

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Praha



Autoreferát disertační práce

**URČENÍ KRITICKÉ VÝVOJOVÉ PERIODY
PRO ÚČINKY METAMFETAMINU
NA CHOVÁNÍ LABORATORNÍHO POTKANA
V DOSPĚLOSTI**

Mgr. Ivana Hřebíčková

Praha 2018

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Fyziologie a patofyziologie člověka

prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav normální, patologické a klinické fyziologie, Ke Karlovu 4, Praha 2

Autor: Mgr. Ivana Hřebíčková

Školitel: prof. MUDr. Romana Šlamberová, Ph.D.

Oponenti: doc. MUDr. Jan Cendelín, Ph.D.

RNDr. Karel Valeš, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne 20.3.2018

**Obhajoba se koná dne 14.6.2018 v 10:00 v seminární místnosti fyziologického ústavu
1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Albertov 5, Praha 2.**

OBSAH

SOUHRN	3
SUMMARY	4
1 ÚVOD	5
2 HYPOTÉZY A CÍLE	6
3 MATERIÁL A METODIKA	6
3.1 PRENATÁLNÍ A POSTNATÁLNÍ PÉČE.....	6
3.2 APLIKACE V DOSPĚLOSTI	7
3.3 EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY.....	7
3.4 BEHAVIORÁLNÍ TESTY	7
3.5 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT.....	8
4 VÝSLEDKY	9
4.1 TEST PODMÍNĚNÉHO VYHLEDÁVÁNÍ DROGY (CPP).....	9
4.2 TEST SOCIÁLNÍCH INTERAKCÍ (SIT).....	9
4.3 TEST LABORAS.....	10
4.4 TEST MORRISOVA VODNÍHO BLUDIŠTĚ (MWM).....	10
5 DISKUZE	12
5.1 VLIV METAMFETAMINU NA BEHAVIORÁLNÍ TESTY	12
5.2 VLIV NEPŘÍMÉ A PŘÍMÉ EXPOZICE METAMFETAMINU V PRŮBĚHU NEONATÁLNÍHO OBDOBÍ.....	13
5.3 KRITICKÉ VÝVOJOVÉ PERIODY PRO ÚČINKY METAMFETAMINU NA CHOVÁNÍ ZVÍŘAT V DOSPĚLOSTI.....	14
6 ZÁVĚRY	15
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	16
8 PUBLIKACE AUTORA	19
8.1 PUBLIKACE IN EXTENSO S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE.....	19
8.2 PUBLIKACE IN EXTENSO S IMPAKT FAKTOREM BEZ VZTAHU K TÉMATU DISERTACE.....	20

SOUHRN

Cílem disertační práce bylo zjistit, které z neuro-ontogenetických stadií vývoje laboratorního potkana má pro expozici metamfetaminu (MA) zásadnější vliv na jeho chování v dospělosti a určit tak kritickou vývojovou periodu pro účinky této drogy.

Dospělé samice laboratorního potkana byly vystaveny během různého stadia gestace a laktace působení MA (5 mg/ml/kg) nebo fyziologického roztoku (S) (1 mg/kg). Testované látky byly aplikovány subkutánně během první poloviny gestace (ED 1-11), druhé poloviny gestace (ED 12-22), nebo během časně laktace (PD 1-11 nepřímo/přímo). Tato mláďata byla testována v dospělosti (PD 60-90) pomocí behaviorálních testů na aktivní vyhledávání drog (CPP), na vzájemné chování dvou jedinců (SIT), na chování jedince v neznámém prostředí (Laboras test) a na učení a paměť v dospělosti (MWM). Na vyvolání drogové závislosti v testu CPP jsme dospělým zvířatům během fáze podmiňování podávali MA v dávce 5 mg/ml/kg. Protože naše předešlé studie odhalily zvýšenou citlivost potomků na akutní aplikaci MA po prenatální expozici té samé drogy, polovině zvířat v dospělosti jsme před/během testu SIT, Laboras a MWM aplikovali akutní dávku MA (1 mg/ml/kg). Kontrolní skupině zvířat jsme aplikovali S (1 mg/kg). U samic jsme sledovali fázi estrálního cyklu.

Výsledky studie ukázaly, že prenatální a neonatální expozice MA neovlivnily vznik drogové závislosti v dospělosti, ale vedly k deficitům v sociálním chování, v motorické aktivitě a v kognitivních schopnostech zvířat v dospělosti. Akutní aplikace MA (5 mg/ml/kg) v testu CPP vedla u zvířat k vytvoření drogové závislosti. Akutní aplikace MA (1 mg/ml/kg) způsobila u zvířat k redukci sociálního chování a ke zvýšení motorické aktivity. V testu MWM vedla akutní aplikace MA ke snížení schopnosti zapamatovat si polohu skrytého ostrůvku u zvířat exponovaných během ED 12-22. Samice byly aktivnější v testu SIT a Laboras testu, navíc citlivost na akutní drogu během proestru/estru mezipohlavní rozdíl ještě zdůraznila. Samice také dosahovaly horších výsledků v testu učení a paměti. Přímá expozice MA subkutánně během PD 1-11 vedla k výraznějším deficitům v chování zvířat než nepřímá expozice prostřednictvím mateřského mléka.

Na základě všech našich zjištění jsme dospěli k závěru, že kritickou vývojovou periodou pro účinky MA na chování zvířat v dospělosti je druhá polovina prenatálního vývoje a časně postnatální období u laboratorního potkana, což odpovídá přibližně druhému a třetímu trimestru prenatálního vývoje u lidí.

SUMMARY

The aim of the Ph.D. thesis was to find out which of the neuro-ontogenetic stages of laboratory rat is more significant for the methamphetamine (MA) exposure on the behavior in adulthood and to determine a critical developmental period for the effects of this drug.

Adult female rats were exposed to MA (5 mg/ml/kg) or saline (S) (1 mg/kg) during different stages of gestation and lactation. The tested substances were administered subcutaneously during the first half of gestation (ED 1-11), the second half of gestation (ED 12-22) or during early lactation (PD 1-11 indirect/direct). These pups were tested in adulthood (PD 60-90) using behavioral tests for drug-seeking behavior (CPP), for social behavior (SIT), for behavior in unknown environment (Laboras test) and for learning and memory (MWM). To induce drug dependence in the CPP test, we exposed adult animals during the conditioning phase to MA in dose 5 mg/ml/kg. Our previous studies have shown increased susceptibility of offspring to acute MA after prenatal exposure to this drug, we applied acute dose of MA (1 mg/ml/kg) to half of animals in adulthood before/during the SIT, the Laboras and the MWM tests. The control group of animals was administered S (1 mg/kg). In adult female rats, phases of the estrous cycle were recognized and compared.

