Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Praha

Ústav normální, patologické a klinické fyziologie

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

Mgr. Ivana Hrebíčková

Disertační práce

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

Praha 2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení: Mgr. Ivana Hrebíčková

Název disertační práce: Určení kritické vývojové periody pro účinky metamfetaminu na chování laboratorního potkana v dospělosti.

Název disertační práce anglicky: Determination of critical developmental periods for effects of methamphetamine on rat behavior in adulthood.

Školící pracoviště: Ústav normální, patologické a klinické fyziologie 3. LF UK

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

Obor postgraduálního doktorského studia biomedicíny: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Práce vznikla v letech 2012-2018 v rámci doktorského studia biomedicíny na 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy a byla odevzdána dne 20.03.2018.

Prohlášení

Prohlašuji, že v disertační práci jsou použita originální data ze studie provedené v rámci postgraduálního studia na Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie 3. LF UK.

Disertační práce byla podpořena z finančních zdrojů Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK 706216), výzkumným projektem Univerzity Karlovy Progres Q 35 a Specifickým výzkumným projektem Univerzity Karlovy 260388/SVV/2018.

Prohlašuji, že jsem na této disertační práci pracovala samostatně a že jsem nepoužila jiné zdroje a literaturu než ty, které jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Praze dne 20.3.2018

Mgr. Ivana Hrebíčková

Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Především své školitelce prof. MUDr. Romaně Šlamberové, Ph.D., za její odborné vedení, všestrannou pomoc, cenné rady a věnovaný čas během celého postgraduálního studia. Dále bych chtěla poděkovat svým kolegyním Mgr. Márii Ševčíkové a RNDr. Evě Macúchové, Ph.D., za spolupráci na experimentech a MUDr. Kateryně Nohejlové, Ph.D. za zaškolení do jednotlivých metodik a pomoc s experimenty v Morrisově vodním bludišti.

Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za jejich podporu.

Seznam zkratek

♂	samci
♀	samice
AMP	amfetamin
ANOVA	statistická analýza rozptylu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CART	„cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript“
CNS	centrální nervová soustava
CPP	test podmíněného vyhledávání drogy
ČR	Česká republika
D1-D5	dopaminové receptory 1-5
DAT	dopaminový transportér
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ED	embryonální den
F	stupeň volnosti
EMCDDA	Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost
GD	gestační den
HCl	chlorovodíková kyselina
HIV	„Human Immunodeficiency Virus“
J	jih
MA	metamfetamin
M/D	metestrus/diestrus
MWM	test Morrisova vodního bludiště
n	počet zvířat na skupinu
NAT	noradrenalinový transportér
PD	postnatální den
P/E	proestrus/estrus
S	fyziologický roztok, sham, sever
s.c.	subkutánně
SERT	serotoninový transportér
SIT	test sociálních interakcí
SR	Slovenská republika

UNODC	Úřad Organizace Spojených národů pro drogy a kriminalitu
V	východ
VMAT2	vezikulární transportér monoaminů
Z	západ

Abstrakt

Cíl: 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. V experimentální části studie byl testován vliv prenatální a neonatální expozice MA na chování, sociální interakce, kognitivní funkce a aktivní vyhledávání drog v dospělosti.

Metodika: 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 časné laktace (PD 1-11). Účinek prenatální expozice MA se na mláďata přenášel transplacentárně; účinek expozice během časné laktace se na mláďata přenášel prostřednictvím mateřského mléka. Na to, abychom mohli porovnat míru přenosu účinku nepřímé expozice MA prostřednictvím mateřského mléka, zvolili jsme si další skupinu mláďat, kterým jsme během stejné aplikační periody (PD 1-11) aplikovali testované látky přímo subkutánně. Tímto způsobem jsme získali 8 skupin exponovaných mláďat: ED 1-11 MA, S; ED 12-22 MA, S; PD 1-11 nepřímo MA, S; PD 1-11 přímo MA, S. 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: 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) vedla 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 rozdíly 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.

Závěr: 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.

Abstract

Aim: 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. In the experimental part of the study was to test the influence of prenatal and neonatal MA exposure on behavior, social interaction, cognition and drug-seeking behavior in adulthood.

Methods: 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). The effect of prenatal MA exposure was transmitted to pups via placental barrier; the effect of MA exposure during early lactation was transmitted via the breast milk. In order to compare the rate of drug transmission by indirect MA exposure via the breast milk, we chose another group of offspring that we administered the tested substances directly subcutaneously during the same application period (PD 1-11). In this way we obtained 8 groups of exposed pups: ED 1-11 MA, S; ED 12-22 MA, S; PD 1-11 indirectly MA, S; PD 1-11 directly MA, S. 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.

Results: 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.

Conclusion: 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.

OBSAH

Bibliografická identifikace ii
Prohlášení iii
Poděkování iv
Seznam zkratek v
Abstrakt vii
Abstract ix
1 KRITICKÉ VÝVOJOVÉ PERIODY A ONTOGENEZE NERVOVÉHO SYSTÉMU 1
1.1 TEORIE KRITICKÝCH VÝVOJOVÝCH PERIOD 1
1.2 ONTOGENEZE NERVOVÉHO SYSTÉMU 2
1.2.1 Paralely v neuro-ontogenezi člověka a laboratorního potkana 3
2 METAMFETAMIN 10
2.1 SOUČASNÁ SITUACE ZNEUŽÍVÁNÍ DROG 10
2.2 MECHANISMUS ÚČINKU 11
2.2.1 Farmakokinetika 11
2.2.2 Farmakodynamika 12
2.2.3 Pohlavní rozdíly v mechanismu účinku MA 14
2.3 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY METAMFETAMINU 14
2.3.1 Orální a dermatologické účinky 14
2.3.2 Kardiovaskulární, pulmonální a jaterní účinky 15
2.3.3 Močopohlavní a hematologické účinky 15
2.3.4 Účinky na CNS 16
2.3.4.1 Neurotoxicita 16
2.4 PRENATÁLNÍ EXPOZICE METAMFETAMINU 18
2.4.1 Klinické studie 19
2.4.2 Experimentální studie 19
2.5 NEONATÁLNÍ EXPOZICE METAMFETAMINU 21
2.5.2 Klinické studie 22
2.5.1 Experimentální studie 23
2.6 AKUTNÍ METAMFETAMIN PODÁVANÝ V DOSPĚLOSTI 24
3 HYPOTÉZA 26
4 CÍLE PRÁCE 27
5 MATERIÁL A METODIKA 28
5.1 CHOV LABORATORNÍCH ZVÍŘAT 28

5.2 FERTILIZACE ... 28
5.3 PRENATÁLNÍ A POSTNATÁLNÍ PÉČE ... 28
5.4 APLIKACE V DOSPĚLOSTI ... 32
5.5 FÁZE ESTRÁLNÍHO CYKLU ... 33
5.6 EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY ... 34
5.7 BEHAVIORÁLNÍ TESTY ... 38
5.7.1 Test podmíněného vyhledávání drogy (CPP) ... 38
5.7.2 Test sociálních interakcí (SIT) ... 39
5.7.3 Test Laboras ... 40
5.7.4 Test Morrisova vodního bludiště (MWM) ... 41
5.7.4.1 Učení ... 42
5.7.4.2 Probe test ... 43
5.7.4.3 Test paměti ... 43
5.7.4.4 Hodnocené parametry v testu MWM ... 43
5.8 STATISTICKÁ ANALÝZA DAT ... 44
6 VÝSLEDKY ... 46
6.1 TEST PODMÍNĚNÉHO VYHLEDÁVÁNÍ DROGY (CPP) ... 46
6.1.1 Vliv prenatální expozice MA ... 46
6.1.2 Vliv neonatální expozice MA ... 46
6.1.3 Vliv podmiňování MA v dospělosti ... 46
6.1.4 Vliv pohlaví ... 46
6.1.5 Vliv aplikační periody ... 49
6.2 TEST SOCIÁLNÍCH INTERAKCÍ (SIT) ... 50
6.2.1 Sociální interakce ... 50
6.2.1.1 Vliv prenatální expozice MA ... 50
6.2.1.2 Vliv neonatální expozice MA ... 50
6.2.1.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti ... 50
6.2.1.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu ... 51
6.2.1.5 Vliv aplikační periody ... 57
6.2.2 Nesociální aktivity ... 58
6.2.2.1 Vliv prenatální expozice MA ... 58
6.2.2.2 Vliv neonatální expozice MA ... 58
6.2.2.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti ... 58
6.2.2.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu ... 58
6.2.2.5 Vliv aplikační periody ... 62
6.3 TEST LABORAS ... 63

6.3.1 Vliv prenatální expozice MA ... 63
6.3.2 Vliv neonatální expozice MA ... 63
6.3.3 Vliv akutní dávky MA v dospělosti ... 66
6.3.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu ... 67
4.3.5 Vliv aplikační periody ... 71
6.4 TEST MORRISOVA VODNÍHO BLUDIŠTĚ (MWM) ... 72
6.4.1 Učení ... 72
6.4.1.1 Vliv prenatální expozice MA ... 72
6.4.1.2 Vliv neonatální expozice MA ... 72
6.4.1.3 Vliv akutní dávky MA v dospělosti ... 73
6.4.1.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu ... 73
6.4.1.5 Vliv aplikační periody ... 77
6.4.2 Probe test ... 78
6.4.2.1 Vliv prenatální expozice MA ... 78
6.4.2.2 Vliv neonatální expozice MA ... 78
6.4.2.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti ... 78
6.4.2.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu ... 79
6.4.2.5 Vliv aplikační periody ... 80
6.4.3 Test paměti ... 80
6.4.3.1 Vliv prenatální expozice MA ... 80
6.4.3.2 Vliv neonatální expozice MA ... 80
6.4.3.3 Vliv akutní dávky MA v dospělosti ... 81
6.4.3.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu ... 81
6.4.3.5 Vliv aplikační periody ... 85
6.4.4 Strategie hledání ostrůvku ... 86
6.4.4.1 Vliv prenatální expozice MA ... 86
6.4.4.2 Vliv neonatální expozice MA ... 86
6.4.4.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti ... 86
6.4.4.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu ... 87
6.4.4.5 Vliv aplikační periody ... 87
7 DISKUZE ... 89
7.1 VLIV METAMFETAMINU NA BEHAVIORÁLNÍ TESTY ... 89
7.1.2 Test podmíněného vyhledávání drogy (CPP) ... 89
7.1.2 Test sociálních interakcí (SIT) ... 91
7.1.3 Test Laboras ... 95
7.1.4 Test Morrisova vodního bludiště (MWM) ... 97

7.2 VLIV NEPŘÍMÉ A PŘÍMÉ EXPOZICE METAMFETAMINU V PRŮBĚHU NEONATÁLNÍHO OBDOBÍ 103
7.3 KRITICKÉ VÝVOJOVÉ PERIODY PRO ÚČINKY METAMFETAMINU NA CHOVÁNÍ ZVÍŘAT V DOSPĚLOSTI 106
8 ZÁVĚR 109
8.1 VLIV METAMFETAMINU NA BEHAVIORÁLNÍ TESTY 109
8.1.1 Test podmíněného vyhledávání drogy (CPP) 109
8.1.2 Test sociálních interakcí (SIT) 109
8.1.3 Test Laboras 109
8.1.4 Test Morrisova vodního bludiště (MWM) 110
8.2 VLIV NEPŘÍMÉ A PŘÍMÉ EXPOZICE METAMFETAMINU V PRŮBĚHU NEONATÁLNÍHO OBDOBÍ 110
8.3 KRITICKÉ VÝVOJOVÉ PERIODY PRO ÚČINKY METAMFETAMINU NA CHOVÁNÍ ZVÍŘAT V DOSPĚLOSTI 111
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 113
10 PUBLIKACE A PREZENTACE AUTORA 136
10.1 PUBLIKACE IN EXTENSO 136
10.2 PREZENTACE A ABSTRAKTA 137

1 KRITICKÉ VÝVOJOVÉ PERIODY A ONTOGENEZE NERVOVÉHO SYSTÉMU

1.1 TEORIE KRITICKÝCH VÝVOJOVÝCH PERIOD

Pojem „kritická vývojová perioda“ se vyskytuje v experimentální psychologii už od roku 1921 a představuje dočasné přerušení vývojového procesu v některých stadiích embryogeneze, které mohou vést k vážným důsledkům (Stockard 1920-1921). Autor prvotní teorie dále vyslovil názor, že význam rychlosti vývoje není omezen na embryogenezi, ale týká se i postnatální ontogeneze (Křeček 1973; Stockard 1920-1921). Na jeho hypotézu později navázal Scott (1962), podle kterého postnatální vývoj a růst závisí na organizujících procesích, které se dají ovlivnit, jen pokud probíhají, tj. v průběhu kritických vývojových period. Grobstein (1970) vyjadřuje kritické vývojové periody jako existence etap, v jejichž průběhu je vývojový proces určitým způsobem citlivý vůči faktorům prostředí.

Ve druhé polovině 20. století se ve svých studiích ontogenetické fyziologie pokusil také Křeček (1973) hledat kritéria pro posouzení, zda určité věkové období může představovat kritickou vývojovou periodu a zda lze v daném věkovém úseku vnějším zásahem navodit vývojové změny trvalého charakteru (Křeček 1962; Křeček 1967; Křeček 1971). Dle jeho teorie se tyto změny nemusí objevit bezprostředně po zásahu, ale mezi uplatněním podnětu a vznikem pozorovatelné změny může uplynout určitý čas. Kritické periody mohou trvat určitou dobu a nenastávají pro všechny funkce současně. Pro vznik některých funkcí jich může být i několik.

Kritické vývojové periody charakterizují proměny trojího typu: a) zvýšení citlivosti vůči vnějším podnětům, b) transformaci funkčních soustav a c) změny vztahů jedince k jeho prostředí (Křeček 1973). Na základě těchto kritérií se dají vymezit tři hlavní postnatální vývojová období: infantilní/kojenecké (od narození do odstavu, u potkanů do stáří 20-25 dnů), juvenilní (od odstavu do pohlavního dozrání) a období dospělosti (po pohlavním dozrání) (King 1958; Křeček 1973). Mezi těmito stabilními stadii jsou dle Křečka (1973) zřetelné přechodné etapy,

které nazývá kritické období porodu, kritické období odstavu a kritické období pohlavního dozrávání. O neonatálním období a období odstavu je známo, že jsou kritická pro transformaci několika funkcí. Období pohlavního dozrávání je charakterizováno projevením pozdních následků po zásazích provedených v mládí (Křeček 1973). Toto dělení podporují fyziologické koreláty. Během porodu a těsně po něm nastávají anatomické i funkční změny např. na oběhové, dýchací, trávicí soustavě. Pohlavní dozrání je také provázeno změnami činnosti hypofýzy a celé endokrinní soustavy. Křeček (1967) podložil dané tvrzení výsledky své práce, kde ukázal, že i odstav jako kritické období vývoje je spojeno s kvalitativními změnami trávení, činnosti ledvin a endokrinních funkcí.

Formování teorií kritických vývojových period probíhá až do dnešních dob. Výrazem „kritická vývojová perioda“ označují autoři odlišné jevy v závislosti na konkrétním předmětu výzkumu každého autora.

Z dosavadních experimentálních studií na zvířatech sledujících vliv psychostimulancií na vývoj potomků exponovaných matek je zřejmé, že důležitou roli nehraje jenom užívání drogy jako takové, ale i způsob podání, dávka a také načasování aplikace během různých stadií vývoje plodu. Amfetaminy, mezi které řadíme i metamfetamin, ovlivňují během vývoje centrální nervové soustavy (CNS) 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 prenatálního či postnatálního vývoje, kdy je vyvíjející se a dozrávající neurotransmiterový systém více senzitivní na účinek drogy (Rice and Barone 2000a; Williams *et al.* 2003b).

1.2 ONTOGENEZE NERVOVÉHO SYSTÉMU

Synchronizace vývoje funkčních soustav a jejich vzájemné induktivní působení je důležitou součástí vývoje vysoce diferencovaných struktur tkání a orgánů. Nervové buňky získávají během ontogeneze svou identitu, vytvářejí uspořádaná a přesná synaptická spojení, kterých morfologii a funkci ovlivňují nejen genetické faktory, ale i vnější prostředí. Ontogenetický vývoj nervového systému může být ovlivněn těmito faktory už na bázi vzniku buněk, mohou být

ovlivněny vzájemné trofické interakce mezi buňkami, či mechanismy pro migraci buněk, růst axonů a myelinizace synaptických spojení (Nicholls *et al.* 2013). 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 (Clancy *et al.* 2007; Semple *et al.* 2013).

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 (Rice and Barone 2000a; Williams *et al.* 2003b).

