/DA receptors on locomotion in MK-801 treated animals. *Physiological Research* 52.

Pehek E. A. (1996)- Local infusion of the serotonin antagonists ritanserin or ICS 205,930 increase in vivo dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 24, 12-18.

Pertovický P. (1998)- Structure and pathways of monoamine systems (noradrenaline, dopamine, serotonin). *Psychiatrie* 1, 4-11.

Petrovický O., Vojtěchovský M. (1955)- Klinický obraz získané toxoplazmózy z neurologického a psychiatrického hlediska. *Časopis lékařů českých* 94, 930-939.

Penn D. (1999)- A House Mouse primer. www.stormy.biology.utah.edu.

Piekarski G., Zippelius H. M., Witting P. A. (1978)- Auswirkungen einer latenten *Toxoplasma*-Infektion auf das Lernvermögen von weissen Laboratoriumsratten and mausen. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 57, 1-15.

Poulin R. (1994)- The evolution of parasite manipulation of host behaviour: a theoretical analysis. *Parasitology* 109, 109-118.

Powel H. C., Gibbs C. J., Lorenzo A. M., Lampert P. E., Gajdousek D. C. (1978)- Toxoplasmosis of the central nervous system in the adult. Electron microscopic observations. *Acta neuropathologica* 41, 211-216.

Powel S. B., Paulus M. P., Hartman D. S., Godel T., Geyer M. A. (2003)- RO-10-5824 is a selective dopamine D4 receptor agonist that increase novel object exploration in C57 mice. *Neuropharmacology* 44, 473-481.

- Rau M. E. (1983)- The open-field behaviour of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Journal of Parasitology* 86, 311-318.
- Rau M. E., Putter L. (1984)- Running responses of *Trichinella spiralis*-infected CD-1 mice *Parasitology* 89, 579-583.
- Rhodes J. S., Gammie S. C., Gerland T. (2005)- Neurobiology of mice selected for high voluntary wheel-running activity. *Interactive and Comparative Biology* 45, 438-455.
- Riedel G., Platt B. (2004)- *From Messengers to Molecules Memories are Made of These*. Kluwer Academic.
- Rogers D. C., Jones D. N. C., Nelson P. R., Quilter Ch. A., Robinson T. L., Hagan J. J. (1999)- Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioral phenotype of six inbred mouse strains. *Behavioral Brain Research* 105, 207-217.
- Rokyta R. (2000)- Estrogeny, paměť, bolest a ochrana neuronu. Jsou estrogeny zázračné hormony? *Vesmír* 79, 670.
- Rokyta R. (2002)- LTP and LTD- The mechanisms of learning and memory and possible pharmacological influencing. *Psychiatrie* 6, 3.
- Roth R., Elsworth J. (1995)- *Biochemical pharmacology of midbrain dopamine neurons Psychopharmacology: Fourth Generation of Progress*, Raven Press, New York 1995, 227-244.
- Sandstrom N., Williams C. (2001)- Memory retention is modulated by acute estradiol and progesterone replacement. *Behavioral Neuroscience* 115, 384-393.
- Sedwall G., Farde L. (1995)- Chemical brain anatomy of schizophrenia. *Neuroscience* 67, 37-48.
- Sheldon B. C., Verhulst S. (1996)- Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology & Evolution* 11, 317-231.

Shih J. C., Chen K., Ridd M. J. (1999)- Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annual Review Neuroscience* 22, 197-217.

Skallová A., Novotná M., Kolbeková P., Gašová Z., Veselý V., Lechovská M., Flegr J. (2005a)- Decreased level of novelty seeking in blood donors infected with *Toxoplasma*. *Neuroendocrinology Letters* 26 (5), 480-486.

Skallová A. (2005b)- Souvislost mezi dopaminem a změnami v chování laboratorních myši infikovaných parazitickým prvokem *Toxoplasma gondii*. Diplomová práce. PřF UK.

Smith A. D., Smith D. L., Zigmond M. J., Amalric M., Koob G. F. (2000)- Differential effects of dopamine receptors subtype blockade on performance of rats in a reaction-time paradigm. *Psychopharmacology* 148, 355-360.