The results of the study showed that prenatal and neonatal MA exposure did not affect drug addiction in adulthood, but induced deficits in social behavior, motor activity, and cognitive function of adult animals. Acute administration of MA (5 mg/ml/kg) in the CPP test created drug addiction in animals. Acute administration of MA (1 mg/ml/kg) decreased social behavior and increased motor activity. In the MWM test, acute MA administration reduced the ability to remember the position of a hidden platform in animals exposed during ED 12-22. Adult female rats were more active in the SIT and in the Laboras test and achieved worse results in the learning and memory test. Females were more sensitive to acute MA during the proestrus/estrus. Direct exposure to MA subcutaneously during PD 1-11 led to more significant deficiencies in behavior than indirect exposure via the breast milk.

Based on our findings, we have concluded that the critical developmental periods for the effects of MA on behavior of animals in adulthood is the second half of prenatal development and early postnatal period in the laboratory rat, which corresponds approximately to the second and third trimesters of prenatal development in humans.

1 ÚVOD

Vývoj mozku se dělí na dva procesy: růst a zrání. Růst mozku u lidí probíhá od druhého trimestru až po první dva roky života. Největší počet mozkových buněk je vytvořený před porodem. U potkanů první polovina gestačního období představuje období embryonálního růstu, kdežto během druhé poloviny gravidity a časného neonatálního období probíhá organogeneze (Williams *et al.* 2003; Rice and Barone 2000a). V mnoha oblastech vyvíjejícího se mozku převládá počáteční nadprodukce neuronů (až o 50 %) s následným obdobím tzv. buněčné smrti během porodu či přechodů od časných postnatálních dní až do dospělosti. Tento proces má za následek různé kritické (senzitivní) období vývoje mozku (Semple *et al.* 2013; Clancy *et al.* 2007).

Metamfetamin (MA) představuje druhou nejrozšířenější užívanou drogu hned po konopí a nejčastěji zneužívanou synteticky připravenou drogu v České republice. Velice závažným, dnes už celosvětovým problémem, je zneužívání drog ženami během těhotenství (Marwick 2000). Mnoho těhotných žen přechází z jiných tvrdých drog právě na MA, protože má anorektické (napomáhá matkám udržovat jejich tělesnou hmotnost) a stimulační (dodává jim energii) účinky (Marwick 2000; Williams *et al.* 2003). MA je lipofilní látka, dobře prostupuje buněčné membrány (Dattel 1990; Wilcox *et al.* 1986). Po podání se rychle a dobře distribuuje v krvi, přestupuje do mozku matky, prochází také placentární bariérou do plodu a zasahuje tak do jeho prenatalního vývoje (Robinson and Becker 1986). Koncentruje se také v mateřském mléce, čímž působí na vývoj plodu i během laktace (Smith *et al.* 2001; Nordahl, Salo, and Leamon 2003). Kromě toho, že matka ohrožuje svoje zdraví, hrozí riziko potratů, předčasných porodů a děti se rodí s nižší porodní hmotností a s růstovou retardací (Eriksson *et al.* 1978; Oro and Dixon 1987; Dixon and Oro 1987). Navíc se u těchto dětí vyskytly také srdeční vady, rozštěpy rtů a dokonce morfologické a funkční změny některých struktur v rámci CNS (Dixon and Oro 1987; Plessinger 1998).

Della Grotta *et al.* (2010) uvádí, že 84,3 % těhotných, drogově závislých žen užívá MA během prvního trimestru, 56,0 % v druhém trimestru a 42,4 % těchto žen pokračuje s užíváním MA také během třetího trimestru. Amfetaminy, mezi které řadíme i MA, ovlivňují během vývoje centrální nervové soustavy zakončení neuronů a zasahují do maturace struktur mozku, které se postupně začínají vyvíjet během druhé poloviny gestačního období potkanů až do odstavu (Andersen 2003; Whitaker-Azmitia 1991; Zheng and Purves 1995). Proto aplikace v časných stadiích gravidity nemusí ovlivnit vývoj mozku plodu a způsobit tak funkční změny struktur, na rozdíl od pozdějších fází prenatalního či postnatálního vývoje, kdy

je vyvíjející se a dozrávající neurotransmitterový systém více senzitivní na účinek drogy (Williams, Moran, and Vorhees 2003; Rice and Barone 2000a).

2 HYPOTÉZY A CÍLE

Přesto, že byla opublikovaná řada studií ukazujících negativní účinky MA na potomky drogově závislých matek, není známo, které období březosti/laktace je u potkana tím nejcitlivějším. Určení tohoto období by bylo významným zjištěním pro případné vysazení drog u těhotných žen závislých na MA. Předpokládáme, že negativní účinky aplikace MA matkám na jejich potomstvo se budou lišit v závislosti na době aplikace. Vývojová období (prenatální a časně postnatální) u laboratorního potkana jsme rozdělili tak, aby přibližně odpovídala trimestrům prenatálního období u člověka. Embryonální den (ED) potkana 1-11 přibližně odpovídá 1. trimestru u člověka; ED 12-22 potkana 2. trimestru u člověka; časné postnatální období u potkana, postnatální den (PD) 1-11, odpovídá přibližně 3. trimestru u člověka (Clancy et al. 2007). Vzhledem k vývoji embrya/fétu předpokládáme, že období odpovídající 1. trimestru u člověka bude mít za následek spíše morfologické změny, zatímco 2. -3. trimestr spíše změny funkční.

Hlavními cíli mé disertační práce je zjistit:

- ❖ vliv MA v jednotlivých vývojových obdobích (aplikační periody),
- ❖ rozdíly v expozici mezi jednotlivými vývojovými obdobími (aplikační periody),
- ❖ vliv přímé a nepřímé aplikace MA v průběhu neonatálního období
- ❖ pohlavní rozdíly a vliv estrálního cyklu samic.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 PRENATÁLNÍ A POSTNATÁLNÍ PÉČE

Březí samice laboratorního potkana jsme od prvního dne gestace (ED 1) rozdělili do skupin tak, aby vývojová období (prenatální a časně postnatální) přibližně odpovídala trimestrům prenatálního vývoje u člověka: **(A)** skupina samic ovlivněna během **první poloviny gestační periody (ED 1-11)=1. trimestr**, **(B)** skupina samic ovlivněna během **druhé poloviny gestační periody (ED 12-22)=2. trimestr**, **(C)** skupina samic ovlivněna během **časné laktální periody (PD 1-11)=3. trimestr** (od prvního dne po porodu

do PD 11). Abychom mohli porovnat přenos účinku látky na potomstvo ovlivněných matek **nepřímo prostřednictvím mateřského mléka**, zvolili jsme si další skupinu, kde jsme látku podávali **přímo vpichem** mládřatům subkutánně.