1.2.1 Paralely v neuro-ontogenezi člověka a laboratorního potkana

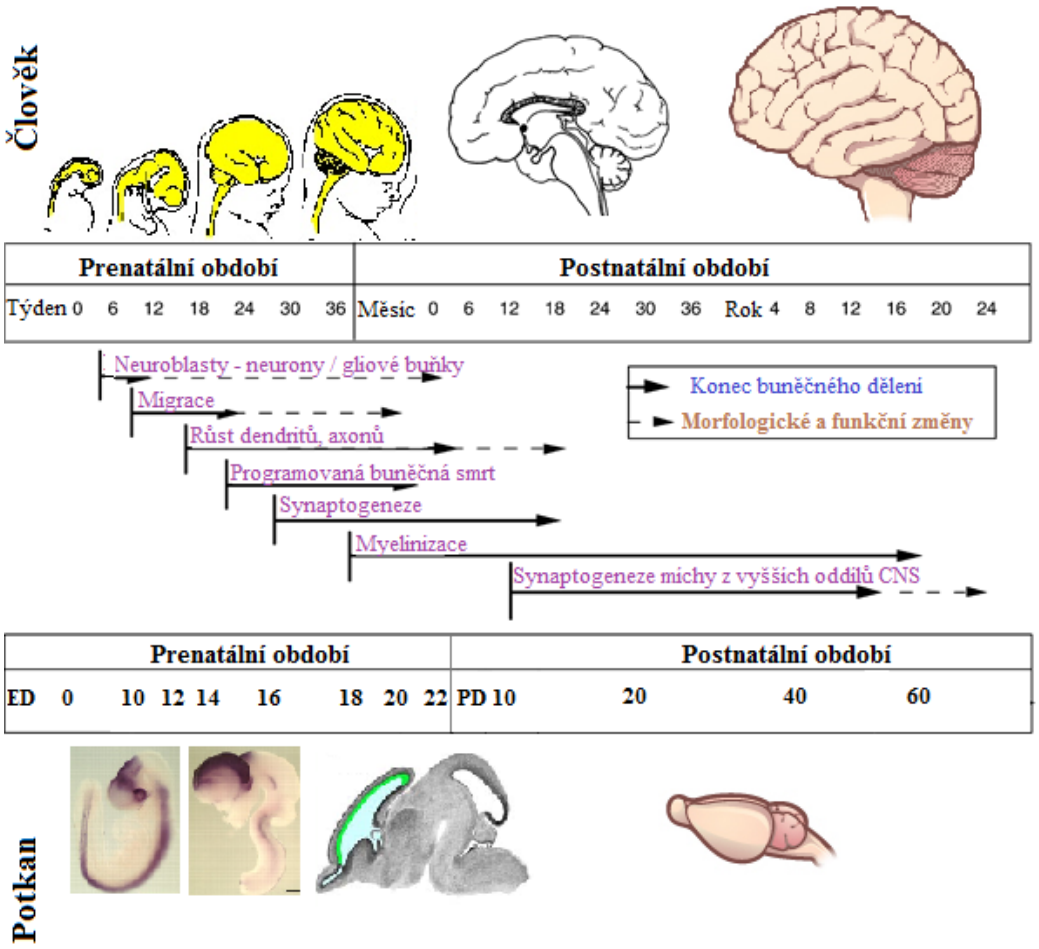
Základ CNS tvoří neurální ploténka, která vzniká z buněčných prekurzorů ektodermu v časném období embryogeneze [oblast gastruly, 2. týden gestace u lidí, embryonální den (ED) 5-6 u potkanů]. Její laterální okraje se na GD (gestační den) 18 u člověka začnou zvedat v procesu zvaném neurulace a vytváří neurální valy. Neurální valy se během dalšího vývoje dále zvedají a přibližují k sobě ve střední čáře, až se nakonec srostou a vytvoří neurální trubici. Tento proces probíhá u lidí mezi ED 24-28 (3. týden gestace), u potkanů přibližně v polovině gestačního období, ED 9-11 (Rice and Barone 2000b; Semple *et al.* 2013). Konce neurální trubice zůstávají několik následujících dní ještě otevřené jako *neuroporus anterior* a *posterior*. V místě uzavírání předního neuroporu (u lidí ED 25, u potkana ED 10,5) vzniká později přední mozek. Uzavíraní zadního neuroporu nastává o dva dny později (ED 27-28 u lidí, ED 11,5 u potkana).

Po uzavření neurální trubice se začínají na její ventrikulární straně shromažďovat neuroepitelové buňky (neuroblasty), z kterých mitotickým dělením vznikají neurony a gliové buňky. Ty postupně migrují na povrch neurální trubice a vytvářejí šedou hmotu míšní. Okrajová vrstva obsahuje nervová vlákna vystupující z neuroblastů plášťové vrstvy. S postupnou myelinizací v pozdějších

stadiích vývoje vzniká bílá hmota míšní (Rice and Barone 2000b; Sadler 2011). Diferenciace populací neuronů v CNS je navozena signály z okolních struktur. Ektodermální buňky pokrývající nervovou trubici produkují dorzálně orientované signální molekuly BMP4, které za pomoci dalších signálních molekul (BMP5, BMP7, Aktivin, Dorsalin) a pomocí ventrálně orientovaných signálních molekul SHH, produkujících se v chorda dorsalis, aktivují protisměrně orientované kaskády růstových faktorů TGFβ a SHH. Vlivem zvýšené nebo snížené aktivity TGFβ nebo SHH dochází k expresi genů pro růst a diferenciaci neuronů v předních rozích míchy, k sensitivním neuronům či motoneuronů (např. PAX 3 a 7, NKX 6.1, PAX 6). Buněčné proliferační procesy jsou mezi potkanem a člověkem strukturálně paralelní, ale v rozmezí odlišné časové škály. U potkanů probíhají tyto děje na ED 10,5-11, u lidí přibližně od 4. týdne gravidity (Tau and Peterson 2010; Thompson *et al.* 2009).

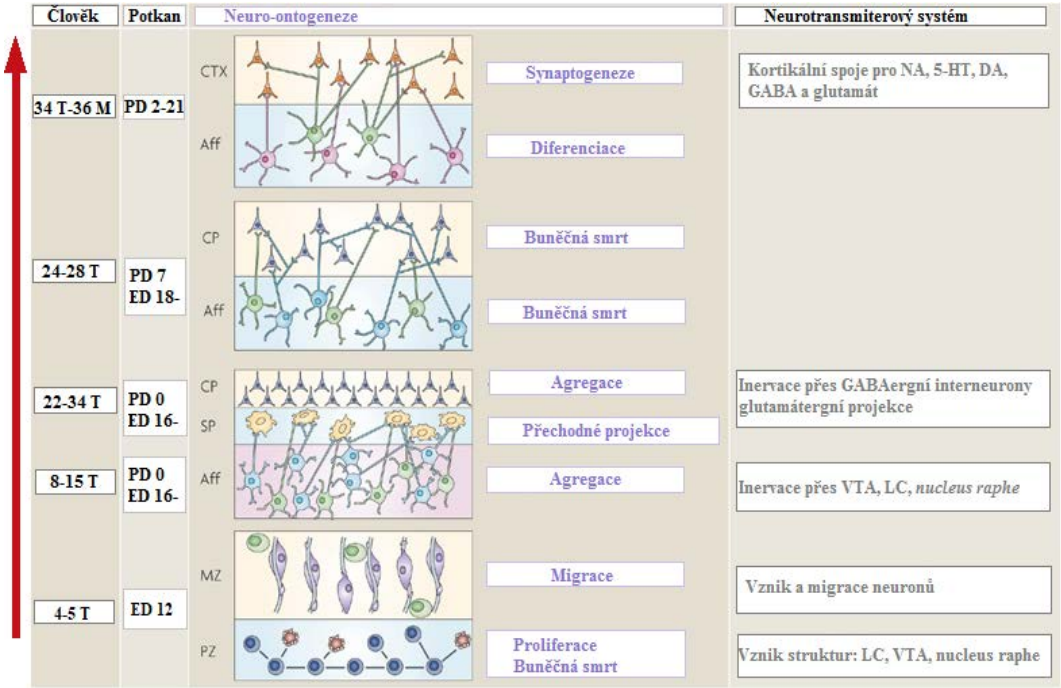
V tomto čase se na hlavovém konci neurální trubice tvoří tři rozšířeniny, primární mozkové váčky: prosencefalon, mesencefalon, rombencefalon (Sadler 2011). Přibližně o dalších 7-9 dní později u člověka (5. týden gravidity) a ED 12 u potkana začnou proliferační buňky expandovat do diencefala, mesencefala a telencefala, kde se nadále dělí a vytvářejí základ pro struktury v okolí 3. mozkové komory (Goulding *et al.* 1993). Hlavní skupinou genů regulujících diferenciaci neuronů mozku jsou homeotické geny, tzv. Hox geny, exprimované v chorda dorsalis, v prechordové ploténce a nakonec také v neurální ploténce. Tyto geny kódují transkripční faktory pro další diferenciaci genů a růstových faktorů (např. FGF8, SHH, BMP4, BMP7) pro neurony v předním, středním a zadním mozku. Pro správný vývoj různých částí mozku tak hraje významnou roli schopnost odpovídat na konkrétní signální molekulu v daném čase. U potkanů probíhá neurogeneze nejvíce v kortikální a subkortikální oblasti na 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, struktury důležité pro motorickou aktivitu, se začínají formovat během ED 12-13 u potkana, 5. týden gestace u člověka. Neurogeneze hipokampu, amygdaly a limbického systému, struktur důležitých pro procesy učení, paměti, emocí a chování, probíhá u potkana od ED 14 (Iaria *et al.* 2003; Rice and Barone

2000b). Většina hipokampálních pyramidálních buněk je generována u potkana prenatálně (ED 14-17), asi 15 % granulárních buněk gyrus dentatus se tvoří až postnatálně (Rice and Barone 2000b). Hipokampální neurogeneze vrcholí u lidí okolo ED 60 (8. gestační týden), přičemž až 80 % granulárních buněk gyrus dentatus se tvoří těsně před porodem (40. týden gestace) (Clancy *et al.* 2007; Rakic and Nowakowski 1981). Průběh neuro-ontogeneze člověka a potkana je zobrazen na obrázku 1.1.



Obr. 1.1 Neuro-ontogeneze u člověka a potkana. ED – embryonální den, PD – postnatální den, CNS – centrální nervový systém (Andersen 2003; Workman *et al.* 2013).

Od tohoto období se postupně začínají objevovat první neurotransmiterové buňky (Rice and Barone 2000b; Thompson *et al.* 2009). Přehled základních dějů v rámci neuro-ontogeneze neurotransmiterového systému u lidí a potkanů je zobrazen na obrázku 1.2. Studie Le Douarin (1981) poukazuje na fakt, že aktivace exprese genu pro určitý neutransmiterový systém je závislá na tkáňovém faktoru dané oblasti mozku a že epigenetické faktory ovlivňují diferenciaci tohoto systému během jeho vývoje.



Obr. 1.2 Vývoj neurotransmiterového systému u člověka a potkana. ED – embryonální den, PD – postnatální den, T – týden, M – měsíc, NA – noradrenalin, 5-HT – serotonin, DA – dopamin, GABA – kyselina gama-aminomáselná, VTA – ventrální tegmentální oblast, LC – *locus coeruleus*, PZ – proliferační zóna, MZ – marginální zóna, Aff – aferentní spoje, SP – přechodné projekce, CP – kortikální destička, CTX – mozková kůra. Upraveno dle Thompson *et al.* (2009).

Hlavní neurotransmiterové systémy spjaté s efektem psychostimulačních drog jsou noradrenergní, dopaminergní a serotoninergní systém (Obr. 1.3).

Buňky noradrenergního systému jsou koncentrovány v mozkovém kmeni, zejména v locus coeruleus a retikulární formaci medully a pontu. Z této oblasti vede 5 hlavních drah, které inervují celý mozek (Herlenius and Lagercrantz 2004). Noradrenergní neurony se objevují u potkanů na ED 12-14, u člověka 5. - 6. týden

gestace a jsou nezbytné pro další vývoj mozku (Sundstrom *et al.* 1993). Regulují vývoj první vrstvy mozkové kůry (Cajal-Retzius buňky), která tvoří základ pro následnou neurogenezi a migraci buněk do dalších vrstev kortexu (Herlenius and Lagercrantz 2004).

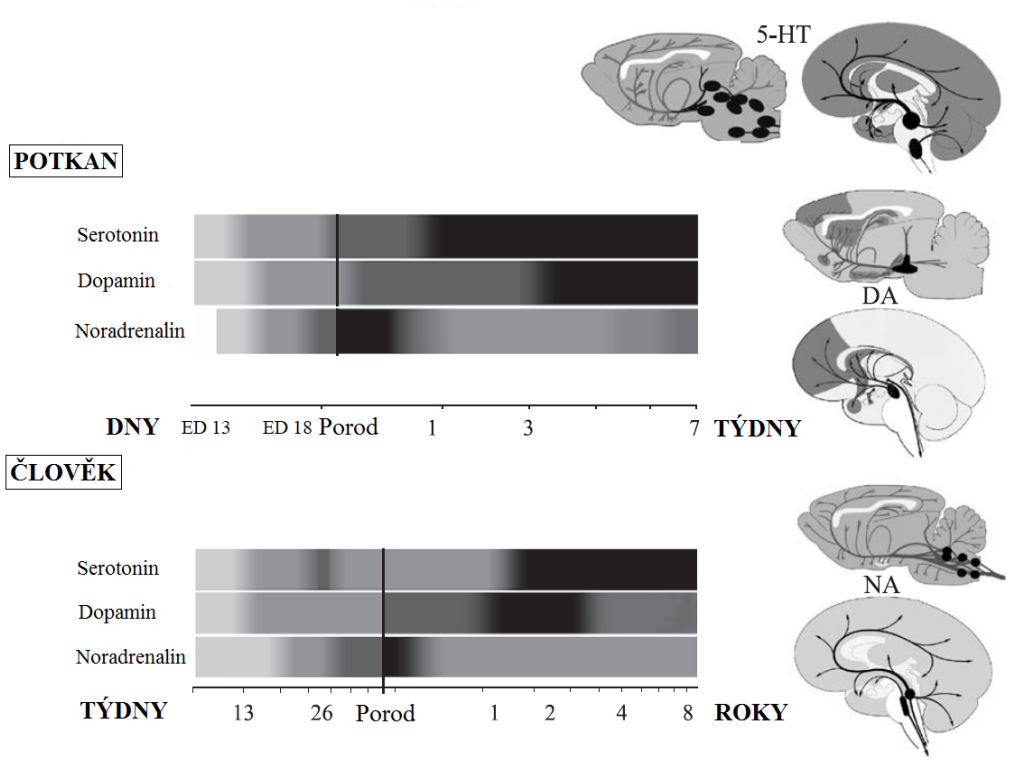
Dopaminergní neurony sehrávají důležitou roli v motorické aktivitě a v kognitivních funkcích. Buňky jsou koncentrovány v substantia nigra, ventrální tegmentální oblasti, v bazálních gangliích a hipokampální formaci (Herlenius and Lagercrantz 2004). Zvláště prefrontální kortex je bohatě zastoupen dopaminergní neurony, kde zprostředkovává odpověď v rozhodování, řešení problémů a koordinaci pohybu (Diamond 1996). Dopaminergní neurony se objevují během ED 10-15 u potkanů (Olson and Seiger 1972) a 6. – 8. týden gravidity u lidí (Sundstrom *et al.* 1993), dříve u samic/žen než u samců/mužů (Herlenius and Lagercrantz 2004). Existují dva hlavní typy dopaminergních receptorů, a to D1 a D2, a tři vedlejší typy, a to D3, D4 a D5. Stimulace D1 receptorů zvyšuje tvorbu cAMP (cyklický adenosinmonofosfát) a fosforylaci DARPP-32, podílí se na vytváření paměťové stopy (Goldman-Rakic 1995). D2 receptory naopak zprostředkovávají pokles cAMP.

Serotoninergní neurony jsou lokalizovány ve středním mozku, epifýze, substantia nigra, v hypotalamu a v rafeálním jádře mozkového kmene. Tyto neurony mají rozsáhlé projekce, pomocí kterých je možné koordinovat složité smyslové a motorické vzory chování (Herlenius and Lagercrantz 2004). Většina serotoninergních receptorů patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem, výjimku tvoří 5-HT3 receptory, které představují skupinu receptorů iontových kanálů s ligandem (Hoyer *et al.* 2002). Serotonin ovlivňuje proliferaci neuronů, diferenciaci a synaptogenezi. Serotoninergní buňky se vytvářejí jako jedny z prvních buněk neurotransmiterových systémů, a to v rafeálním jádře. U potkana během ED 9-11 a u člověka přibližně 5. týden gestačního období. Z rafeálního jádra začnou postupně prostupovat míchou a kortexem (Herlenius and Lagercrantz 2004). Studie Gaspar *et al.* (2003) poukazuje na významnou roli serotoninu (receptor 5-HT1A) při diferenciaci neuronálních progenitorů během 12. –14. týdne gestačního období u člověka. Fetální lidský mozek, zejména kortex

a hipokampus, vykazuje nejvyšší hodnoty v denzitě serotoninových receptorů v rozmezí 16. -22. týdne gravidity.