Steiner H., Fuchs S., Accili D. (1998)- D3 dopamine receptor-deficient mouse: evidence for reduced anxiety. *Physiology and behavior* 63, 137-141.

Sternberg R. J. (2002)- Kognitivní psychologie. Portál.

Stibbs H. H. (1985)- Changes in brain concentrations of catecholamines and indoleamines in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 79 (2), 153-157.

Strange P. G. (2000)- Dopamine receptors. *Torcis Reviews* No 15.

Stuchlík A. (2003)- Space and spatial orientation (Prostor a prostorová orientace). *Česká Fyziologie* 52 (1), 22-33.

Svensson T. H., Ahlenius S., Hertel P., Mathé G. G., Nomikos G. G., Wadenberg M. (1997)- Prefrontal cortex dopamine and the mechanism of action of atypical neuroleptics. *Biology Psychiatry* 42, 269S-270S.

Tarazi F. I. (2001)- Neurofarmacology of dopamine receptors: Implications in neuropsychiatric diseases. *Medical Science* 3, 93-104.

Tarr B. A., Kellaway L. A., Gibson A. C., Russell V. A. (2004)- Voluntary running distance is negatively correlated with striatal dopamine in untrained rats. *Behavioural Brain Research* 154, 493-499.

Terner A. M., Heckerth A. R., Weiss L. M. (2000)- *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217-1258.

Tokuyama M., Takatsuji K. (1998)- Atlas of neuroactive substances and their receptors in the rat. Oxford university Press.

Trojan S., Langmeier M. (2003)- Lékařská fyziologie. Grada publishing.

Upchurch M., Wehner J. M. (1989)- Inheritance of spatial learning ability in inbred mice: A classical genetic analysis. *Behavioral Neuroscience* 103(6), 1251-1258.

Valenti P., Cozzio A., Nishida N., Wolfer D. P., Sakagushi S., Lipp H. P. (2001)- Similar target, different effects: Late-onset ataxic and spatial learning in prion proteindeficient mouse lines. *Neurogenetics* 3, 173-184.

Vallone D., Picetti R., Borrelli E. (2000)- Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24, 125-132.

Viggiano D., Ruocco L. A., Sadile A.G. (2003a)- Dopamine phenotype and behaviour in animal models: in relation to attention deficit hyperactivity disorders. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 27, 623-637.

Viggiano D., Vallone D., Ruocco L. A., Sadile A.G. (2003b)- Behavioural, pharmacological, morpho-functional molecular studies reveal a hyperfunctioning mesocortical dopamine system in an animal model of attention deficit and hyperactivity disorder. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 27 (7), 683-689.

Webster J. P. (2001)- Rats, cats, people and parasites, The impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes and Infection* 3, 1-9.

Webster J. P. (1994a)- The effect of *Toxoplasma gondii* and other parasites on activity levels an wild and hybrid *Rattus norvegicus*. Parasitology 109, 583-589.

Webster J. P., Bruton C. F. A., Macdonald D. W. (1994b)- Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. Parasitology 109, 37-43.

Whishaw I. Q., Tomie J. A. (1996)- Of mice and mazes: Similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. Physiology and Behavior 60(5), 1191-1197.

Wildführ G. (1954)- Toxoplasmose. Veb Gustav Fisher Verlag, Jena.

Willis Ch., Poulin R. (2000)- Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: the smell of good genes? Folia Parasitologia 47, 6-10.

Witting P. A. (1979)- Learning capacity and memory of normal and *Toxoplasma*-infected laboratory rats and mice. Zeitschrift fur Parasitenkunde 61, 29-51.

Zitková Š. (1996)- Změny v chování myši způsobené parazitickým prvokem *Toxoplasma gondii*. Diplomová práce. PřF UK.

Zuk M., McKean K. A. (1996)- Sex differences in parasite infections: patterns and processes. International Journal for Parasitology 26, 1009-1024.

Zvolský P. (1994)- Obecná psychiatrie. Universita Karlova, Praha.