Během těchto jednotlivých období jsme 1x denně aplikovali matkám/mládřatům subkutánně testované látky: MA v dávce 5 mg/ml/kg, S (fyziologický roztok). U skupiny mládřat exponovaných během rané laktační periody (PD 1-11) přímo vpichem subkutánně jsme kontrolní skupině místo podání S provedli jenom čistý vpich subkutánně (bez aplikace fyziologického roztoku), tzv. „sham“ (S).

V PD 21 byla mládřata odstavena od matek, rozdělena do skupin podle pohlaví do klecí po 4-5 a ponechána v klidu až do dospělosti s potravou a vodou *ad libitum*.

3.2 APLIKACE V DOSPĚLOSTI

Abychom mohli otestovat citlivost potomků k MA v dospělosti, polovině zvířat z každé prenatalně nebo neonatálně exponované skupiny (MA, S) jsme aplikovali s.c. MA v dávce 1 mg/ml/kg (test sociálních interakcí, test Laboras, test Morrisova vodního bludiště). Kontrolní skupině jsme aplikovali S (1 ml/kg). V testu sociálních interakcí jsme testované látky aplikovali 45 min. před testováním. V testu Laboras jsme testované látky zvířatům aplikovali těsně před testováním. V testu Morrisova vodního bludiště jsme testované látky aplikovali každý den po ukončení plavání, resp. v období mezi testy v ten samý čas jako předešlé dny. V testu podmíněného vyhledávání drogy jsme aplikovali polovině zvířatům v každé aplikační periodě MA v dávce 5 mg/ml/kg. Druhé polovině zvířat (kontrolní skupina) jsme aplikovali S s.c. (1 ml/kg).

3.3 EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY

Prenatální a neonatální expozicí MA jsme získali 8 skupin exponovaných mládřat: ED 1-11 MA, S; ED 12-22 MA, S; PD 1-11 nepřímo MA, S; PD 1-11 přímo MA, S. Pro objasnění mezipohlavních rozdílů v účinku MA byli testováni jak samci, tak samice. Navíc samice byly v dospělosti rozděleny do dvou skupin podle fáze estrálního cyklu: proestrus/estrus (P/E) a metestrus/diestrus (M/D).

3.4 BEHAVIORÁLNÍ TESTY

Exponována mládřata byla testována v dospělosti (PD 60-90) pomocí behaviorálních testů na aktivní vyhledávání drog (CPP), na vzájemné chování dvou jedinců (SIT), na chování jedince v neznámém prostředí (Laboras test) a na učení a paměť v dospělosti (MWM).

CPP test probíhá po dobu 10 dní. Skládá se ze 3 fází: pre-expozice, navykání (podmiňování) „conditioning“, a vlastní CPP test. Sleduje se volný pohyb zvířete, zaznamenává se volba komor, počet vstupů do jednotlivých komor a čas strávený v konkrétní komoře.

Test SIT byl koncipován na tři po sobě následující dny. První dva dny jsme zvířata habituovali na prostřední otevřené arény, na třetí den jsme zvířata ráno separovali, dvě hodiny na to aplikovali testovanou látku a 45 min. po aplikaci vhodili 2 zvířata do arény. Sociální chování a motorickou aktivitu jsme zaznamenávali videokamerou, záznam jsme pak manuálně vyhodnocovali pomocí programu ODLog. Hodnocenými parametry byly: a) aktivní sociální interakce - vzájemné očichávání, genitální očichávání, šplhání, podlézání, následování; b) nesociální aktivity – lokomoce, vztyčování.

Test Laboras umožňuje počítačové vyhodnocování pohybové aktivity laboratorního potkana v neznámém prostředí, ale s domácími podmínkami. Vyhodnocovali jsme parametry v 10-minutových intervalech: vzdálenost, čas strávený lokomocí, průměrnou rychlost pohybu, čas strávený vztyčováním (explorační chování).

Kognitivní funkce (učení a paměť) jsme u dospělých samců a samic testovali v MWM. Celková doba testování jednoho zvířete v MWM je 12 dní. Prvních 6 dní probíhá test učení, 8. den jsou zvířata testována „probe“ testem a na 12. den probíhá test paměti. Sledovali jsme vzdálenost, než našlo zvíře ostrůvek, chybu hledání – součet přímých vzdáleností od ostrůvku naměřených opakovaně v průběhu hledání, čas (latence), za který zvíře našlo ostrůvek a rychlost plavání. Ve dnech 1, 3, 6 v testu učení a na 12. den v testu paměti jsme navíc u testovaných zvířat hodnotili i použité strategie hledání ostrůvku (tigmotaxe, skenování).

3.5 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT

Při statistickém hodnocení dat jsme nejdříve stanovili rozložení a rozptyl dat v jednotlivých skupinách. Pokud bylo rozložení normální (gaussovské), tj. s rovnoměrnými rozptyly, byla data analyzována pomocí parametrického testu pro 3 a více skupin. Použili jsme vyhodnocení pomocí Analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Bonferroniho *post-hoc* testem. Četnost výskytu jevu byla porovnána pomocí Chi²-testu. Za signifikantní jsme považovali rozdíly pokud $p < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

4.1 TEST PODMÍNĚNÉHO VYHLEDÁVÁNÍ DROGY (CPP)

Prenatální expozice MA. Prenatální expozice MA během ED 1-11 a ED 12-22 neovlivnila vznik drogové závislosti v dospělosti.

Neонатální expozice MA. Neonatální nepřímá a přímá expozice MA během PD 1-11 neovlivnila vyhledávání drogy v dospělosti.

Akutní aplikace MA v dospělosti. Akutní aplikace MA v dospělosti vedla k vytvoření drogové závislosti.

Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu. Samci strávili více času v komorách asociovaných s aplikací drogy než samice.

Vliv aplikační periody. Zvířata exponovaná během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka více vstupovala do komor asociovaných s aplikací drogy a strávila v těchto komorách více času než zvířata exponovaná během jiných aplikačních období.

4.2 TEST SOCIÁLNÍCH INTERAKCÍ (SIT)

Prenatální expozice MA. Prenatální expozice MA během ED 1-11 vedla u dospělých samců ke snížení času stráveného genitálním očicháváním. Prenatální expozice MA vedla k redukci motorické aktivity zvířat exponovaných během ED 1-11 a ED 12-22.