Vývoj mozku dále pokračuje procesem zrání nervových buněk. Buňky agregují, vytvářejí synaptická spojení poměrně rychle, avšak zprvu postrádají specializace typické pro zralé synapse. Tvoří se axony, dendrity, upevňují se mezisynaptické spoje, zdokonaluje se přenos nervového signálu. Synaptické spojení plně dozrávají během několika dalších týdnů u člověka (34. –36. týden gestace), u potkana v rozmezí posledních prenatálních dní (ED 18) až do PD 19-21. Synapse nabývají své funkce po procesu myelinizace (Clancy *et al.* 2007; Fentress 1988; Workman *et al.* 2013). Vrchol neurogeneze se odhaduje na 40. týden gravidity u lidí, u potkanů na PD 7-14 (první a druhý týden postnatálně) (Clancy *et al.* 2007; Dobbing and Sands 1973). Práce Bockhorst *et al.* (2008) poukazuje na nejvýznamnější strukturální změny v šedé hmotě potkanů během prvních 5 dní postnatálního vývoje.

Těsně po porodu se u člověka nárůst počtu neuronů zpomalí. Až do 3. týdně postnatálně u člověka šíří neurotransmiterové systémy své axony do všech kortikálních vrstev, pak počet výrazně klesne (Gaspar *et al.* 2003; Herlenius and Lagercrantz 2004). Do 1,5 roku života se CNS zdokonaluje, dozrává. Buněčné dělení končí kolem druhého roku života (Greenough *et al.* 1987). U potkana po porodu dochází k rychlému zrání astrocytů, nastávají změny v morfologii, konektivitě a elektrofyziologických vlastnostech CNS, které probíhají do PD 19-21 (Clancy *et al.* 2007; Semple *et al.* 2013; Workman *et al.* 2013).



Obr. 1.3 Sagitální ilustrace buněčných těl a projekce monoaminových neurotransmiterových systémů. ED – embryonální den**,** NA – noradrenalin, 5-HT – serotonin, DA – dopamin. Barevná škála v zobrazení neuro-ontogeneze 1-10, 10 představuje nejvýznamnější vývoj buněk neurotransmiterového systému. Upraveno dle Herlenius and Lagercrantz (2004).

2 METAMFETAMIN

2.1 SOUČASNÁ SITUACE ZNEUŽÍVÁNÍ DROG

Metamfetamin (MA) je pravděpodobně nejrozšířenějším syntetickým stimulantem. V mnoha zemích po celém světě je považován za jednu z nejužívanějších nezákonných drog spolu s marihuanou, kokainem a opioidy. Od prvotní syntézy z efedrinu v roce 1919 prodělalo užívání MA mnoho změn. Původně to byla pokusná látka používaná jako lék, poté se používal jako látka zvyšující výkon vojáků. Od konce sedmdesátých let je užívání a výroba MA nelegální, od devadesátých let jeho obliba v užívání dramaticky narůstá po celém světě (EMCDDA – Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost) (EMCDDA and Addiction 2009; Mravčík *et al.* 2007). UNODC (Úřad Organizace Spojených národů pro drogy a kriminalitu) (https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet_4_ATSNPS.pdf) ve své světové zprávě o drogách z roku 2015 odhaduje, že po celém světě užívá amfetaminy 37 milionů lidí, z toho asi polovina uživatelů je ve východní a jihovýchodní Asii, kde se taky hlavně soustředí jejich výroba. Tato zpráva dále uvádí, že výroba MA za rok 2015 přesáhla 132 tun. Celosvětový počet uživatelů je 246 mil. lidí, ve věkovém rozmezí 15-64 let (to je 1 z 20). Z tohoto počtu 12,2 mil. lidí užilo drogu injekčně.

Počátek zneužívání MA v České republice lze určit rokem 1977, kdy byly zaznamenány první nálezy MA při kontrolních analýzách abusu léčiv. MA představuje druhou nejrozšířenější užívanou drogu hned po konopí a nejčastěji zneužívanou synteticky připravenou drogu v České republice (ČR). Na konci devadesátých let začaly potíže s jeho užíváním narůstat také na Slovensku (SR). V menší míře se MA objevuje v dalších zemích střední a východní Evropy. Dostupné národní odhady užívání MA uvádějí mezi 2,8 a 2,9 v ČR a mezi 1,5 a 4 uživatelů ve SR na 1000 obyvatelů ve věku 15 až 64 let (EMCDDA and Addiction 2009). Přibližně 66 % na drogách závislých mužů a žen v ČR užívají MA jako drogu první volby. Český statistický úřad odhaduje, že se v ČR ročně zkonzumuje přibližně 4,5 tuny MA. Narůstá taky tzv. rekreační užívání drog.

Velice závažným, dnes už celosvětovým problémem, je zneužívaní drog ženami během těhotenství (Marwick 2000). Mnoho žen přechází z jiných tvrdých drog během těhotenství právě na MA, protože má anorektické (napomáhá matkám udržovat jejich tělesnou hmotnost) a stimulační (dodává jim energii) účinky (Marwick 2000; Williams *et al.* 2003a; Williams *et al.* 2003c). MA je lipofilní látka, dobře prostupuje buněčné membrány (Dattel 1990; Wilcox *et al.* 1986). Po podání se MA rychle a dobře distribuuje v krvi, přestupuje do mozku matky, prochází také placentární bariérou do plodu a zasahuje tak do jeho prenatálního vývoje (Robinson and Becker 1986). Koncentruje se také v mateřském mléce, čímž působí na vývoj plodu i během laktace (Nordahl *et al.* 2003; Smith *et al.* 2001).

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. Proto načasování expozice MA během gestace či laktace významně ovlivňuje stupeň účinku drogy na potomstvo těchto matek.

2.2 MECHANISMUS ÚČINKU

2.2.1 Farmakokinetika

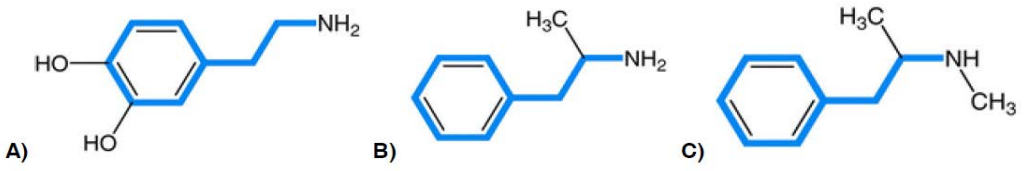
MA je slabá lipofilní báze, difuzí snadně přestupuje plazmatickou membránou buněk, hematoencefalickou a placentární bariérou (Dattel 1990; Nordahl *et al.* 2003). Strukturně jde o (2S)N-methyl-l-fenylpropan-2-amin. Chemická struktura MA je podobná chemické struktuře amfetaminu (Obr. 2.1) a efedrinu, a proto má srovnatelné biologické stimulační vlastnosti (Anglin *et al.* 2000). MA může být podán různými způsoby: perorálně (s pomocí kapslí), análně, inhalací (kouření, šňupání), intravenózně (Kirkpatrick *et al.* 2012). Způsob podání ovlivňuje jeho účinek. Biologická dostupnost při perorálním užití tvoří asi 62 %, 79 % po nasálním užití, 90 % po kouření a 100 % představuje injekční podání drogy. Při injekčním způsobu užití se častěji vyvolává závislost a problémy spojené s předávkováním.

Díky svému složení (metylová skupina) je rezistentní na působení degradačního enzymu monoaminooxidáza v játrech, poločas eliminace může trvat

12 až 34 hodin. MA je metabolizován v játrech 3 různými způsoby: asi 45 % dávky se v procesu N-demetylace pomocí enzymu katalyzovaným cytochromem P450 2D6 metabolizuje na amfetamin. Dále se MA metabolizuje aromatickou hydroxylací za vzniku4-hydroxymetamfetaminu, který také zahrnuje cytochrom P450 2D6. Nakonec, MA podléhá ß-hydroxylaci za vzniku noradrenalinu. Konečné degradační produkty drogy jsou pak vyloučeny renální exkrecí (Cho *et al.* 2001). Přibližně 70 % dávky opouští tělo močí do 24 hodin.

2.2.2 Farmakodynamika

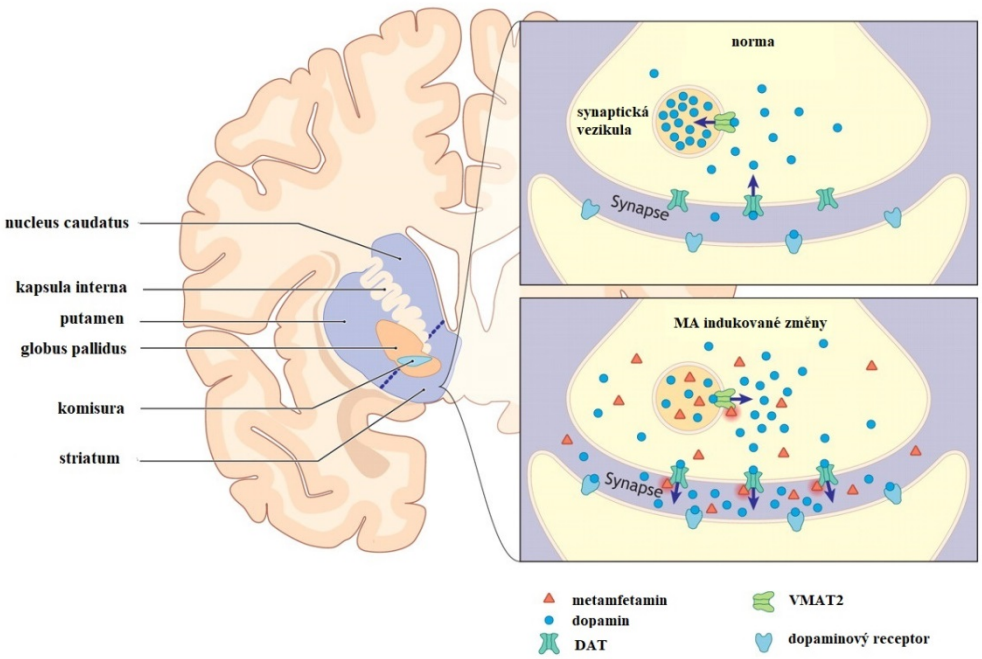
Struktura MA je velmi podobná struktuře dopaminu (Obr. 2.1), co ulehčuje jeho přímé vychytávání axony dopaminu. MA ovlivňuje díky strukturální homologie s katecholaminy více neurotransmiterových systémů, nejenom dopaminový, ale také noradrenalinový a serotoninový (Herlenius and Lagercrantz 2004).



Obr. 2.1 Chemická struktura dopaminu (A), amfetaminu (B) a metamfetaminu (C).

Mechanismus účinku MA (Obr. 2.2) tedy spočívá v tom, že MA je schopen substituovat monoaminy jak na membránových transportérech pro dopamin (DAT), pro noradrenalin (NAT) a serotonin (SERT), tak na vezikulárních transportérech těchto monoaminů (VMAT2) (Cruickshank and Dyer 2009). Úloha membránových transportérů spočívá v tom, že za normálních okolností pomáhají zpětně vychytávat monoaminy a pumpovat je zpět do presynaptického zakončení. V synapse jsou pak pomocí transportérů VMAT2 uloženy do vezikul. Po užití MA dochází k jeho rychlé redistribuci v mozku a periferii. Jakmile se dostane do nervového zakončení, je rozpoznám vezikulárním transportérem. Dochází k mobilizaci synaptických váčků

a k uvolnění monoaminů do presynaptického zakončení. Místo toho, aby se koncentrace monoaminů v cytosolu snižovala, tak na základě pozměněného chemického gradientu dochází k zásadnímu zvýšení jejich koncentrace. Tento proces je posílen také tým, že MA nepřímo inhibuje degradační funkci monoaminooxidáz v důsledku svých derivátů (Sulzer *et al.* 2005). Výsledkem je tedy nahromadění monoaminů v synaptické štěrbině a stimulace postsynaptických monoaminových receptorů (Cruickshank and Dyer 2009), čím se posiluje celkový psychostimulační účinek drogy (Cass and Manning 1999; Rothman *et al.* 2001). Studie na potkanech ukázaly, že MA je 2 krát potentnější ve vylučování noradrenalinu než dopaminu a zároveň 60 krát potentnější než na vylučování serotoninu (Rothman *et al.* 2001). Je nutno ještě poznamenat, že interakce dopaminu s jinými neurotransmitery, jako je glutamát a kyselina gama-aminomáselná, hraje důležitou roli v modulaci reakce MA na sekreci dopaminu (Riddle *et al.* 2006). Úlohu v mechanizmu účinku MA hrají i CART peptidy („cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript“), které pravděpodobně modulují účinky amfetaminů a podílejí se na jejich anorektických účincích (Iversen *et al.* 2013).



Obr. 2.2 Dopaminová neurotransmise a mechanismus účinku MA. DAT – transportér pro dopamin, VMAT2 – vezikulární transportér monoaminů.

2.2.3 Pohlavní rozdíly v mechanismu účinku MA

Dalším důležitým faktorem v účinku MA je hladina pohlavních hormonů a u žen fáze reprodukčního cyklu. Pohlavní rozdíly nastávají už v kinetice drogy. Ze studií je známé, že degradace a eliminace drog probíhá u žen pomaleji než u mužů kvůli nižší aktivitě degradačních enzymů (cytochrom P 450) (Kato and Yamazoe 1992; Roth and Carroll 2004). Ženy jsou citlivější na účinek drog také díky tělesné kompozici (Kučerová *et al.* 2015), mají nižší tělesnou hmotnost, jiný poměr svalové hmoty a tukové tkáně, což vede při podání stejné dávky k vyšší koncentraci drogy v jejich plazmě i v mozku v porovnání s muži (Rambousek *et al.* 2014, Kučerová *et al.* 2009). Také je statisticky prokázané, že pohlavní hormony (estrogen) zvyšují senzitivitu na drogu. White (2002) ve své studii sledoval korelaci mezi účinkem MA a reprodukčním cyklem ženy. Účinky drogy byly silnější v průběhu folikulární fáze v porovnání s fází luteální, citlivost pozitivně korelovala s hladinami estradiolu. U žen vzniká také závislost rychleji, ale na druhou stranu i reakce na léčbu je rychlejší. V období abstinence dochází u nich i k méně častým relapsům v porovnání s muži (White *et al.* 2002).

2.3 NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY METAMFETAMINU

Účinky MA závisí na způsobu podání a na dávce. Vstřebaný MA z gastrointestinálního traktu po perorální aplikaci vede k pomalému uvolňování nízkých hladin dopaminu, kdežto intravenózní aplikace nebo aplikace kouřením vede k uvolnění velkého množství neurotransmiteru (Davidson *et al.* 2001; Volkow *et al.* 2001). Rychlost rozvoje a míra psychické závislosti závisí nejen na dávce drogy, ale také na rychlosti nástupu a intenzitě účinku (Iversen *et al.* 2013). Zneužívání MA se považuje za závislost, pokud jedinec pociťuje opakovanou touhu po droze, postupně navyšuje dávku z důvodu vznikající intolerance. Takto se může dostat až k užívání drogy každé dvě hodiny, 8-10 krát za den, v denních dávkách 0,2-1,0 g (Davidson *et al.* 2001; Šlamberová and Charousová 2008).

2.3.1 Orální a dermatologické účinky

Uživatelé MA trpí ve velké míře rozpadem zubů, mají tzv. „metamfetaminová ústa“ následkem snížené sekrece slin, xerostomie a bruxizmu

(Maxwell 2005). Zneužívání drog obecně souvisí s nedostatečnou hygienou a podvýživou (Vearrier *et al.* 2012), čím se tento problém ještě víc prohlubuje. Uživatelé MA jsou ve větší míře náchylní na infekční onemocnění způsobené bakterií „methicilin-rezistentní Staphylococcus aureus“, doprovázeno formikací (typ parestézie, kdy cítí na kůži pocit plazení bez fyzické příčiny), což vede k samopoškozování kůže (Cruickshank and Dyer 2009). Po vícenásobné aplikaci vyšších dávek v kratších časových intervalech se objevují formy stereotypního chování, pocit parazitózy (Robinson and Becker 1986), které poškozování kůže ještě podporují.

2.3.2 Kardiovaskulární, pulmonální a jaterní účinky

Tím, že MA nepřímo zvyšuje uvolňování a působení noradrenalinu na sympatických nervových zakončeních, působením na α1-adrenoreceptory zvyšuje krevní tlak, působením na β-adrenoreceptory zrychluje tepovou frekvenci, přes β2-adrenoreceptory dilatuje bronchy, způsobuje tachypnoe. Opakované podávání MA může mít za následek chronické srdeční stavy, jako je kardiomyopatie nebo koronární srdeční choroby (Cruickshank and Dyer 2009). Kardiomyopatie může být způsobena různými mechanismy, včetně difuzní myokardiální toxicity v důsledku nadměrné stimulace noradrenergních receptorů srdce a spazmu koronárních arterií (Vearrier *et al.* 2012). Při předávkování bývá nejčastější příčinou smrti kardiovaskulární selhání nebo cévní mozková příhoda. U uživatelů MA bylo také pozorováno selhání jater, co vedlo k nekróze orgánu (Vearrier *et al.* 2012).

2.3.3 Močopohlavní a hematologické účinky

Užívání MA je spojeno s retencí moči (Iversen *et al.* 2013). Nežádoucí účinky MA se také projevují na sexuálním chování uživatelů drog. Po užití MA vzrůstá sexuální touha po partnerovi, dochází k nechráněnému pohlavnímu styku, co vede k přenosu virových onemocnění (HIV, hepatitida B, C), které jsou mezi uživateli drog díky sdílení kontaminovaných jehel vysoce prevalenční (Vearrier *et al.* 2012). Bylo prokázáno, že MA inhibuje imunitní systém a tím snižuje odolnost vůči infekčním onemocněním (Yu *et al.* 2003).

2.3.4 Účinky na CNS

Nižší dávky MA vedou u člověka k navození stavu radosti, pocitu pohody, nižšímu fyzickému a psychickému vyčerpání a pocitu energie (Iversen *et al.* 2013; Nordahl *et al.* 2003). Vyšší dávky drogy (20-50 mg) prohlubují pocit ostražitosti, ale i relaxaci, nadšení, rychlý proud myšlenek, vysoké sebevědomí (Iversen *et al.* 2013). Uživatel nepotřebuje spát ani jíst, jeho psychomotorické tempo je zrychlené. Při opakovaném užití dávky pro zvýšení pocitu euforie dochází k postupné kumulaci drogy v cirkulaci, navozuje se pocit neklidu, stereotypní formy chování, které mohou vyústit až do psychóz (Bell 1973). Při opakovaném užití drogy se může u uživatele vyvinout tolerance vůči MA, což vede k použití vyšších dávek, silnějších forem MA a použití jiných způsobů aplikace s cílem získat požadovanou odpověď (Darke *et al.* 2008). Jedinec takto dokáže užívat MA i několik dní, až dojde ke stavu totálního vyčerpání, po kterém usne i na 18 a víc hodin. Spánek je neklidný, provázený nočními děsy s častým probouzením ve stavu depresí a pocitů prázdnoty. Dostaví se silná chuť k jídlu (Iversen *et al.* 2013). Po několika dnech bdělého stavu se droga eliminuje z organizmu, postupně opět nastupuje touha po euforických účincích MA, následuje fáze vyhledávání MA, jeho užití, čím se celý koloběh opakuje.

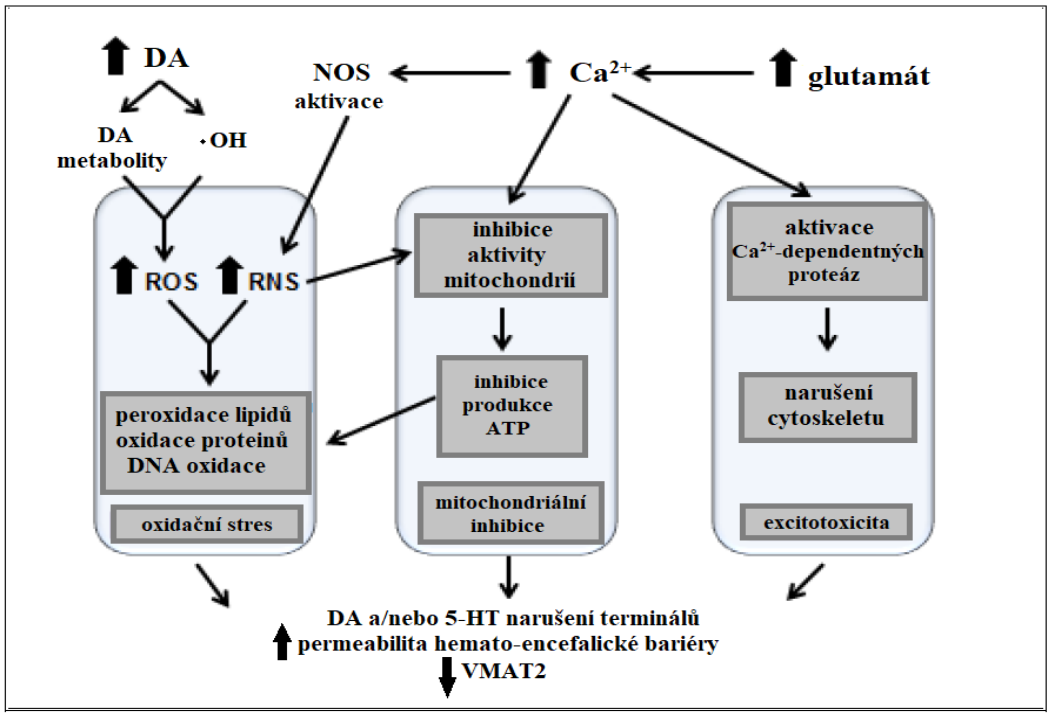
Abstinenční syndrom se projevuje psychickými potížemi, jako jsou dysforická letargie, deprese, anhedonie, agresivita, bažení po droze, které mohou být způsobeny deplecí dopaminu v mozku po užívání MA (Wagner *et al.* 1980). K fyzickým projevům patří zvýšená potřeba spánku a příjmu potravy (Iversen *et al.* 2013).

2.3.4.1 Neurotoxicita

Existuje mnoho prací zabývajících se neurotoxicitou způsobenou užíváním MA (Davidson *et al.* 2001; Nordahl *et al.* 2003; Vorhees 1997), ale mechanismy neurotoxického účinku MA nejsou dosud zcela objasněny. Prvotní studie byla provedena na opicích, kterým byl MA podáván v nízkých dávkách 8-krát denně po dobu 4 až 6 měsíců (denní celková dávka 52 mg/kg). Po uplynutí doby 6 měsíců od poslední aplikace drogy byly zaznamenány významně snížené hladiny dopaminu a dopaminových transportérů v mozku opic exponovaných MA (Fischman and Schuster 1974). Také u morčat a potkanů, jako dalších

experimentálních zvířatech, byl prokázán neurotoxický účinek MA v podobě deplece dopaminu ve striatu až o 50 % (Seiden *et al.* 1993; Vorhees 1997; Wagner *et al.* 1980). Byly nalezeny také změny v serotoninergním systému: snížené hodnoty serotoninu ve frontálním kortexu a hipokampu po nižších dávkách MA, ve striatu a parietálním kortexu po vyšších dávkách (Seiden *et al.* 1993). Experimenty naznačují, že po uplynutí určité doby abstinence (u opic 1 rok) nebyly pozorovány žádné změny v koncentracích dopaminu a jeho transportérech v porovnání s kontrolou. Abstinence působí reparabilně, často formou kompenzací. Také klinické studie poukazují na mozkové abnormality u pacientů dlouhodobě užívajících MA. Pomocí zobrazovacích technik byly odhaleny snížené hustoty dopaminu, dopaminergních receptorů a jeho transportérů, SERT, VMAT2 v prefrontální kůře a v bazálních gangliích. Po 6-12 mesících abstinence se tyto hodnoty částečně upravily (Sekine *et al.* 2006).

S postupem experimentů zabývajících se účinkem MA bylo navrženo několik hypotéz pojednávajících mechanismus MA neurotoxicity (Obr. 2.3). První hypotéza poukazuje na autooxidaci dopaminu a serotoninu na 6-hydroxydopamin a 5,6-dihydroxytryptamin. 6-hydroxydopamin je velmi nestabilní, uvolňuje se z něho peroxid vodíku, vznikají volné radikály, které zásadním způsobem narušují funkčnost buněk (mj. mitochondrií) (Cruickshank and Dyer 2009). Další faktory rozhodující v mechanismu MA neurotoxicity je zvýšená teplota v mozku a dopaminem indukované sekundární uvolnění glutamátu ve striatu přes kortiko-striato-talamo-kortikální negativní zpětnovazební smyčku (Carlsson and Carlsson 1988, Páleníček et al. 2011).



Obr. 2.3 Mechanismus neurotoxicity MA. DA – dopamin, 5-HT – serotonin, ·OH – peroxid vodíku, ROS – volné kyslíkové radikály, RNS – volné dusíkaté radikály, VMAT2 – vezikulární transportéry pro monoaminy. Upraveno dle Riddle *et al.* (2006).

2.4 PRENATÁLNÍ EXPOZICE METAMFETAMINU

Statistické studie poukazují na fakt, že většina drogově závislých žen přechází během gravidity z jiných tvrdých drog právě na MA (Marwick 2000). MA přestupuje všemi bariérami v těle matky, tedy i placentární, a tak se dostává do organismu plodu. Koncentrace drogy v cirkulaci dítěte dosahuje přibližně 50 % koncentrace drogy v plazmě matky. S progredujícím účinkem drogy se díky pomalejšímu odbourávání v játrech koncentrace drogy může zvyšovat a dokonce i přesáhnout koncentraci v cirkulaci matky (Dattel 1990). Fyziologické změny tělesné vody a plazmatického objemu v průběhu těhotenství mohou ovlivnit poločas rozpadu a distribuční objem drog. Citlivost k drogám a jejich metabolismus se v průběhu těhotenství mění. Experimentální studie White *et al.* (2011) naznačuje změny v rychlosti eliminaci MA a jeho metabolitu amfetaminu (AMP) u březích samic v různých stádiích gestace. Během pozdějších stádií gestace (ED 21) se droga v těle matky eliminuje pomaleji (115 min MA, 189 min

AMP) než během časných fází gestace (ED 7) (91 min MA, 95 min AMP) (White *et al.* 2009).

2.4.1 Klinické studie

Ultrasonografií bylo prokázáno, že MA negativně působí během intrauterinního vývoje na plod (Konkol 1994; Konkol *et al.* 1994; Tronick and Beeghly 1999). Kromě toho, že hrozí riziko potratů, předčasných porodů a že se děti rodí s nižší porodní hmotností a s růstovou retardací (Dixon and Oro 1987; Eriksson *et al.* 1978; Oro and Dixon 1987) 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). Plessinger (1998) v jedné ze svých studií poukazuje na redukce objemů a zmenšení subkortikálních struktur, putamenu, globus pallidus, hipokampu a také nucleus caudatus. Zmenšení struktur úzce koreluje nejen se zhoršenými výkony ve škole (zpožděná verbální paměť, neurokognitivní deficit), ale také se změnami v chování dětí drogově závislých matek. U novorozenců byly sledované poruchy spánku, zvýšený svalový tonus, tremor a zhoršení adaptability na stres (Wouldes *et al.* 2004). Navíc děti vystavené účinkům stimulačních drog jeví známky akutního abstinenčního syndromu. Exponované děti pak také zaostávaly v jazycích, matematice a tělesné výchově. Účinky na chování a kognitivní funkce se jeví jako trvalé (Hansen *et al.* 1993; Šlamberová and Charousová 2008). Není zatím ale úplně objasněno, jestli je to přímý účinek drogy na potomstvo, protože tyto matky během těhotenství kromě zneužívání širokého spektra drog často holdují i alkoholu a kouří cigarety (Šlamberová *et al.* 2008). Díky tomuto samotný mechanizmus účinku MA na plod po jeho prenatální expozici nebyl dosud plně objasněn, proto se zkoumají účinky působení drog na organizmus na laboratorních zvířatech.

2.4.2 Experimentální studie

Prenatální expozice MA *in utero* představuje podávání drogy buď v průběhu celého prenatálního období, nebo v průběhu kratších časových intervalů podle stadia vývoje plodu (Jablonski *et al.* 2015). Studie Rice and Barone (2000b) přirovnává prenatální období vývoje potkanů (ED 1-21)

k prvnímu a druhému trimestru gestace u lidí: ED 1-9 u potkanů koreluje s prvním trimestrem, ED 10-21 odpovídá druhému trimestru. Existuje řada experimentálních studií, které popisují účinek prenatální expozice MA podávaného během celého období gestace (ED 1-22 u potkanů). Podávání MA březím samicím laboratorního potkana v dávce 5 mg/kg odpovídá koncentracím drogy v plazmě a mozku plodu drogově závislých matek (Acuff-Smith *et al.* 1996; Cho *et al.* 1991; Rambousek *et al.* 2014). Vyšší dávky drogy (20, 50 mg/kg) podávané během gestace vedly ke spontánním potratům nebo dokonce k úmrtím březí samice ještě před porodem (Acuff-Smith *et al.* 1996; Martin *et al.* 1976). Vedle přímých negativních účinků na zdraví matky a její dítě mají drogy i nepřímé účinky. Ženy závislé na drogách nevěnují svému potomkovi dostatečnou mateřskou péči (Vavřínková *et al.* 2001). MA podávaný během gravidity zhoršuje mateřské chování (Fraňková 1977; Malinová-Ševčíková *et al.* 2014; Schutová *et al.* 2008; Šlamberová *et al.* 2005a), snižuje taktilní stimulaci, která sehrává významnou roli v pozitivním vývoji jejího potomka (Schanberg and Field 1987; Šlamberová *et al.* 2005a). Naše předcházející studie zjistily, že podávání MA v dávce 5 mg/kg březím samicím během celé gestace vedlo u mláďat k opoždění jejich časného postnatálního somatosenzorického vývoje. Mláďata dosahovala horších výsledků v testech negativní geotaxe a vzpřimovacího reflexu, bylo u nich pozorováno také snížení spontánní motorické aktivity a explorace (Hrubá *et al.* 2008; Cho *et al.* 1991; Malinová-Ševčíková *et al.* 2014; Šlamberová *et al.* 2005a).

Studie zjišťující dopad prenatální expozici MA na neurologické a behaviorální změny, poukázaly na fakt, že tyto změny jsou více výrazné u dospělých zvířat než u mláďat (Vorhees and Pu 1995). Dlouhodobé účinky na koncentraci monoaminů a jejich metabolitů jsou jen mírně ovlivněny prenatální expozicí MA, navíc jsou tyto účinky specifické pro jednotlivé regiony mozku. Bubeníková-Valešová *et al.* (2009) uvádí, že prenatální expozice MA v dávce 5 mg/kg během celé gestace vedla ke zvýšení hladiny dopaminu o 288 % v nucleus accumbens samců v dospělosti. Studie Acuff-Smith *et al.* (1996) naznačuje, že expozice MA (0, 5, 10, 15 a 20 mg/kg) během ED 7-12 a ED 13-18 nemá zásadní vliv na hladiny dopaminu, serotoninu a noradrenalinu v žádné

z testovaných oblastí mozku. Jenom u samic exponovaných během ED 13-18 nejvyšší dávkou drogy (20 mg/kg) byly v nucleus caudatus zjištěny zvýšené koncentrace dopaminu a snížené koncentrace serotoninu v porovnání s kontrolami. Předpokládá se, že díky působení MA na dopaminergní a serotoninergní neurotransmiterový systém dochází k vytvoření nejen dlouhotrvajících, ale dokonce i trvalých změn v behaviorálních projevech zvířat (Weissman and Caldecott-Hazard 1995). Prenatální expozice MA (2-10 mg/kg/den) během celého období gravidity indukuje redukci spontánní motorické aktivity zvířat testovaných po odstavu (PD 21-30) (Sato and Fujiwara 1986; Weissman and Caldecott-Hazard 1995). Redukce motorické aktivity byla také zaznamenaná u prenatálně exponovaných zvířat během ED 7-20 (MA 1-4,5 mg/kg/den) testovaných v PD 21 (Cho *et al.* 2001).

Studie z naší laboratoře naznačují, že prenatální expozice MA (5 mg/kg/den) během celého období gestace nemá vliv na prostorové učení v testu Morrisova vodního bludiště (Macúchová *et al.* 2013; Schutová *et al.* 2008; Šlamberová *et al.* 2014). Naopak, tato zvířata dosahovala lepších výsledků po prenatální expozici MA v testu paměti (Schutová *et al.* 2009; Šlamberová *et al.* 2014). Jiné studie demonstrují, že ani delší doba expozice MA (týden před zabřeznutím a během gestace) v širším spektru dávkování (0,625-10 mg/kg/den) nemá vliv na proces učení (McDonnell-Dowling *et al.* 2014; Weissman and Caldecott-Hazard 1995). Studie Acuff-Smith *et al.* (1996) naznačuje významnou roli dávkování a načasování expozice MA. U zvířat exponovaných nižšími dávkami MA (5, 10 mg/kg/den) během ED 7-12 a během ED 13-18 se neprojevil vliv prenatální expozice na kognitivní funkce, kdežto expozice MA ve vyšších dávkách (15, 20 mg/kg/den) během ED 7-12 vedla k narušení procesu učení a k poruchám paměti.