Neонатální expozice MA. Hlavní účinek neonatální přímé aplikace MA mláďatům s.c. byl nalezen u samic, které strávily méně času následováním se a vztyčováním v porovnání se skupinou samic neonatálně ovlivněnou fyziologických roztokem.

Akutní aplikace MA v dospělosti. Akutní aplikace v dospělosti vede k redukci sociálního chování a k posílení motorické aktivity zvířat.

Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu. Samice ze všech aplikačních skupin strávily více času sociálním chováním než samci. Samci strávili více času horizontální motorickou aktivitou, na druhou stranu samice strávily více času vertikální motorickou aktivitou. Samice v P/E strávily více času podlézáním se než samice v M/D a byly ve fázi P/E citlivější na akutní podání MA.

Vliv aplikační periody. Zvířata exponovaná MA během ED 12-22 a během PD 1-11 nepřímo a přímo strávila méně času vzájemným očicháváním a šplháním než zvířata exponovaná MA během ED 1-11. Zvířata exponovaná MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka strávila méně času genitálním očicháváním v porovnání se skupinou zvířat exponovaných MA během ED 1-11 a v porovnání se skupinou zvířat

exponovanou MA během PD 1-11 přímo s.c.. Signifikantně více času strávila zvířata ovlivněna MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka podlézáním se a následováním se ve srovnání se zvířaty exponovanými MA během ED 1-11, ED 12-22 a během PD 1-11 přímo s.c.. Zvířata exponována MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka strávila méně času vztyčováním než zvířata exponována MA během dalších aplikačních period.

4.3 TEST LABORAS

Prenatální expozice MA. Samice exponované MA během ED 1-11 vykazovaly redukci motorické aktivity.

Neonatální expozice MA. Samice MA/MA ze skupiny exponované nepřímo prostřednictvím mateřského mléka strávily více času lokomocí v porovnání s kontrolní skupinou samic S/MA. Interakce přímé neonatální expozice MA (PD 1-11) a akutní aplikace MA v dospělosti (MA/MA) byla zase nalezena u dospělých samců, kteří strávili více času vztyčováním v porovnání s kontrolní skupinou samců po akutní dávce drogy (S/MA).

Akutní aplikace MA v dospělosti. Akutní aplikace MA v dospělosti vedla ke zvýšení horizontální a vertikální aktivity u všech experimentálních skupin zvířat.

Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu. Samice byly aktivnější než samci, akutní aplikace MA v dospělosti mezipohlavní rozdíl v motorické aktivitě zdůraznila.

Vliv aplikační periody. U skupiny samců ovlivněných MA během ED 1-11 a skupiny samců ovlivněných MA během PD 1-11 (nepřímo a přímo) vedla prenatální a neonatální expozice drogou k výrazné redukci horizontální motorické aktivity a k posílení vertikální explorační aktivity v porovnání se skupinou samců exponovaných MA během ED 12-22.

4.4 TEST MORRISOVA VODNÍHO BLUDIŠTĚ (MWM)

Prenatální expozice MA. Prenatální expozice MA vedla ke zpomalení procesu učení u samic exponovaných během ED 1-11. V probe testu vedla prenatální expozice MA během ED 1-11 u samic k prodloužení latence. U skupiny zvířat exponovaných během ED 12-22 statistická analýza dat odhalila interakci prenatální expozice a akutní aplikace. Samci po prenatální expozici MA a akutní aplikaci S (MA/S) uplavali kratší vzdálenost a plavali rychleji v porovnání s kontrolní skupinou samců (S/S). V testu paměti vedla prenatální expozice drogou u samic exponovaných MA během ED 1-11 k prodloužení uplavané vzdálenosti a k prodloužení latence. U skupiny samců exponovaných během ED 12-22 vedla prenatální expozice MA ke zkrácení uplavané vzdálenosti ke skrytému ostrůvku.

Neonatální expozice MA. Neonatální expozice MA během PD 1-11 (nepřímo a přímo) zhoršila výsledky testu učení v dospělosti. V testu paměti vedla neonatální přímá expozice MA u samic k prodloužení uplavané vzdálenosti, k prodloužení latence a zpomalení v rychlosti plavání.

Akutní aplikace MA v dospělosti. Akutní aplikace MA v dospělosti neměla vliv na test učení. V probe testu samice ze skupiny exponované MA během ED 12-22 a akutně v dospělosti (MA/MA) dosahovaly delší latence v porovnání se samicemi MA/S. U skupiny zvířat exponovaných během rané laktální periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka vedla akutní aplikace drogy k zvýšení rychlosti plavání u samců bez ohledu na neonatální expozici. Samci po přímé expozici MA a akutní dávce drogy v dospělosti (MA/MA) dosahovali delší latence, samice MA/MA uplávaly delší vzdálenosti v porovnání se skupinami MA/S. V testu paměti vedla akutní aplikace MA u samců ze skupiny exponované během ED 12-22 ke zlepšení výsledků.

Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu. Samice dosahovaly horších výsledků v testu učení a paměti než samci, mezipohlavní rozdíly byly výraznější po prenatální a neonatální expozici MA.

Vliv aplikační periody. V testu učení měla nejvýznamnější negativní dopad expozice drogou během rané laktální periody přímou aplikací s.c.. V rámci porovnání vlivu prenatální/neonatální expozice MA na rychlost plavání vedla prenatální expozice MA během ED 12-22 a neonatální expozice MA během PD 1-11 přímo s.c. k výraznějšímu poklesu rychlosti plavání v porovnání s expozicí MA během ED 1-11 a během PD 1-11 nepřímo mateřským mlékem. V testu učení měla zásadnější negativní vliv prenatální expozice během ED 12-22 v porovnání s aplikací drogy během ED 1-11. Expozice MA během ED 12-22 vedla také k výraznějšímu zhoršení výsledků v testu paměti v porovnání s neonatální expozicí MA během PD 1-11 nepřímo.

5 DISKUZE

5.1 VLIV METAMFETAMINU NA BEHAVIORÁLNÍ TESTY

Výsledky testu CPP odhalily, že prenatalní ani neonatální expozice MA během různých stadií neuro-ontogenetického vývoje nevyvolává změny v aktivním vyhledávání drogy v dospělosti, na rozdíl od výsledků SIT, které ukázaly, že prenatalní a neonatální expozice MA v dávce 5 mg/ml/kg snižuje sociální kontakt mezi dvěma neznámými potkany a vede k redukci motorické aktivity v dospělosti. Výsledky testu Laboras poukazují na snížení motorické aktivity pouze u samic exponovaných MA během ED 1-11. Deficity v kognitivních funkcích po prenatalní/neonatální expozici MA se projeví u skupiny samic exponovaných během ED 1-11 a u samců i samic exponovaných během PD 1-11. Všechny naše zjištění o účinku prenatalní/neonatální expozici MA na chování zvířat dospělosti jsou v souladu s našimi předcházejícími studiemi (Šlamberová et al. 2011; Schutová et al. 2013; Macúchová, Nohejlová, and Šlamberová 2014) a se studiemi jiných autorů (Vorhees et al. 1994; Acuff-Smith et al. 1996).

V naší studii bylo dále prokázáno, že akutní aplikace MA v dávce 5 mg/ml/kg během fáze podmiňování v testu CPP vedla k vytvoření drogové závislosti. Akutní aplikace MA v dávce 1 mg/ml/kg, podávaná zvířatům testovaných v SIT, v Laboras testu a testu MWM, vedla k redukci sociálního chování a k posílení motorické aktivity zvířat. Tyto výsledky odpovídají předchozím studiím (Gehrke et al. 2003; Šlamberová et al. 2011; Schutová et al. 2013). Příčinou zvýšené motorické aktivity jsou dle studie Kelly, Seviour, and Iversen (1975) změny v meso-limbickém dopaminergním systému po podání akutní drogy. Akutní aplikace MA neměla vliv na proces učení a probe test, u skupiny zvířat exponovaných během ED 12-22 vedla ke zkrácení uplavané vzdálenosti, chyby hledání a latence v testu paměti. Existují studie, které jsou v souladu s prezentovanými výsledky, co dokazuje, že aplikace MA v dospělosti nevyvolává změny v schopnosti naučit se polohu skrytého ostrůvku a při nižších dávkách může vést dokonce k zlepšení kognitivních funkcí (Belcher et al. 2008; Simoes et al. 2007).

Další výsledky naší studie odhalily, že samci jsou aktivnější ve vyhledávání drogy v testu CPP než samice. Naopak, samice byly aktivnější v testu SIT a testu Laboras. Výsledky MWM také odhalily, že samice dosahovaly horších výsledků v kognitivních úlohách než samci. Mezipohlavní rozdíly v chování ještě zdůraznila expozice MA během různých neuro-ontogenetických stadií a také aplikace MA v dospělosti. Pohlavní rozdíly v chování pravděpodobně souvisejí s pohlavními rozdíly v neuroanatomii neuronové sítě pro sociální

chování, kognici, lokomoci, které se vyvíjí během druhé poloviny gestace do prvních tří týdnů postnatálně (Gentry et al. 2004; Schutová et al. 2013).

5.2 VLIV NEPŘÍMÉ A PŘÍMÉ EXPOZICE METAMFETAMINU V PRŮBĚHU NEONATÁLNÍHO OBDOBÍ

Při porovnání míry vlivu neonatální expozice MA na chování dospělých zvířat, podávané dvěma způsoby, nepřímo prostřednictvím mateřského mléka a přímo subkutánně mláďatům během PD 1-11 jsme zjistili, že zásadnější vliv na chování exponovaných zvířat má přímá expozice MA s.c. Výsledky naší práce lze porovnat pouze s jednou studií z naší laboratoře, se studií Ševčíkové *et al.* (2017), která použila stejný design neonatální expozice MA během PD 1-11, pomocí kterého testovala účinek neonatální expozice na mateřské chování a somatosenzorický vývoj mláďat v rozmezí PD 1-23. Tato práce ukázala, že zásadnější negativní dopad na somatosenzorický vývoj mláďat měla neonatální nepřímá expozice MA prostřednictvím mateřského mléka. Na základě všech získaných závěrů studie Ševčíkové *et al.* (2017) lze říct, že výraznější vliv na časný postnatální vývoj mláďat může mít spíše mateřská péče než samotný účinek drogy. Jedním z našich předpokladů, proč má výraznější negativní účinek na chování dospělých zvířat neonatální přímá expozice MA subkutánně v porovnání s nepřímou expozicí prostřednictvím mateřského mléka je, že účinek neonatální expozice přímo vpichem má okamžitý účinek na mládě a nepodléhá biodegradacnímu mechanismu v těle matky, jak je to při přenosu účinku prostřednictvím mateřského mléka. Poločas rozpadu MA u potkanů představuje přibližně 70 minut (Melega et al. 2007; Cho et al. 2001). V tomto čase matky, kterým byla aplikovaná droga, vynakládají více energie na péči o sebe a věnují menší pozornost mateřským aktivitám. Navíc dávka MA 5 mg/ml/kg vede k vytváření stereotypních forem chování, matka pobíhá po kleci, čistí se mimo hnízdo, mláďata během prvních dní po porodu nemají šanci se přisát, dokud účinek drogy u matky nevyvymizí. To by mohlo znamenat, že jsou vystaveny účinkům MA v nižších dávkách než mláďata exponovaná drogou injekčně. Navíc mechanismus účinku MA při nepřímé expozici prostřednictvím mateřského mléka probíhá pomalým vstřebáváním z gastrointestinálního traktu mláděte. Na to, abychom mohli lépe vysvětlit nejenom behaviorální následky vlivu neonatální expozice MA během PD 1-11, ale také míru přenosu MA po nepřímé a přímé aplikaci drogy, bude potřeba udělat doplňující experimenty, které budou zkoumat koncentrace MA v mozku a séru mláďat, stejně jako v mateřském mléce po nepřímé a přímé expozici MA.