2.5 NEONATÁLNÍ EXPOZICE METAMFETAMINU

Většina drog proniká i do mateřského mléka, takže dítě je exponováno droze také postnatálně během laktace (Fox 1965). Ve vnímání laktační periody u lidí a u hlodavců existují ale odlišnosti. Laktační období u člověka představuje období od porodu do přibližně 2,5 roku života, u potkana od porodu do odstavu (PD 21) (Jablonski *et al.* 2015; Rice and Barone 2000b). Fakt, že se mozek vyvíjí

delší dobu v porovnání s ostatními orgány, podtrhává zmiňované rozdíly mezi lidmi a hlodavci. Neuro-ontogeneze u lidí je zásadnější během pozdějších stadií gestace (2. -3. trimestr), kdežto u hlodavců probíhá zrání nervového systému více během prvních dvou až tří týdnů po porodu (Rice and Barone 2000b). Načasování expozice MA během těchto kritických stadií neuro-ontogeneze sehrává důležitou roli v mechanismu přenosu účinku drogy: u lidí se v tomto stadiu přenáší droga na potomky transplacentárně, kdežto u potkanů prostřednictvím mateřského mléka během kojení. Rambousek *et al.* (2014) ve své práci demonstruje přítomnost MA nejen v plazmě a mozku exponovaných matek, ale také v mateřském mléce, které bylo odebráno ze žaludku mláďat těchto matek. Přenos drogy prostřednictvím mateřského mléka potvrzuje také přítomností MA a AMP v séru (0,1-1 ng/ml) a mozku (1-10 ng/g) odebraných z mláďat exponovaných MA v dávce 5 mg/ml/kg během PD 1-21. Doposud ale neexistuje experimentální studie, která by přesně popsala míru přenosu drogy prostřednictvím mateřského mléka. Existuje také málo klinických studií, které by vysvětlovaly přenos MA prostřednictvím mateřského mléka. Ve své studii Steiner *et al.* (1984) analyzoval koncentrace AMP v plazmě a v mateřském mléce matky a také koncentrace drogy v moči dítěte 10. a 42. den po porodu. Výsledky analýz odhalily 3-7 krát vyšší koncentrace v mateřském mléce v porovnání s hladinami drogy v plazmě matky. Malé množství MA bylo nalezeno i v moči dítěte. Na základě této a dalších studií (Bartu *et al.* 2009; Ilett *et al.* 2007) je doporučeno, aby matky nekojily dříve, než se droga vyloučí z organizmu (24-48 hodin po užití).

2.5.2 Klinické studie

Vzhledem k tomu, že mnoho těhotných žen má tendenci pokračovat v užívání MA i během kojení, je pravděpodobné, že novorozenci budou postiženi různými komplikacemi vzniklými nejen prenatálně, ale také během neonatálního období (Baei *et al.* 2017; Bartu *et al.* 2009; Rambousek *et al.* 2014). Několik klinických studií poukazuje na negativní vliv užívání MA během pozdějších stadií gravidity a laktace na schopnost matky postarat se o novorozeně (Bartu *et al.* 2009). Studie Oei *et al.* (2010) uvádí, že ženy, které během gravidity braly MA intravenózně, měly sníženou schopnost nakojit svého potomka než ženy, které užívaly jiné drogy (38% vs. 76%). Novorozenec pak nepřibývá na váze. Další

studie poukazuje na sníženou sekreci prolaktinu (o 40%) po perorálním užívání dextroamfetaminu (20 mg) po porodu. Tato studie dále uvádí, že hladina mateřského prolaktinu nemusí korelovat se sníženou schopností kojení, hlavně po tom, co už byla produkce mléka spuštěna taktilní stimulací dítětem. Kojení představuje kritické období, během něhož je novorozenec schopen absorbovat drogy konzumované matkou prostřednictvím mateřského mléka (Cho *et al.* 1991). V této souvislosti výsledky naznačují, že novorozenci matek, které užívaly MA během laktace, často projevovali nepříznivé fyzické a behaviorální následky v dalších obdobích života (např. hluchota, postnatální růstová retardace, mentální postižení, poruchy učení a paměti, poruchy chování) (Cui *et al.* 2006). Existují studie, které popisují následky užití MA během laktace končící smrtí dítěte (Bartu *et al.* 2009; Chomchai *et al.* 2016).

2.5.1 Experimentální studie

Mnohé experimentální studie uvádějí jako prvotní negativní důsledek užívaní MA během laktace snižování kontaktu mezi matkou a mládětem. Fraňková (1977) ve své práci demonstruje, že matky exponované AMP během prvních 10 dnů laktace měly zkrácené časy v mateřských aktivitách (interakce s mláďaty, stavění hnízda). Mláďata exponovaná MA (10 mg/kg, 4x/den) mají nižší váhový přírůstek a zůstávají lehčí i během dalších fází života (Vorhees *et al.* 1994a; Vorhees *et al.* 2009). Campbell and Bedi (1989) navazují na problematiku postnatální podvýživy, která však nemá vliv na deficity v motorické aktivitě či v prostorovém učení dospělých zvířat, jak by se na první pohled mohlo zdát. Naše předcházející studie ukazují sníženou lokomoci, explorační chování a zvýšenou anxietu u dospělých zvířat neonatálně ovlivněných MA prostřednictvím mateřského mléka během PD 1-21 (Hrubá *et al.* 2012). Sníženou lokomoční aktivitu dospělých zvířat neonatálně exponovaných MA během různých stadií postnatálního vývoje sledoval také Vorhees *et al.* (2009). Tato i mnohé další studie naznačují důležitou roli načasování expozice MA během časného nebo pozdějšího postnatálního stadia vývoje. Vorhees se svojí skupinou vědců sledoval vliv dávky a délky expozice na různé parametry kognitivních testů u dospělých potkanů exponovaných během neonatálního období. V testu Morrisova vodního bludiště, typ alocentrického učení vázaného na hipokampus, se v jeho studiích

projevily nejvíce deficity po expozici MA v dávce 30 mg/kg/2-x/den během PD 11-20. Stejná aplikace drogy během PD 1-10 nevedla k poruchám prostorového učení a paměti v tomto testu (Vorhees *et al.* 1994a; Vorhees *et al.* 1994b). V dalším testu, Cincinnatiho vodního bludiště (T-maze test), typ egocentrického učení vázaného na striatum, se projevil výrazný deficit v kognitivních schopnostech dospělých zvířat po neonatální expozici MA během PD 6-15 a PD 11-20 v rozmezí dávkování 10-25 mg/kg/4-x/den. Stejné dávkování MA během PD 1-10, PD 21-30 nebo v pozdějších stadiích nemělo vliv na kognici dospělých zvířat (Vorhees *et al.* 2005; Vorhees *et al.* 2004; Vorhees *et al.* 2009; Williams *et al.* 2003a). Williams *et al.* (2004) doplňuje tyto výsledky o tvrzení, že i nižší dávky drogy (0,625-5 mg/kg/4-x/den), exponované během stejných aplikačních period, vedou k poruchám prostorového učení a paměti, které přetrvávají až jeden rok po expozici. Podobné výsledky sledoval ve své studii také Acuff-Smith *et al.* (1996), kde uvádí, že potkani, vystavení účinkům drogy 4x/den po jejich narození (PD 11-20) v dávce 10 mg/kg měli v dospělosti zhoršené kognitivní funkce. Aplikace stejné dávky v PD 1-10 nezpůsobila žádné změny v učení a paměti u potkanů ovlivněných MA v porovnání s kontrolní skupinou.

Vysvětlení dlouhotrvajících změn v lokomoční aktivitě a kognitivních schopnostech se nabízí v dalších studiích, zaměřených na změny v denzitě neurotransmiterových systémů po neonatální expozici MA. Crawford *et al.* (2003), ale také Graham *et al.* (2013) či Williams *et al.* (2003a) ve svých studiích uvádějí redukci D1 a D2 dopaminových receptorů, sníženou aktivitu dopaminových metabolitů, sníženou aktivitu proteinkinázy A, redukci serotoninových či glutamátových receptorů po neonatální expozici MA během PD 11-20.

2.6 AKUTNÍ METAMFETAMIN PODÁVANÝ V DOSPĚLOSTI

Klinické i experimentální studie ukazují, že psychostimulancia, která působí na monoaminergní systém, mají schopnost ovlivnit behaviorální projevy jedince. Experimentální studie naznačují, že nízké dávky MA (1-2 mg/kg) způsobují zvýšenou aktivitu dopaminergních vláken v nucleus accumbens (Kelly *et al.* 1975), což se projevuje zvýšením lokomoce a explorace (Schutová *et al.* 2010; Schutová *et al.* 2009). Tyto dávky MA jsou spojené také se změnami

sociálního chování (Šlamberová *et al.* 2010; Šlamberová *et al.* 2011a). Vyšší dávky MA (4,5-10 mg/kg) aktivují dopaminergní vlákna bazálních ganglií a vyvolávají stereotypní formy chování (Kita *et al.* 2003; Sokolov *et al.* 2004). Pomocí selektivních lézí dopaminergních oblastí v mozku bylo zjištěno, že zvýšená dopaminergní aktivita v nucleus accumbens je zodpovědná za zvýšenou lokomoci, zatímco dopaminergní aktivita substantia nigra vyvolává stereotypní prvky pohybu u potkana po dávce 5 mg/ml/kg (Kelly *et al.* 1975). Chronická expozice během gravidity má za následek zvýšení hustoty serotoninových a dopaminových míst zpětného vychytávání, dochází k remodelaci synaptické morfologie (Weissman and Caldecott-Hazard 1995). Psychostimulancia jsou známa tím, že zvyšují agresivitu a narušují sociální, mateřské a sexuální chování (Šlamberová *et al.* 2013; Šlamberová *et al.* 2011a). Naše dosavadní studie potvrzují změny v nocicepční citlivosti a v pohotovosti k epileptickým záchvatům u dospělých samců a samic prenatálně ovlivněných MA (Bernášková *et al.* 2017; Yamamotová *et al.* 2011). Psychostimulancia ovlivňují kognitivní funkce uvolňováním dopaminu v prefrontální kůře a hipokampu (Iversen *et al.* 2013). Akutní nižší dávky amfetaminů (0,1-0,4 mg/kg) mohou vést ke zlepšení některých aspektů kognitivních testů jak u lidí, tak i u experimentálních zvířat. Vyšší dávky drogy (0,4-1 mg/kg) zvyšují rychlost odpovídání, ale také snižují přesnost. Při dávkách vyšších než 3 mg/kg byla výkonnost v kognitivních testech narušena výskytem stereotypního chování (Grilly and Loveland 2001).

3 HYPOTÉZA

Metodika užívaná v laboratoři na Ústavu normální, patologické a klinické fyziologie je experimentálním modelem pro výzkum drogové závislosti a dlouhodobých účinků prenatální expozice MA na morfologický a funkční vývoj laboratorního potkana. 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. ED potkana 1-11 přibližně odpovídá 1. trimestru u člověka; ED 12-22 potkana 2. trimestru u člověka; časné postnatální období u potkana, 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. Zvířata exponovaná v daném období („aplikační perioda“) MA (5 mg/ml/kg) porovnáme s kontrolními skupinami zvířat exponovaných ve stejném období fyziologickému roztoku (S). U skupiny mláďat exponovaných během rané laktační periody (PD 1-11) přímo vpichem s.c. jsme kontrolní skupině místo podání fyziologického roztoku provedli jenom čistý vpich s.c. (bez aplikace fyziologického roztoku), tzv. „sham“ (S). Metoda sham napichování namísto injekční aplikace fyziologického roztoku byla zvolena na základě našich předchozích zjištění, že po aplikaci fyziologického roztoku přímo mláďatům, tato mláďata zvýšeně umírala.

4 CÍLE PRÁCE

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.

Dospělá zvířata (samci i samice) jsme testovali za pomoci behaviorálních testů:

- „**Test podmíněného vyhledávání drogy**“ (Conditioned Place Preference Test, CPP), test na aktivní vyhledávání drog,
- „**Test sociálních interakcí**“ (Social Interaction test, SIT), test na vzájemné chování dvou jedinců,
- „**Test Laboras**“ – modifikovaný „open field“, test na chování jedince v neznámém prostředí,
- „**Test Morrisova vodního bludiště**“ (Morris Water Maze, MWM), test na prostorové učení a paměť.

Práce přispěje k objasnění mechanismů vzniku drogové závislosti a jejích negativních následků a tím prohloubí dosavadní poznatky v oblasti drogové závislosti.

5 MATERIÁL A METODIKA

5.1 CHOV LABORATORNÍCH ZVÍŘAT

Dospělí samci (350-400 g) a samice (250-300 g) laboratorního potkana kmene Wistar pocházeli z Charles River Laboratories International, Inc., dodáni byli chovnou stanicí Anlab, s.r.o. (Praha, Česká republika). Zvířata byla ustájena do plastových klecí o rozměrech 45 cm x 30 cm x 20 cm separátně podle pohlaví, samci v počtu 4 na klec, samice v počtu 5 na klec. Klece se zvířaty byly umístěny v klimatizované místnosti s kontrolovanou konstantní teplotou (24 ºC) a standardním světelným cyklem 12 h světlo:12 h tma s počátkem světelné fáze v 6:00 h ráno. Zvířata byla po dobu 2 týdnů ponechána v klidu s přístupem *ad libitum* ke krmení a vodě.

5.2 FERTILIZACE

Po aklimatizaci jsme samice zvážili a pomocí vaginálního výplachu u nich určili fázi estrálního cyklu (metestrus, diestrus, proestrus, estrus). Samice, nacházející se v plodné fázi reprodukčního cyklu (proestrus, estrus), byla na noc vložena do klece k pohlavně zralému samci. Následující den jsme na základě přítomnosti spermií ve vaginálním výplachu ověřili fertilizaci a označili jako první den gestace (embryonální den, ED 1). Poté byly samice navráceny do svých původních klecí. Fázi estrálního cyklu jsme u oplodněných samic sledovali a kontrolovali ještě následujících 5 až 6 dnů (přibližná délka jednoho cyklu) abychom potvrdili úspěšnost fertilizace a mohli tak s přesností určit začátek a průběh gestace.

5.3 PRENATÁLNÍ A POSTNATÁLNÍ PÉČE

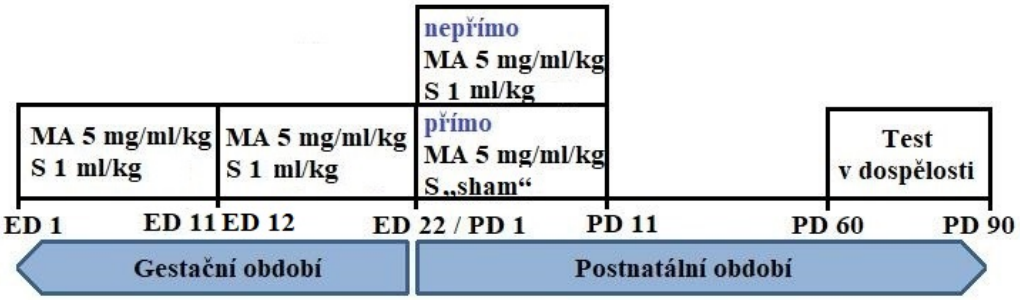
Předmětem této disertační práce je porovnání MA aplikace v dospělosti po předešlém exponování zvířat tou samou drogou v různých stadiích jejich neuro-ontogenetického vývoje a stanovit tak období nejcitlivější pro vznik negativních účinků této drogy. Jelikož je známo, že mláďata laboratorního potkana dosahují zralosti odpovídající zralosti lidských novorozenců přibližně v postnatální den 10-12 (jednotlivé části mozku dozrávají i později) (Clancy *et al.* 2007), rozhodli jsme se proto gravidní samice od prvního dne gestace (ED 1)

rozdělit do skupin a exponovat je látkám tak, aby vývojová období (prenatální a časně postnatální) u laboratorního potkana přibližně odpovídala trimestrům prenatálního vývoje u člověka (Obr. 5.1):

(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 laktační 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** mláďatům subkutánně.

Podle rozdělení do jednotlivých aplikačních fází (prenatální nebo časná laktační perioda) byly tyto samice a mláďata (3. trimestr – přímá aplikace) rozděleny v každé aplikační periodě na dvě skupiny: experimentální skupina matek a mláďat, které jsme exponovali účinkům **MA**; nebo kontrolní skupina matek a mláďat, kterým byl podáván fyziologický roztok nebo „sham“ (**S**). D-metamfetamin HCl byl dodán firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Samice, ovlivněny MA, dostávaly drogu subkutánně (s.c.) v dané aplikační periodě vždy 1x denně, v přibližně stejnou dobu v dávce 5 mg/ml/kg. Tato dávka je koncentrována v mozku plodu v takové hodnotě, která odpovídá hodnotám naměřeným u plodů drogově závislých matek (Acuff-Smith *et al.* 1996; Rambousek *et al.* 2014). Toto dávkování proto slouží jako vhodný experimentální model pro stanovení rizik expozice účinkům drogy *in utero*. Kontrolní skupině samic v každé aplikační periodě byl ve stejný čas, stejnou metodou aplikován S (1 ml/kg) (Obr. 5.1). Obě skupiny matek s prenatální aplikací, skupina matek, kde se přenášel účinek drogy nepřímo prostřednictvím mateřského mléka a skupina mláďat, která byla během časné laktační periody exponována přímo vpichem, byly každý den během experimentu váženy a byl sledován hmotnostní přírůstek.

V gestační den 21 jsme gravidní samice přemístili po jedné do „mateřských‘‘ klecí. Den porodu jsme označili jako PD 0.

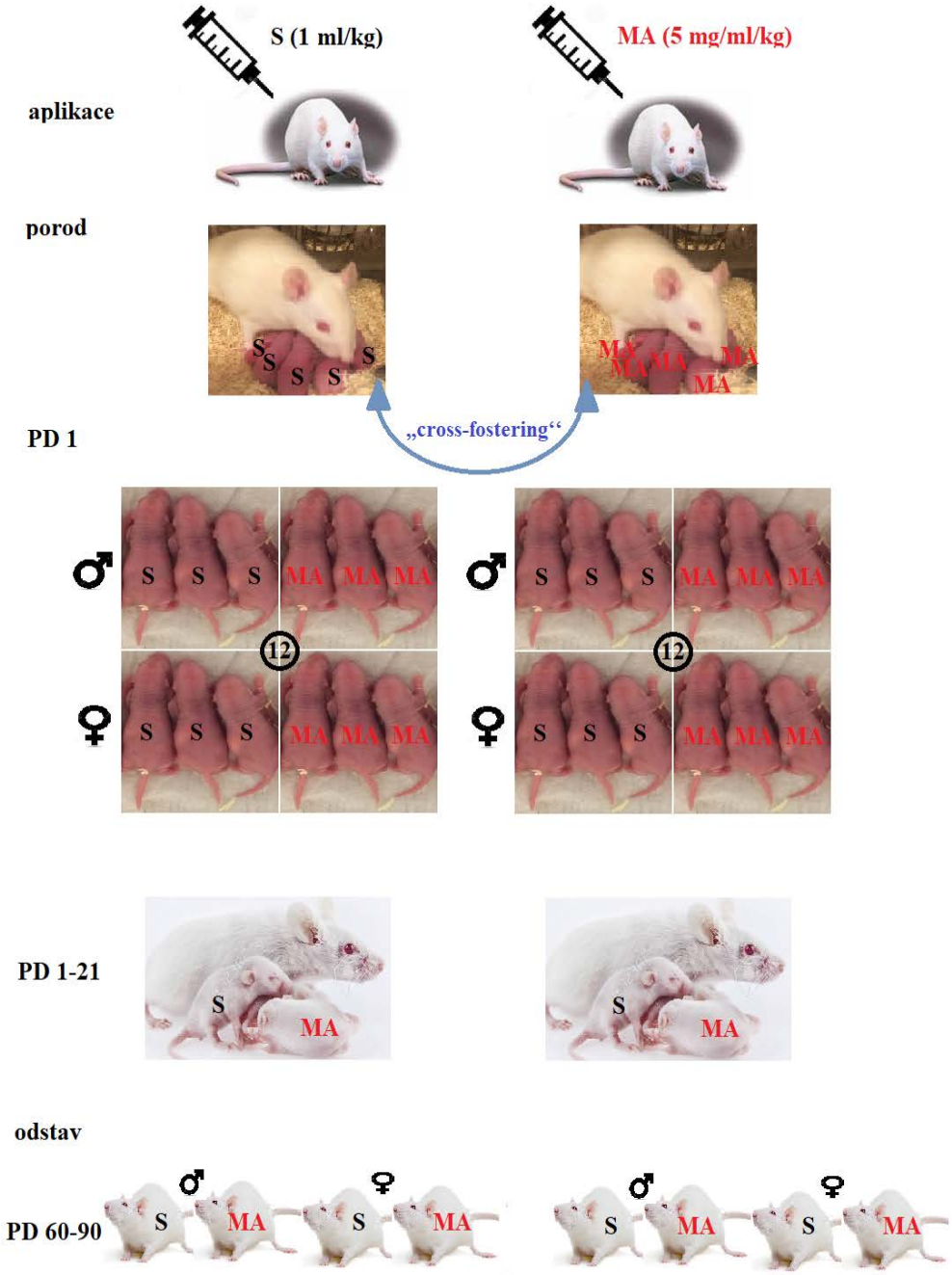


Obr. 5.1 Aplikační periody během gestace a časné laktace. ED - embryonální den, PD – postnatální den, S – fyziologický roztok, sham, MA – metamfetamin.

V PD 1 jsme nejdříve mláďata označili podle druhu expozice intradermální aplikací tetovacího inkoustu: MA skupina byla označena na levé zadní tlapce; S skupina byla označena na pravé zadní tlapce. Poté, abychom eliminovali vliv rozdílného mateřského chování a péče způsobené podáváním drogy (Šlamberová et al. 2005, Holson and Pearce 1992), jsme provedli „cross-fostering‘‘(Obr. 5.2) u matek, kterým byla během gestačního období aplikována droga (ED 1-11, ED 12-22). „Cross-fostering‘‘ jsme provedli tak, že jsme jedné matce ponechali její vlastní 3 samce a 3 samice a další 3 samci a 3 samice s odlišnou aplikací od jiné matky ze stejné aplikační periody byli o tohoto hnízda přidáni. Každá matka tedy vychovávala 12 mláďat, 6 vlastních, 6 adoptivních s opačnou aplikační látkou. U skupiny matek, kterým byla droga aplikována až po porodu (PD 1-11) a skupiny intaktních matek (PD 1-11) jsme neprovedli „cross-fostering‘‘, ale přizpůsobili jsme počty mláďat v hnízdě na 6 samců a 6 samic. V každém vrhu byla použita 4 zvířata pro jeden typ testu v dospělosti. 2 samci, každý s rozdílnou aplikační látkou a 2 samice, každá s rozdílnou aplikační látkou. Na základě prenatální a časné neonatální expozice jsme tedy dostali 8 experimentálních skupin (Obr. 5.2).

V PD 21 byla mláďata od matek odstavena a každé mládě bylo označeno propíchnutím uší podle matky, kterou bylo vychováno. Mláďatům, která vychovávala matka s aplikací MA, bylo propíchnuto levé ucho, mláďatům, která vychovávala matka s aplikací S, bylo propíchnuto pravé ucho. Mláďata byla poté rozdělena podle pohlaví a umístěna do klecí po 4 samcích a 5 samicích

a ponechána v klidu až do PD 60, do období dospělosti s potravou a vodou v dostupnosti *ad libitum*.



Obr. 5.2 „Cross-fostering“. S – fyziologický roztok, MA – metamfetamin, PD – postnatální den.

5.4 APLIKACE V DOSPĚLOSTI

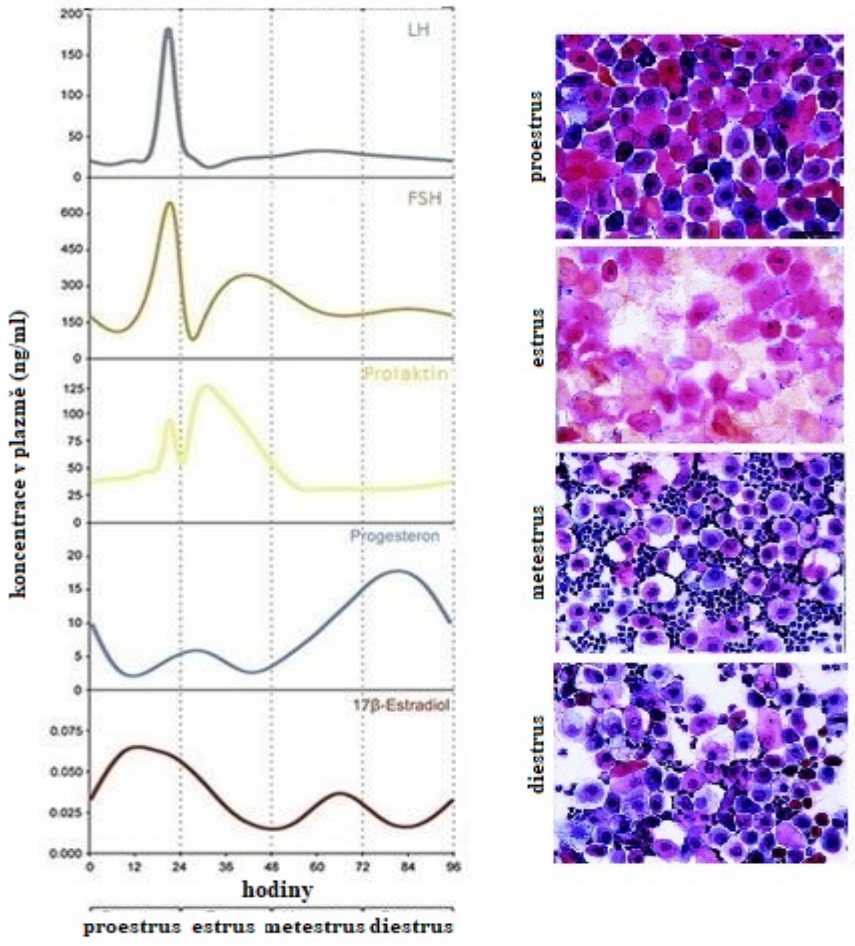
Vliv prenatální, neonatální a akutní aplikace drogy v dospělosti jsme testovali behaviorálními testy na potomcích ovlivněných matek. Pro objasnění mezipohlavních rozdílů v účinku MA byli testováni jak samci, tak samice. Abychom mohli otestovat citlivost potomků k MA v dospělosti, polovině zvířat z každé prenatálně 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). Tato dávka na rozdíl od vyšších dávek nezpůsobuje stereotypní formy chování a nenarušuje tím průběh testů (Kelly *et al.* 1975). Druhé polovině zvířat jsme aplikovali S ve stejné dávce a stejným způsobem. V testu sociálních interakcí jsme testované látky (MA, S) aplikovali 45 min. před testováním. V tomto čase dosahuje koncentrace MA v mozku při subkutánním podání svého maxima a behaviorální účinek je vyjádřen nejvíce (Rambousek *et al.* 2014). V testu Laboras jsme testované látky (MA, S) zvířatům aplikovali těsně před testováním, abychom mohli sledovat rozvoj behaviorální reakce v čase. V testu Morrisova vodního bludiště (MWM) jsme testované látky (MA, S) aplikovali každý den po ukončení plavání, resp. v období mezi testy v ten samý čas jako předešlé dny, abychom mohli sledovat vliv MA na konsolidaci prostorové paměti a droga nenarušila motorickou schopnost plavání.

V testu Podmíněného vyhledávání drogy (CPP) jsme aplikovali polovině zvířatům v každé aplikační periodě MA v dávce 5 mg/ml/kg. Naše předchozí výsledky (Šlamberová *et al.* 2011b) ukázaly, že dávka 1 mg/ml/kg nevyvolává preferenci drogy v testu CPP. Navíc dávka 5 mg/ml/kg odpovídá koncentracím v mozku u drogově závislých lidí a opakovaným podáváním vyvolává vznik drogové závislosti (Rambousek *et al.* 2014; Šlamberová *et al.* 2012; Šlamberová *et al.* 2011b). Druhé polovině zvířat (kontrolní skupina) jsme aplikovali S s.c. (1 ml/kg). Testované látky (MA, S) jsme podávali těsně před testem, abychom mohli vyvolat asociaci vzniku podmiňovaného odměňování a místa, kde postupně nastupoval účinek drogy.

5.5 FÁZE ESTRÁLNÍHO CYKLU

Z mnohých předcházejících studií je známé, že pohlavní hormony (estrogen) zvyšují senzitivitu na drogu. White *et al.* (2002) ve své studii poukazuje na korelaci mezi účinkem MA a reprodukčním cyklem ženy. Účinky drogy byly silnější v průběhu folikulární fáze v porovnání s fází luteální, citlivost pozitivně korelovala se zvýšenou hladinou estradiolu. Proto jsme v disertační práci také sledovali nejenom možné pohlavní rozdíly v účinku drogy na měřené parametry, ale u samic také vliv samičích pohlavních hormonů.

Na základě kolísaní hladin estrogenu a progesteronu se mění zastoupení a poměr buněk v cytologickém vzorku (Obr. 5.3): ve fázi metestrus až diestrus (M/D) je hladina estrogenu a progesteronu nízká, ve vzorku se nachází četné leukocyty a velmi málo, nebo žádné zrohovatělé degenerované epiteliální buňky; ve fázi proestrus až estrus (P/E) je hladina pohlavních hormonů nejvyšší, ve vzorku se nenacházejí žádné, nebo jen velmi málo leukocytů a epiteliální buňky mají pravidelný kubický tvar a tvoří většinu vzorku (Hubscher *et al.* 2005; Marcondes *et al.* 2002; Simpson *et al.* 2012). U pohlavně intaktních samic byl tedy proveden vaginální výplach vždy ráno v den testu a pomocí světelného mikroskopu (40 x zvětšení) byla stanovena fáze estrálního cyklu. Samice byly poté v klecích přeneseny do testovací místnosti a ponechány v klidu minimálně po dobu jedné hodiny, aby se eliminoval účinek stresu z provedení vaginálního výplachu. Samice byly zařazeny do skupiny s fázi M/D nebo P/E a následně testována příslušným testem. Protože testování jedné samice v testu Podmíněného vyhledávání drogy (CPP) trvalo několik dnů a samotný test má více fází, otestovali jsme samice z praktického důvodu bez ohledu na fázi estrálního cyklu.



Obr. 5.3 Korelace kolísaní hladin samičích pohlavních hormonů a změn v cytologickém vzorku v průběhu estrálního cyklu. LH – luteinizační hormon; FSH – folikulostimulační hormon. Upraveno podle Hubscher *et al.* (2005).

5.6 EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY

Účinky prenatální, neonatální a akutní aplikace MA jsme testovali, jak už bylo naznačeno výše, na dospělých samčích a samičích potomcích (PD 60-90).

U **samců** jsme na základě aplikační periody testovali 4 skupiny (ED 1-11, ED 12-22, PD 1-11 nepřímá aplikace, PD 1-11 přímá aplikace). Každou z těchto skupin jsme rozdělili na půlku podle typu exponované látky (MA, S), čímž jsme dostali 8 skupin (ED 1-11 MA, ED 1-11 S; ED 12-22 MA, ED 12-22 S; PD 1-11 nepřímá aplikace MA, PD 1-11 nepřímá aplikace S; PD 1-11 přímá aplikace MA, PD 1-11 přímá aplikace S). Těchto osm skupin jsme následně rozdělili podle

aplikace v dospělosti (MA, S), čímž jsme v konečném důsledku dostali 16 testovacích skupin samců (n=8 samců, pro SIT n=8 párů samců) na jeden typ behaviorálního testu.

U **samic,** co se týče testu, ve kterém nebyla zohledněna fáze estrálního cyklu (CPP), probíhalo postupné rozdělení do skupin stejným způsobem jako u samců. Dostali jsme tedy 16 testovacích skupin (n=10 samic) na jeden typ behaviorálního testu. Stejné rozdělení samic do skupin proběhlo v testu MWM, fázi estrálního cyklu jsme zohledňovali až ve statistické analýze při vyhodnocování výsledků (n=8 samic). V jednodenních testech, ve kterých jsme zohledňovali i fázi reprodukčního cyklu při zařazení do experimentálních skupin (Laboras, SIT) probíhalo rozdělení do 16 skupin stejně, jako je uvedeno výše. V testě Laboras jsme těchto 16 skupin ještě rozdělili na polovinu fází estrálního cyklu (M/D, P/E), čímž jsme dostali 32 skupin (n=10). V testu Sociálních interakcí (SIT) jsme také zohledňovali fázi estrálního cyklu, rozdělení do skupin probíhalo stejně jako v testu Laboras. Dostali jsme 32 skupin, ale s tím, že protože se jedná o test vzájemných interakcí zvířat, byl počet tvořený párem zvířat (n=4 páry samic).

Počty zvířat experimentálních skupin použitých v jednotlivých behaviorálních testech jsou zobrazeny v tabulkách č. 5.1, 5.2, 5.3, 5.4.

Tab. 5.1 Počet zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách v testu Podmíněného vyhledávání drogy (CPP) podle prenatální/neonatální expozice (MA 5 mg/ml/kg, S 1 ml/kg, „sham“) a akutní aplikace v dospělosti (MA 5 mg/ml/kg, S 1 ml/kg). Počet zvířat použitých v experimentu je 288.(MA 5 mg/ml/kg, S 1 ml/kg). Počet zvířat použitých v experimentu je 288.

	Prenatální expozice				Neonatální expozice			
Akutní aplikace	ED 1-11		ED 12-22		PD 1-11 nepřímo		PD 1-11 přímo	
v dospělosti	S	MA	S	MA	S	MA	S	MA
S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S
♂	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
♀	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA
♂	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
♀	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
počet zvířat							n=288	

Tab. 5.2 Počet zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách v testu Sociálních interakcí podle prenatální/neonatální expozice (MA 5 mg/ml/kg, S 1 ml/kg, „sham“) a akutní aplikace v dospělosti (MA 1 mg/ml/kg, S 1 ml/kg). Počet zvířat použitých v experimentu je 512.