5.3 KRITICKÉ VÝVOJOVÉ PERIODY PRO ÚČINKY METAMFETAMINU NA CHOVÁNÍ ZVÍŘAT V DOSPĚLOSTI

Výsledky této studie potvrdily naši hypotézu, že negativní účinky aplikace MA matkám na jejich potomstvo se budou lišit v závislosti na době aplikace. Zvířata exponovaná MA během ED 12-22 a PD 1-11, což odpovídá druhé polovině druhého trimestru a třetímu trimestru prenatálního vývoje u lidí, dosahovala v dospělosti ve všech testech významnější deficit v chování než aplikace drogy během ED 1-11 u potkanů, což odpovídá prvnímu trimestru a první polovině druhého trimestru u lidí. Proč je tomu tak? Je dobře známo, že MA zprostředkovává svůj účinek na CNS působením na monoaminy, jejich transportéry a receptory v dané oblasti mozku, charakteristické pro zprostředkování určité formy chování (Rothman et al. 2001; Kish et al. 2008). Experimentální studie s použitím různých technik odhalily, že meso-limbická dopaminová dráha, přestupující strukturami jako např. nucleus accumbens, dorsomediální a dorsolaterální striatum, bazální ganglia, hraje významnou roli v odpovědi organismu na užití drogy, ve vzniku drogové závislosti a v motorické aktivitě (Belin and Everitt 2008). Další struktury zapojené do neuronálního okruhu dopaminové dráhy, ventrální tegmentální oblast, mediální prefrontální kůra a amygdala, hrají důležitou roli nejenom ve vzniku drogové závislosti, ale také v sociálním chování, v utváření paměťové stopy (Rice and Barone 2000b). Pyramidové neurony CA1 a CA3 septální části hipokampu, tzv. „place cells“ představují místo, kde dochází ke zpracování informací o prostoru, k prostorové navigaci a vytvoření kognitivní mapy (Moser, Kropff, and Moser 2008). U potkanů probíhá neurogeneze nejvíce v kortikální a subkortikální oblasti v ED 9,5 až PD 15, u lidí probíhá kortikální neurogeneze až do 2,5 roku života (Semple et al. 2013). Striatum (putamen, caudatus), nucleus accumbens, bazální ganglia se začínají formovat během ED 12-13 u potkana, 5. -7. týden gestace u člověka. Neurogeneze hipokampu, amygdaly a limbického systému probíhá u potkana od ED 14 (Iaria et al. 2003; Rice and Barone 2000b). Vrchol regionální neurogeneze probíhá přibližně v polovině gestačního období potkanů (ED 14-15). Od tohoto období se postupně začínají objevovat první neurotransmiterové buňky (Rice and Barone 2000b; Andersen 2003). Vytváření synaptických spojení probíhá u potkanů během ED 18 až PD 19-21, u člověka 34. -36. týden gestace (Andersen 2003; Workman et al. 2013). Akumulace dopaminu, vyvolaná působením MA v těchto oblastech mozku, zvyšuje tvorbu volných kyslíkových radikálů a destrukci mitochondrií, což vede k poškození monoaminových nervových zakončení (Jablonski, Williams, and Vorhees 2015; Jablonski et al. 2016; Ricaurte, Seiden, and Schuster 1984). Bylo prokázáno, že prenatální a neonatální expozice narušuje vývoj mozku plodu tím, že narušuje dráhy signální transdukce, syntézu

proteinů až samotnou DNA. Tyto účinky vedou k dlouhodobým neurobehaviorálním deficitům, které se mohou projevit později v životě (Chang et al. 2004; Chang et al. 2009; Davidson et al. 2001; Ricaurte, Seiden, and Schuster 1984; Seiden et al. 1993).

6 ZÁVĚRY

Z našich výsledků vyplývají následující závěry:

➤ **prenatální a neonatální expozice MA**

- a) neovlivnily aktivní vyhledávání drogy v dospělosti (CPP)
- b) redukovaly sociální chování a motorickou aktivitu (SIT)
- c) neovlivnily výsledky testu Laboras
- d) prenatální expozice MA během ED 1-11 a neonatální expozice MA během EPD 1-11 vedly k deficitům v testu učení a paměti

➤ **akutní aplikace MA v dospělosti**

- a) vedla k vytvoření drogové závislosti v testu CPP
- b) snížila sociální chování a zvýšila motorickou aktivitu v testu SIT
- c) zvýšila motorickou aktivitu v testu Laboras
- d) neovlivnila test učení, zatímco vedla ke zlepšení výsledků testu paměti u zvířat exponovaných během ED 12-22
- e) zvýšila rychlost plavání u samců během fáze učení

➤ **pohlaví a fáze estrálního cyklu**

- a) samci strávili více času v komorách asociovaných s aplikací drogy (CPP)
- b) samice strávily více času sociálním chováním, samci strávili více času horizontální motorickou aktivitou než samice, zatímco samice strávily více času vertikální motorickou aktivitou než samci (SIT)
- c) samice v P/E strávily více času sociálním chováním než samice v M/D a byly citlivější na akutní podání MA ve fázi P/E (SIT)
- d) samice byly aktivnější než samci a akutní aplikace MA v dospělosti mezipohlavní rozdíly v motorické aktivitě zvýraznila (Laboras)
- e) samice dosahovaly horších výsledků v testu učení a paměti než samci, navíc tyto mezipohlavní rozdíly byly výraznější po prenatální a neonatální expozici MA (MWM)

- **nepřímá a přímá expozice MA v průběhu neonatálního období**
 - a) neonatální přímá expozice MA měla zásadnější dopad na chování zvířat v dospělosti
- **kritické vývojové periody pro účinky MA na chování zvířat v dospělosti**
 - a) kritickou vývojovou periodou pro účinky MA na vznik drogové závislosti a motorickou aktivitu je perioda neonatální expozice během PD 1-11
 - b) kritickou vývojovou periodou pro účinky MA na sociální chování a kognitivní funkce jsou periody prenatální expozice během ED 12-22 a neonatální expozice během PD 1-11

Hlavním cílem mé disertační práce bylo zjistit, která z expozicí MA, vystavených během různých neuro-ontogenetických stadií potkanů, má zásadnější vliv na jejich chování v dospělosti a určit tak kritickou vývojovou periodu pro účinky této drogy. Na základě všech našich zjištění jsme dospěli k závěru, že kritickou vývojovou periodou pro účinky MA na chování zvířat v dospělosti je druhá polovina prenatálního vývoje a časné postnatální období u laboratorního potkana, což odpovídá přibližně druhému a třetímu trimestru prenatálního vývoje u lidí. Naše práce přispěje k objasnění mechanismů vzniku drogové závislosti a jejich negativních následků na vyvíjející se potomstvo. Naše výsledky prohloubí dosavadní poznatky o účincích MA na vyvíjející se mozek během prenatálního a časné postnatálního vývoje. Tyto poznatky mohou být využity pro vytvoření preventivních programů a strategických postupů při léčbě drogové závislosti u těhotných žen. Určení kritického období pro účinky MA může přispět k upřesnění načasování vysazení drog u těhotných žen a docílit tak minimální zásah drogy do vývoje CNS potomků těchto žen.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Acuff-Smith, KD, M George, SA Lorens, and CV Vorhees. 1996. 'Preliminary evidence for methamphetamine-induced behavioral and ocular effects in rat offspring following exposure during early organogenesis', *Psychopharmacology (Berl)*, 109: 255-63.
2. Andersen, S. L. 2003. 'Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity?', *Neurosci Biobehav Rev*, 27: 3-18.
3. Belcher, A. M., E. M. Feinstein, S. J. O'Dell, and J. F. Marshall. 2008. 'Methamphetamine influences on recognition memory: comparison of escalating and single-day dosing regimens', *Neuropsychopharmacology*, 33: 1453-63.