	Prenatální expozice				Neonatální expozice			
Akutní aplikace	ED 1-11		ED 12-22		PD 1-11 nepřímo		PD 1-11 přímo	
v dospělosti	S	MA	S	MA	S	MA	S	MA
S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S
♂	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů
♀ M/D	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry
♀ P/E	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry
MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA
♂	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů	n=8 párů
♀ M/D	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry
♀ P/E	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry	n=4 páry
počet zvířat							n=512	

Tab. 5.3 Počet zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách v testu Laboras podle prenatální/neonatální expozice (MA 5 mg/ml/kg, S 1 ml/kg, „sham“) a akutní aplikace v dospělosti (MA 1 mg/ml/kg, S 1 ml/kg). Počet zvířat použitých v experimentu je 448.

	Prenatální expozice				Neonatální expozice			
Akutní aplikace	ED 1-11		ED 12-22		PD 1-11 nepřímo		PD 1-11 přímo	
v dospělosti	S	MA	S	MA	S	MA	S	MA
S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S
♂	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
♀ M/D	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
♀ P/E	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA
♂	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
♀ M/D	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
♀ P/E	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
počet zvířat							n=448	

Tab. 5.4 Počet zvířat v jednotlivých experimentálních skupinách v testu Morrisova vodního bludiště (MWM) podle prenatální/neonatální expozice (MA 5 mg/ml/kg, S 1 ml/kg, „sham“) a akutní aplikace v dospělosti (MA 1 mg/ml/kg, S 1 ml/kg). Počet zvířat použitých v experimentu je 256.

	Prenatální expozice				Neonatální expozice			
Akutní aplikace	ED 1-11		ED 12-22		PD 1-11 nepřímo		PD 1-11 přímo	
v dospělosti	S	MA	S	MA	S	MA	S	MA
S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S	S/S	MA/S
♂	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
♀	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA	S/MA	MA/MA
♂	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8	n=8
♀	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10	n=10
počet zvířat							n=256	

5.7 BEHAVIORÁLNÍ TESTY

Dospělí samci a samice byli testováni na aktivní vyhledávaní drogy, na sociální chování, lokomoci a explorační chování v neznámém prostředí a také jsme sledovali vliv MA na kognitivní funkce. Hodinu před testováním byla zvířata přemístěná do testovací místnosti, aby se aklimatizovala a minimalizoval se tak vliv stresu z přesunu.

5.7.1 Test podmíněného vyhledávání drogy (CPP)

Dospělé samce a samice jsme testovali na aktivní podmíněné vyhledávání drogy v modifikované aparatuře na základě studie Sanchez *et al.* (2003). CPP aparatura (Obr. 5.4) je vytvořena z plexiskla, kde centrální komora (neutrální zóna) (15 cm x 25 cm x 25 cm) a dvě postranní komory (25 cm x 25 cm x 25 cm) jsou od sebe navzájem odděleny odstranitelnými dvířky. Stěny postranních komor jsou potaženy černo-bílou šrafovanou tapetou (jedna komora s horizontálními liniemi, druhá komora s vertikálními). Neutrální komora je šedá.

CPP test probíhá po dobu 10 dní za nízkých světelných podmínek. Skládá se ze 3 fází: pre-expozice, navykání (podmiňování) „conditioning‘‘, a vlastní CPP test (Mueller and Stewart 2000; Šlamberová *et al.* 2011b). **Pre-expozice:** první den pokusu jsou zvířata (každé zvlášť) podrobena jednomu testu bez aplikace drogy. Zvíře se umístí do centrální (neutrální) komory a dveře zůstanou během tohoto 15-min pokusu otevřené. Sleduje se volný pohyb zvířete, zaznamenává se volba komor, počet vstupů do jednotlivých komor a čas strávený v konkrétní komoře. Tato data nám slouží jako výchozí, určují základní, nepodmíněné preference zvířete. **Podmiňování:** během fáze navykání (8 dní) jsou zvířata každý den umístěna střídavě do jedné z komor (jeden den levá, druhý den pravá komora) a je jim těsně před vložením do komory aplikován MA (5 mg/ml/kg) nebo S (1 ml/kg). Vždy jedna z komor je asociována s aplikací drogy, druhá s aplikací S (pro každou polovinu zvířat ze skupiny jinak). Zvířata stráví v postranních komorách vždy 1 hodinu denně, přičemž dvířka do centrální komory jsou zavřená. Polovina zvířat je tedy exponována drogou v té samé komoře 1., 3., 5. a 7. den a v ostatní dny obdrží S, který je aplikován před umístěním do druhé komory, opačné jako komora, ve které proběhlo asociování s drogou. Druhá polovina zvířat ze skupiny je exponována droze 2., 4., 6., a 8. den. **CPP test:** probíhá dva

dny po posledním z navykacích testů. Test má stejný průběh jako test v první den experimentu. Zvířatům před samotným testem není aplikována žádná látka. Zvíře umístíme do centrální komory s otevřenými dvířky do postranních komor, čímž mu je umožněn volný pohyb. Po dobu 15 minut je zaznamenáván počet vstupů a délka pobytu v jednotlivých komorách. Na základě porovnání dat z prvního a posledního dne testu zhodnotíme, zda zvíře vyhledává více komoru, kde dostávalo drogu či nikoliv.

Obr. 5.4 Test podmíněného vyhledávání drogy.

5.7.2 Test sociálních interakcí (SIT)

Pro testování sociálního chování jsme zvolili test podle File (1978) (Obr. 5.5). Test byl koncipován na tři po sobě následující dny. Probíhá za nízké světelné intenzity přibližně v ten stejný čas. První dva dny jsme zvířata habituovali vložením do arény na 10 minut. Na třetí den jsme zvířata v 6:00 separovali každé zvlášť do laboratorní klece. Po dvou hodinách jsme postupně v 10-minutových intervalech začali vždy jednomu páru testovaných zvířat aplikovat látky. Dvě sobě neznámá zvířata jsme spárovali na základě stejného pohlaví, přibližně stejné hmotnosti, stejné aplikace a u samic taky na základě stejné fáze estrálního cyklu. Až do doby, kdy jsme zvířata vkládali do arény na

SIT, byla separovaná po jednom v kleci. Po uplynutí 45 minut od aplikace jsme vždy vložili daný pár zvířat na 5 minut do arény a videokamerou jsme zaznamenávali jejich vzájemné chování. Videozáznam byl vyhodnocen pomocí počítačového programu ODLog (Macropod Software). Pozorovali jsme vzájemnou interakci obou jedinců. Hodnocenými parametry byly: a) aktivní sociální interakce - vzájemné očichávání, genitální očichávání, šplhání, podlézání, následování; b) nesociální aktivity – lokomoce, vztyčování.

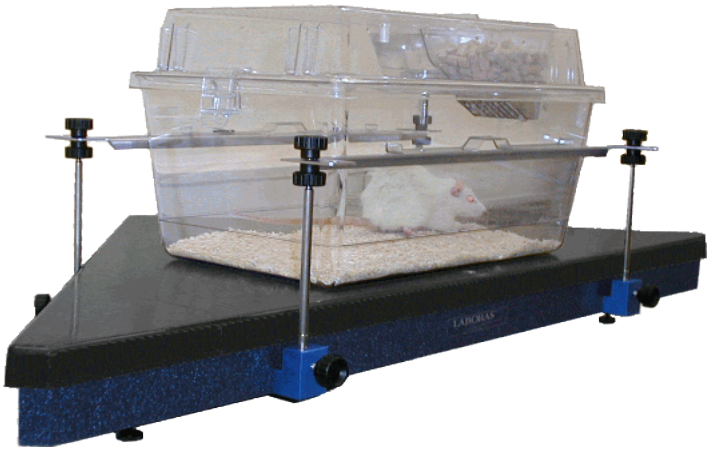
Obr. 5. 5 Test sociálních interakcí.

5.7.3 Test Laboras

Laboras (Metris B. V., Holandsko) (Obr. 5.6) je plně automatický systém sloužící k dlouhodobému monitorování chování malých hlodavců (Schutová *et al.* 2013). Umožňuje počítačové vyhodnocování pohybové aktivity laboratorního potkana v neznámém prostředí, ale s domácími podmínkami (klec s výstelkou, pitím a potravou). Zařízení sestává z průhledného akvária (45 x 25 x 30 cm) umístěného na speciální podkladové plošině propojené s počítačem. Princip vyhodnocování spočívá v rozeznávání pohybové aktivity potkana Laboras softwarem na základě vibrací registrovaných plošinou, takže je možné sledovat několik druhů aktivit, jejich frekvenci, trvání a rychlost pohybu.

Test probíhá za podmínek nízké světelné intenzity, zvířata jsou vystavena neznámému prostředí akvária, neboť před testováním nejsou zvířata habituována danému prostředí. Těsně před vložením zvířata do akvária se aplikuje testovaná

látka (MA, S), zvíře jsme umístili do akvária a po dobu 1 hodiny zaznamenávali jeho aktivitu. Vyhodnocovali jsme následující parametry v 10-minutových intervalech: vzdálenost [m], čas strávený lokomocí [s], průměrnou rychlost pohybu [mm/s], čas strávený vztyčováním (explorační chování) [s].



Obr. 5.6 Test Laboras (Metris B.V., Holandsko).

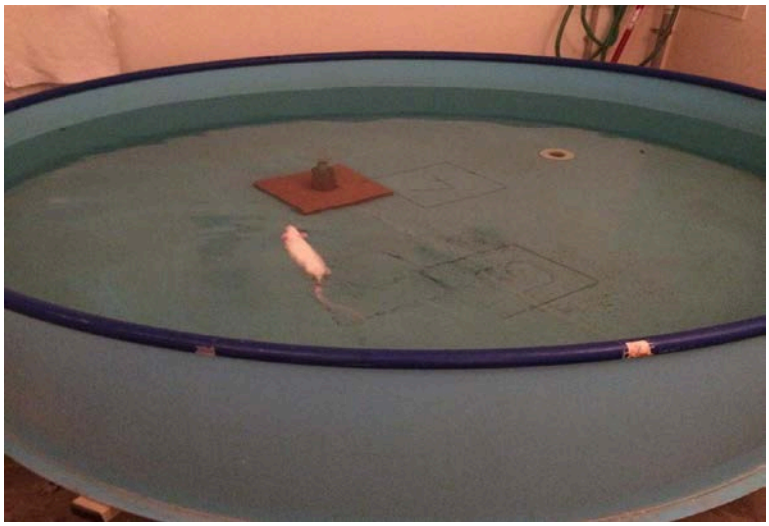
5.7.4 Test Morrisova vodního bludiště (MWM)

Kognitivní funkce (učení a paměť) jsme u dospělých samců a samic testovali v Morrisově vodním bludišti (Morris Water Maze – MWM) (Obr. 5.7) (Morris 1984; Stuchlík 2003). MWM je kruhový bazén o průměru 2 m, naplněný vodou (15 cm pod horní okraj bazénu) se stálou teplotou (18-20 ºC). Na okraji bazénu jsou označeny 4 startovní pozice: (S) sever, (J) jih, (V) východ, (Z) západ, které rozdělují bazén na 4 kvadranty. V S-V kvadrantu je umístěn ostrůvek z průhledného plastu (13 cm v průměru) asi 1-2 cm pod vodní hladinou, aby byl pro zvíře neviditelný. V místnosti, kde je bazén umístěn, jsou na zdech kolem MWM strategicky rozmístěny různé obrázky, které slouží jako orientační body pro navigaci zvířete a tvorbu prostorové mapy. Plavání potkanů je zaznamenáno automaticky za pomoci kamery umístěné nad bazénem a vyhodnocováno programem EthoVision 10 (Noldus Information Technology, Holandsko). 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. Během celého testu MWM (12 dnů) jsme zvířatům aplikovali MA (1 mg/ml/kg) nebo S (1 ml/kg) každý den po skončení testu a i v období mezi testy (Tab. 5.5).

Tab. 5.5 Kognitivní testy v MWM. Potkanovi byla aplikována dávka MA (1 mg/ml/kg) nebo S (1 ml/kg) každý den po skončení testu a i v období mezi testy.

TEST	UČENÍ							„PROBE“				PAMĚŤ
DEN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aplikace v dospělosti	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	



Obr. 5.7 Morrisovo vodní bludiště.

5.7.4.1 Učení

V testu učení se zvíře v průběhu 6 po sobě navazujících dní učilo nalézt v co nejkratším časovém intervalu skrytý ostrůvek a zapamatovat si jeho polohu. Pozice ostrůvku byla během celého testu stejná. Každé zvíře absolvovalo test 8 krát denně, ze 4 startovních pozic v pořadí S, J, V, Z, s opakovaným cyklem (2 x). Maximální limit pro nalezení ostrůvku byl 60 s. V případě, že potkan během časového limitu ostrůvek nenašel, byl naveden na ostrůvek manuálně. Mezi plaváním z jednotlivých startovních pozic bylo zvíře ponecháno na ostrůvku

po dobu 30 s, aby si zmapovalo prostředí a vytvořilo tak prostorovou mapu na orientaci a aby si také odpočalo a výsledky nebyly zkresleny jeho vyčerpáním.

5.7.4.2 Probe test

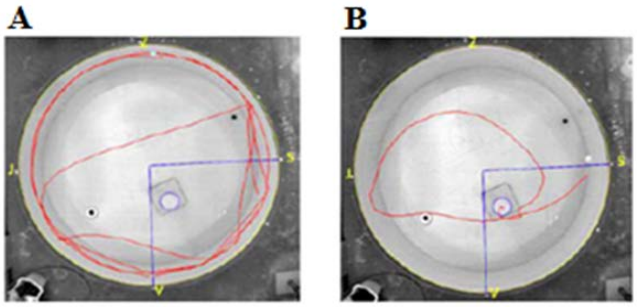
8. den byl u všech testovaných zvířat proveden kontrolní „probe“ test, pomocí kterého jsme sledovali a ověřovali, zda se zvíře opravdu naučilo polohu skrytého ostrůvku na základě vytvoření kognitivní prostorové mapy. V tomto testu byl na začátku před testováním ostrůvek odstraněn z bazénu. Zvíře bylo vloženo do MWM, kde volně plavalo po dobu 60 s. Pokud si zvíře lokalizaci ostrůvku pamatovalo, tak v cílovém kvadrantu strávilo více času a nejčastěji do tohoto kvadrantu vstupovalo.

5.7.4.3 Test paměti

12. den testu MWM probíhal test paměti, ve kterém jsme testovali dlouhodobou paměť. Potkani měli za úkol v co nejkratším časovém limitu najít skrytý ostrůvek. Pozice ostrůvku byla během celého testu stejná. Každé zvíře absolvovalo test 8 krát, ze 4 startovních pozic v pořadí S, J, V, Z, s opakovaným cyklem (2 x). Maximální limit pro nalezení ostrůvku byl 60 s.

5.7.4.4 Hodnocené parametry v testu MWM

V testu učení a paměti byly hodnoceny následující parametry: vzdálenost, než našlo zvíře ostrůvek [cm], chyba hledání – součet přímých vzdáleností od ostrůvku naměřených opakovaně v průběhu hledání („search error‘‘) [cm], čas (latence), za který zvíře nalezlo ostrůvek [s], rychlost plavání [cm/s]. Ve dnech 1, 3, 6 v testu učení a na 12. den v testu paměti jsme navíc u testovaných zvířat hodnotili i použité <u>strategie hledání ostrůvku</u>. Vyhodnocení strategií probíhalo manuálně, na základě obrazového záznamu v programu EthoVision, přičemž jsme využili novou klasifikaci strategií na základě aktuální verze programu (EthoVision 10) (Janus 2004; Macúchová *et al.* 2017). Hodnoceny byly tyto strategie (Obr. 5.8): <u>tigmotaxe</u> – přetrvávající plavání podél okraje bazénu s ojedinělým plaváním do středu a <u>skenování</u> – neorganizované plavání v centru bazénu a náhodné nalezení ostrůvku.



Obr. 5.8 Strategie hledání ostrůvku v MWM během fáze učení a paměti. A. Tigmotaxe. B. Skenování.

V testu „probe“ jsme sledovali tyto parametry: délka uplavané trajektorie [cm], rychlost plavání [cm/s], počet křížení původní polohy ostrůvku, počet vstupů a čas strávený v kvadrantu, ve kterém byl ostrůvek umístěný, počet vstupů a čas strávený v kvadrantu, který byl naproti kvadrantu, ve kterém byl ostrůvek umístěný.

5.8 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 pomoci Analýzy rozptylu (ANOVA) s následným Bonferroniho *post-hoc* testem. Četnost výskytu jevu byla porovnána pomocí Chi^2-testu. Za signifikantní jsme považovali rozdíly pokud $p<0,05$.