4. Belin, D., and B. J. Everitt. 2008. 'Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum', *Neuron*, 57: 432-41.
5. Clancy, B., B. L. Finlay, R. B. Darlington, and K. J. Anand. 2007. 'Extrapolating brain development from experimental species to humans', *Neurotoxicology*, 28: 931-7.
6. Dattel, B. J. 1990. 'Substance abuse in pregnancy', *Semin Perinatol*, 14: 179-87.
7. Davidson, C., A. J. Gow, T. H. Lee, and E. H. Ellinwood. 2001. 'Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment', *Brain Research Reviews*, 36: 1-22.
8. Della Grotta, S., L. L. LaGasse, A. M. Arria, C. Derauf, P. Grant, L. M. Smith, R. Shah, M. Huestis, J. Liu, and B. M. Lester. 2010. 'Patterns of methamphetamine use during pregnancy: results from the Infant Development, Environment, and Lifestyle (IDEAL) Study.', *Matern Child Health J*, 14: 519-27.
9. Dixon, S. D., and A. Oro. 1987. 'Cocaine and Amphetamine Exposure in Neonates - Perinatal Consequences', *Pediatric Research*, 21: A359-A59.
10. Eriksson, M, G Larsson, B Winbladh, and R Zetterstrom. 1978. 'The influence of amphetamine addiction on pregnancy and the newborn infant', *Acta Paediatr Scand*, 67: 95-99.
11. Gehrke, B. J., S. B. Harrod, W. A. Cass, and M. T. Bardo. 2003. 'The effect of neurotoxic doses of methamphetamine on methamphetamine-conditioned place preference in rats', *Psychopharmacology (Berl)*, 166: 249-57.
12. Gentry, W. B., A. U. Ghafour, W. D. Wessinger, E. M. Laurenzana, H. P. Hendrickson, and S. M. Owens. 2004. '(+)-Methamphetamine-induced spontaneous behavior in rats depends on route of (+)METH administration', *Pharmacol Biochem Behav*, 79: 751-60.
13. Chang, L., C. Cloak, C. S. Jiang, S. Farnham, B. Tokeshi, S. Buchthal, B. Hedemark, L. M. Smith, and T. Ernst. 2009. 'Altered neurometabolites and motor integration in children exposed to methamphetamine in utero', *Neuroimage*, 48: 391-7.
14. Chang, L., L. M. Smith, C. LoPresti, M. L. Yonekura, J. Kuo, I. Walot, and T. Ernst. 2004. 'Smaller subcortical volumes and cognitive deficits in children with prenatal methamphetamine exposure', *Psychiatry Research-Neuroimaging*, 132: 95-106.
15. Cho, A. K., W. P. Melega, R. Kuczenski, and D. S. Segal. 2001. 'Relevance of pharmacokinetic parameters in animal models of methamphetamine abuse', *Synapse*, 39: 161-6.
16. Iaria, G., M. Petrides, A. Dagher, B. Pike, and V. D. Bohbot. 2003. 'Cognitive strategies dependent on the hippocampus and caudate nucleus in human navigation: variability and change with practice', *Journal of Neuroscience*, 23: 5945-52.
17. Jablonski, S. A., D. L. Graham, C. V. Vorhees, and M. T. Williams. 2016. 'Effects of Neonatal Methamphetamine and Stress on Brain Monoamines and Corticosterone in Prewanling Rats', *Neurotox Res*, 31: 269-82.
18. Jablonski, S. A., M. T. Williams, and C. V. Vorhees. 2015. 'Neurobehavioral Effects from Developmental Methamphetamine Exposure', *Curr Top Behav Neurosci*.
19. Kelly, P. H., P. W. Seviour, and S. D. Iversen. 1975. 'Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum', *Brain Res*, 94: 507-22.
20. Kish, S. J., J. Tong, O. Hornykiewicz, A. Rajput, L. J. Chang, M. Guttman, and Y. Furukawa. 2008. 'Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease', *Brain*, 131: 120-31.

21. Macúchová, E., K. Nohejlová, and R. Šlamberová. 2014. 'Gender differences in the effect of adult amphetamine on cognitive functions of rats prenatally exposed to methamphetamine', *Behav Brain Res*, 270: 8-17.
22. Marwick, C. 2000. 'NIDA seeking data on effect of fetal exposure to methamphetamine', *JAMA*, 283: 2225-6.
23. Melega, W. P., A. K. Cho, D. Harvey, and G. Lacan. 2007. 'Methamphetamine blood concentrations in human abusers: application to pharmacokinetic modeling', *Synapse*, 61: 216-20.
24. Moser, E. I., E. Kropff, and M. B. Moser. 2008. 'Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system', *Annu Rev Neurosci*, 31: 69-89.
25. Nordahl, T. E., R. Salo, and M. Leamon. 2003. 'Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review', *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 15: 317-25.
26. Oro, A. S., and S. D. Dixon. 1987. 'Perinatal Cocaine and Methamphetamine Exposure - Maternal and Neonatal Correlates', *Journal of Pediatrics*, 111: 571-78.
27. Plessinger, M. A. 1998. 'Prenatal exposure to amphetamines - Risks and adverse outcomes in pregnancy', *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 25: 119-130.
28. Ricaurte, G. A., L. S. Seiden, and C. R. Schuster. 1984. 'Further Evidence That Amphetamines Produce Long-Lasting Dopamine Neurochemical Deficits by Destroying Dopamine Nerve-Fibers', *Brain Research*, 303: 359-64.
29. Rice, D., and S. Barone, Jr. 2000a. 'Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models', *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 3: 511-33.
30. Robinson, T. E., and J. B. Becker. 1986. 'Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis', *Brain Res*, 396: 157-98.
31. Rothman, R. B., M. H. Baumann, C. M. Dersch, D. V. Romero, K. C. Rice, F. I. Carroll, and J. S. Partilla. 2001. 'Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin', *Synapse*, 39: 32-41.
32. Seiden, L. S., W. L. Woolverton, S. A. Lorens, J. E. Williams, R. L. Corwin, N. Hata, and M. Olimski. 1993. 'Behavioral consequences of partial monoamine depletion in the CNS after methamphetamine-like drugs: the conflict between pharmacology and toxicology', *NIDA Res Monogr*, 136: 34-46; discussion 46-52.
33. Semple, B. D., K. Blomgren, K. Gimlin, D. M. Ferriero, and L. J. Noble-Haeusslein. 2013. 'Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species', *Prog Neurobiol*, 106-107: 1-16.
34. Schutová, B., L. Hrubá, R. Rokyta, and R. Šlamberová. 2013. 'Gender differences in behavioral changes elicited by prenatal methamphetamine exposure and application of the same drug in adulthood', *Dev Psychobiol*, 55: 232-42.
35. Simoes, P. F., A. P. Silva, F. C. Pereira, E. Marques, S. Grade, N. Milhazes, F. Borges, C. F. Ribeiro, and T. R. Macedo. 2007. 'Methamphetamine induces alterations on hippocampal NMDA and AMPA receptor subunit levels and impairs spatial working memory', *Neuroscience*, 150: 433-41.
36. Smith, L. M., L. Chang, M. L. Yonekura, C. Grob, D. Osborn, and T. Ernst. 2001. 'Brain proton magnetic resonance spectroscopy in children exposed to methamphetamine in utero', *Neurology*, 57: 255-60.

37. Ševčíková, M., I. Hřebíčková, E. Macúchová, and R. Šlamberová. 2017. 'The influence of methamphetamine on maternal behavior and development of the pups during the neonatal period', *Int J Dev Neurosci*, 59: 37-46.
38. Šlamberová, R., B. Schutová, L. Hrubá, and M. Pometlová. 2011. 'Does prenatal methamphetamine exposure affect the drug-seeking behavior of adult male rats?', *Behav Brain Res*, 224: 80-86.
39. Vorhees, C. V., K. G. Ahrens, K. D. Acuff-Smith, M. A. Schilling, and J. E. Fisher. 1994. 'Methamphetamine exposure during early postnatal development in rats: II. Hypoactivity and altered responses to pharmacological challenge', *Psychopharmacology (Berl)*, 114: 402-8.
40. Whitaker-Azmitia, P. M. 1991. 'Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology', *Pharmacol Rev*, 43: 553-61.
41. Wilcox, R. A., T. E. Robinson, and J. B. Becker. 1986. 'Enduring enhancement in amphetamine-stimulated striatal dopamine release in vitro produced by prior exposure to amphetamine or stress in vivo', *Eur J Pharmacol*, 124: 375-6.
42. Williams, M. T., T. L. Blankenmeyer, T. L. Schaefer, C. A. Brown, G. A. Gudelsky, and C. V. Vorhees. 2003. 'Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure in rats on spatial learning in the Barnes maze and on cliff avoidance, corticosterone release, and neurotoxicity in adulthood', *Brain Res Dev Brain Res*, 147: 163-75.
43. Williams, M. T., M. S. Moran, and C. V. Vorhees. 2003. 'Refining the critical period for methamphetamine-induced spatial deficits in the Morris water maze', *Psychopharmacology (Berl)*, 168: 329-38.
44. Williams, M. T., L. L. Morford, S. L. Wood, T. L. Wallace, M. Fukumura, H. W. Broening, and C. V. Vorhees. 2003. 'Developmental D-methamphetamine treatment selectively induces spatial navigation impairments in reference memory in the Morris water maze while sparing working memory', *Synapse*, 48: 138-48.
45. Workman, A. D., C. J. Charvet, B. Clancy, R. B. Darlington, and B. L. Finlay. 2013. 'Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species', *Journal of Neuroscience*, 33: 7368-83.
46. Zheng, D., and D. Purves. 1995. 'Effects of increased neural activity on brain growth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 1802-6.

8 PUBLIKACE AUTORA

8.1 PUBLIKACE IN EXTENSO S IMPAKT FAKTOREM, KTERÉ JSOU PODKLADEM DISERTACE

1. **Hřebíčková I.**, Malinová-Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Exposure to methamphetamine during 1st and 2nd half of prenatal period and its consequences on cognition after long-term application in adulthood. *Physiol. Res.* 63(Suppl. 4): 535-545, 2014, **IF 1,487**.
2. Malinová-Ševčíková M., **Hřebíčková I.**, Macúchová E., Nová E., Pometlová M., Šlamberová R.: Differences in maternal behavior and development of their pups

depend on the time of methamphetamine exposure during gestation period. *Physiol Res*, 63(4): 559-572, 2014, **IF 1,487**.

3. **Hřebíčková I.**, Ševčíková M., Nohejlová K., Šlamberová R.: Does effect from developmental methamphetamine exposure on spatial learning and memory depend on stage of neuroontogeny? *Physiol. Res.* 65 (Suppl. 5): S577-S589, 2016, **IF 1,487**.
4. **Hřebíčková I.**, Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: How methamphetamine exposure during different neurodevelopmental stages affects social behavior of adult rats? *Physiol. and Beh.* 179: 391-400, 2017, **IF 2,461**.
5. Ševčíková M., **Hřebíčková I.**, Macúchová E., Šlamberová R.: The influence of methamphetamine on maternal behavior and development of the pups during the neonatal period. *Int Journal Dev Neurosc*, 59: 37-46, 2017, **IF 2,046**.

8.2 PUBLIKACE IN EXTENSO S IMPAKT FAKTOREM BEZ VZTAHU K TÉMATU DISERTACE

1. Šlamberová R., Mikulecká A., Macúchová E., **Hřebíčková I.**, Ševčíková M., Nohejlová K., Pometlová M.: Effects of psychostimulants on social interaction of adult male rats. *Behav Pharmacol*, 2015, **IF 2,218**.
2. Macúchová E., Ševčíková M., **Hřebíčková I.**, Nohejlová K., Šlamberová R.: How various drugs affect anxiety-related behavior in male and female rats prenatally exposed to methamphetamine. *Int J Devl Neuroscience*, 51: 1-11, 2016, **IF 2,046**.
3. Macúchová E., Nohejlová K., Ševčíková M., **Hřebíčková I.**, Šlamberová R.: Sex differences in the strategies of spatial learning in prenatally-exposed rats treated with various drugs in adulthood. *Behav Brain Res*, 327: 83-93, 2017, **IF 3,002**.
4. Holubová A., Ševčíková M., Macúchová E., **Hřebíčková I.**, Pometlová M., Šlamberová R.: Effects of Perinatal Stress and Drug Abuse on Maternal Behavior and Sensorimotor Development of Affected Progeny. *Physiol. Res.* 66 (Suppl. 4): S481-S491, 2017, **IF 1,461**.