Data u testu ANOVA byla prezentována jako [F (N-1, n-N)=xx,xx; p<0,0x], kde F je hodnota testovaného kritéria, N-1 je stupeň volnosti skupin, n-N je stupeň volnosti individuálního subjektu a p je hladina významnosti.

Data u Chi^2-testu byla prezentována jako Chi^2 = xx,xx, p<0,0x, kde Chi^2 je testovací kritérium pro Chi^2, p je hladina významnosti.

V testu **CPP** jsme měřené parametry hodnotili 4-faktorovou ANOVOU (*Prenatální/Neonatální expozice* x *Komůrka s nebo bez aplikace drogy* x *Pohlaví* x *Aplikační perioda*) s opakovaným měřením (*Čas/Vstupy Pre-expozice test a CPP test*).

V testu sociálních interakcí (**SIT**) jsme získaná data porovnávali 4-faktorovým ANOVA testem (*Prenatální/Neonatální expozice* x *Aplikace v dospělosti* x *Pohlaví/Fáze estrálního cyklu* x *Aplikační perioda*).

V testu **Laboras** jsme měřené parametry vyhodnocovali v 6 10-minutových intervalech. Data jsme hodnotili 4-faktorovým ANOVA testem (*Prenatální/Neonatální expozice* x *Aplikace v dospělosti* x *Pohlaví/Fáze estrálního cyklu* x *Aplikační perioda*) s opakovaným měřením (*Interval*).

V testu **učení** jsme použili na analýzu dat 4-faktorový test ANOVA (*Prenatální/Neonatální expozice* x *Aplikace v dospělosti* x *Pohlaví/Fáze estrálního cyklu* x *Aplikační perioda*) s víceúrovňovým opakovaným měřením (*Dny* x *Pokusy*). **„Probe‘‘** test jsme vyhodnocovali pomocí 4-faktorového ANOVA testu (*Prenatální/Neonatální expozice* x *Aplikace v dospělosti* x *Pohlaví/Fáze estrálního cyklu* x *Aplikační perioda*). Pro vyhodnocení testu **paměti** jsme použili 4-faktorový test ANOVA (*Prenatální/Neonatální expozice* x *Aplikace v dospělosti* x *Pohlaví/Fáze estrálního cyklu* x *Aplikační perioda*) s opakovaným měřením (*Pokusy*).

Četnost výskytu použitých **strategií** jsme porovnali Chi^2-testem.

6 VÝSLEDKY

6.1 TEST PODMÍNĚNÉHO VYHLEDÁVÁNÍ DROGY (CPP)

6.1.1 Vliv prenatální expozice MA

Abychom mohli porovnat vliv prenatální expozice MA na podmíněné vyhledávání drogy u dospělých samců a samic, analyzovali jsme post-hoc testem počet vstupů a čas strávený v komoře, ve které byla během podmiňování podávána droga. Statistická analýza ukázala, že expozice MA během první (ED 1-11) a druhé (ED 12-22) poloviny gravidity nemá vliv na rozvoj drogové závislosti v dospělosti (Obr. 6.1).

6.1.2 Vliv neonatální expozice MA

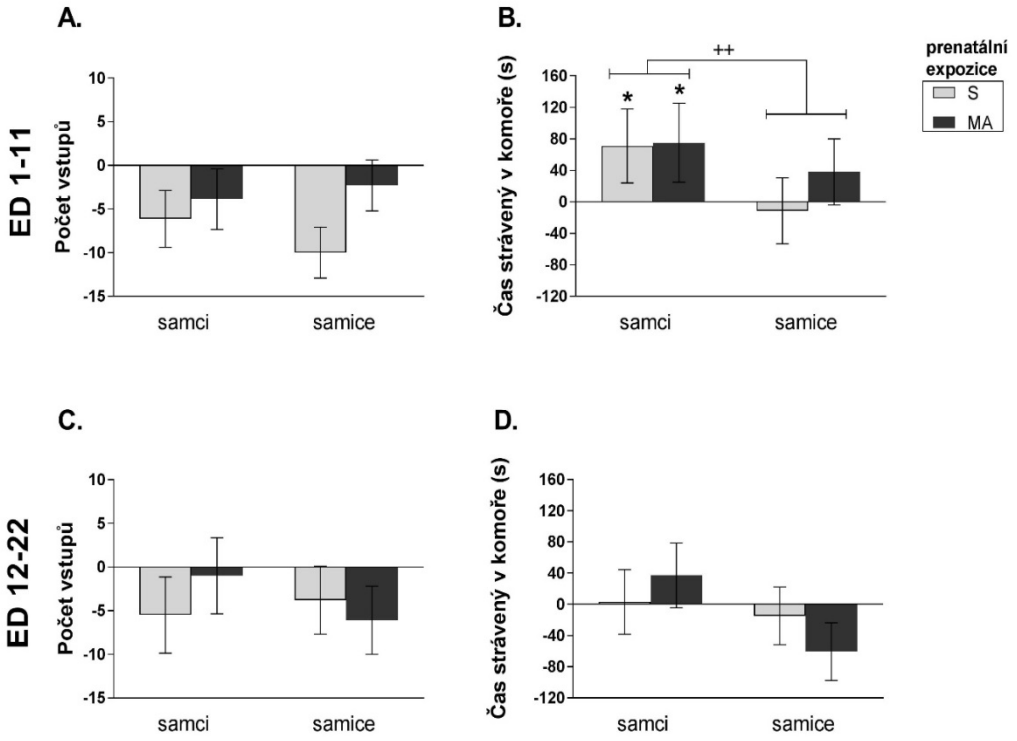
Jak je vidět na obrázku 6.2 B, neonatální nepřímá aplikace MA prostřednictvím mateřského mléka vedla u samců ke snížení času stráveného v komoře asociované s aplikací drogy během podmiňovanání [$F (3,270)=6,77$; $p<0,01$]. Přímá neonatální expozice MA neovlivnila aktivní vyhledávání drogy v dospělosti ani u samců, ani u samic (6.2 C, D).

6.1.3 Vliv podmiňování MA v dospělosti

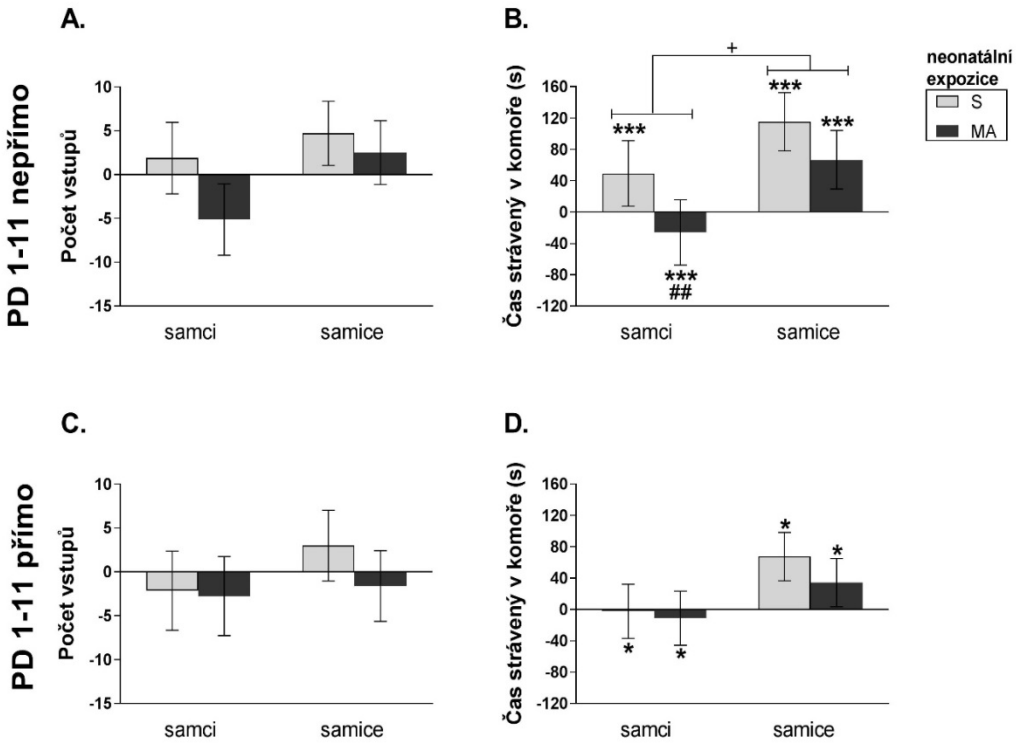
Výsledky testu ukázaly, že podmiňování MA v dospělosti vedlo k prodloužení času stráveného v komoře asociované s aplikací drogy u zvířat exponovaných během první poloviny gravidity [$F (3,270)=5,15$; $p<0,05$] (Obr. 6.1 B), u zvířat exponovaných neonatálně prostřednictvím nepřímé [$F (3,270)=12,38$; $p<0,001$] (Obr. 6.2 B) a přímé [$F (3,270)=7,03$; $p<0,05$] (Obr. 6.2 D) aplikace MA.

6.1.4 Vliv pohlaví

Statistické analýzy odhalily mezipohlavní rozdíly v čase stráveném v komoře asociované s aplikací drogy během podmiňování. U skupin zvířat exponovaných během první poloviny gravidity (ED 1-11) [$F (3,270)=11,03$; $p<0,01$] (Obr. 6.1 B) a během rané laktační periody (PD 1-11, nepřímá aplikace) [$F (3,270)=6,53$; $p<0,05$] (Obr. 6.2 B) samci strávili více času v těchto komorách než samice, a to bez ohledu na prenatální nebo neonatální expozici.



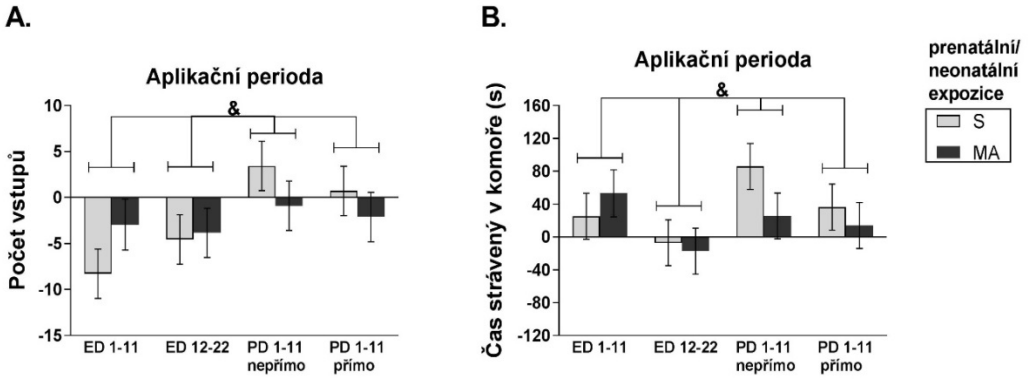
Obr. 6.1 Vliv **prenatální expozice MA** a **S** během první (**ED 1-11**) a druhé (**ED 12-22**) poloviny gravidity na MA-podmíněné vyhledávání drogy u dospělých samců a samic. Levá strana obrázku (**A, C**) – počet vstupů do komory asociované s aplikací drogy; pravá strana obrázku (**B, D**) – čas strávený v komoře asociované s aplikací drogy. Výsledky jsou prezentovány jako rozdíly mezi experimentálním dnem 12 (CPP test) a experimentálním dnem 1 (pre-expozice). Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 samců, 10 samic. *p<0,05 preference komory asociované s aplikací drogy v dospělosti; ++p<0,01 samci vs. samice.



Obr. 6.2 Vliv **neonatální nepřímé a přímé expozice MA** a **S** během **PD 1-11** na MA-podmíněné vyhledávání drogy u dospělých samců a samic. Levá strana obrázku (**A, C**) – počet vstupů do komory asociované s aplikací drogy; pravá strana obrázku (**B, D**) – čas strávený v komoře asociované s aplikací drogy. Výsledky jsou prezentovány jako rozdíly mezi experimentálním dnem 12 (CPP test) a experimentálním dnem 1 (pre-expozice). Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 samců, 10 samic. ##p<0,01 neonatální MA vs. S; *p<0,05, ***p<0,001 preference komory asociované s aplikací drogy v dospělosti; +p<0,05 samci vs. samice.

6.1.5 Vliv aplikační periody

Jedním z cílů práce bylo také zjistit, která z expozicí vystavených během různých neuro-ontogenetických stadií zvířat má zásadnější vliv na rozvoj drogové závislosti v dospělosti. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 6.3 A, B jako průměry jednotlivých aplikačních period. Analýzy dat ukázaly, že zvířata exponovaná během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka více vstupovala do komor asociovaných s aplikací drogy [F (3,270)=3,25; p<0,05] a také strávila v těchto komorách více času [F (3,270)=9,59; p<0,05] než zvířata exponovaná během jiných aplikačních období.



Obr. 6.3 Vliv **aplikační periody** na MA-podmíněné vyhledávání drogy u dospělých samců a samic. **A** – počet vstupů do komory asociované s aplikací drogy; **B** – čas strávený v komoře asociované s aplikací drogy. Výsledky jsou prezentovány jako rozdíly mezi experimentálním dnem 12 (CPP test) a experimentálním dnem 1 (pre-expozice). Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 samců, 10 samic. &p<0,05 PD 1-11 (nepřímo) vs. ostatní aplikační periody.

6.2 TEST SOCIÁLNÍCH INTERAKCÍ (SIT)

6.2.1 Sociální interakce

6.2.1.1 Vliv prenatální expozice MA

Jak ukazuje obrázek 6.4 B, prenatální MA podávaný během první poloviny gravidity (ED 1-11) vedl u dospělých samců ke snížení času stráveného genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,05] v porovnání s kontrolní skupinou. Expozice MA během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) neovlivnila sociální chování dospělých zvířat (Obr. 6.5).

6.2.1.2 Vliv neonatální expozice MA

Statistická analýza neodhalila vliv neonatální nepřímé expozice MA během PD 1-11 na sociální interakce mezi dvěma potkany v dospělosti (Obr. 6.6). Hlavní účinek neonatální přímé aplikace MA mláďatům s.c. byl nalezen u samic (Obr. 6.7). Tyto samice strávily méně času následováním se v porovnání se skupinou samic neonatálně ovlivněnou fyziologických roztokem [F (3,224)=1,21; p<0,01] (E).

6.2.1.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti

Výsledky analýz ukázaly, že akutní aplikace MA v dospělosti snižuje sociální aktivity 2 zvířat v porovnání s kontrolou.

Jak je znázorněno na Obr. 6.4, samci ovlivněni během ED 1-11 po akutním MA strávili méně času vzájemným očicháváním [F (3,224)=1,10; p<0,05] (A), méně času genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,01] (B) a méně šplhali jeden přes druhého [F (3,224)=1,94; p<0,05] (C). Akutní MA snížil také sociální kontakt u samic ovlivněných během stejné aplikační periody (ED 1-11). Tyto samice se méně vzájemně očichávaly [F (3,224)=1,10; p<0,01] (A) a strávily méně času genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,001] (B).

Hlavní účinek akutního MA se projevil také u skupiny zvířat prenatálně exponovaných během druhé poloviny gravidity (ED 12-22), (Obr. 6.5). U samců MA podaný v dospělosti zkrátil čas strávený vzájemným očicháváním [F (3,224)=1,10; p<0,05] (A), genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,01] (B) a šplháním [F (3,224)=1,94; p<0,05]. Samice strávily po podání akutního MA

méně času vzájemným očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,01] (A) a následováním se [F (3,224)=1,21; p<0,05] (E).

U skupiny zvířat neonatálně nepřímo exponovaných během PD 1-11 (Obr. 6.6) vedl akutní MA v dospělosti u samců ke snížení času stráveného vzájemným očicháváním [F (3,224)=1,10; p<0,01] (A) a genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,05] (B), u samic ke snížení času stráveného genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,001] (B).

Akutní aplikace MA v dospělosti indukuje také změny v sociálním chování u zvířat exponovaných během PD 1-11 přímo s.c. (Obr. 6.7). U skupiny samců po akutním MA klesl čas strávený vzájemným očicháváním [F (3,224)=1,10; p<0,05] (A), šplháním [F (3,224)=1,94; p<0,05] (C) a následováním se [F (3,224)=1,21; p<0,05] (E). U samic klesl čas strávený šplháním [F (3,224)=1,94; p<0,01] (C). Navíc byla u samic zjištěna interakce mezi aplikací v dospělosti a neonatální expozicí. Samice neonatálně ovlivněné MA po akutní aplikaci S strávily méně času genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,001] (B) než samice neonatálně ovlivněné fyziologickým roztokem.

6.2.1.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu

Statistické analýzy prokázaly mezipohlavní rozdíly v sociálním chování zvířat ze všech aplikačních period.

Samice ovlivněné během ED 1-11 (Obr. 6.4) strávily více času genitálním očicháváním než samci [F (3,224)=3,98; p<0,001] (B).

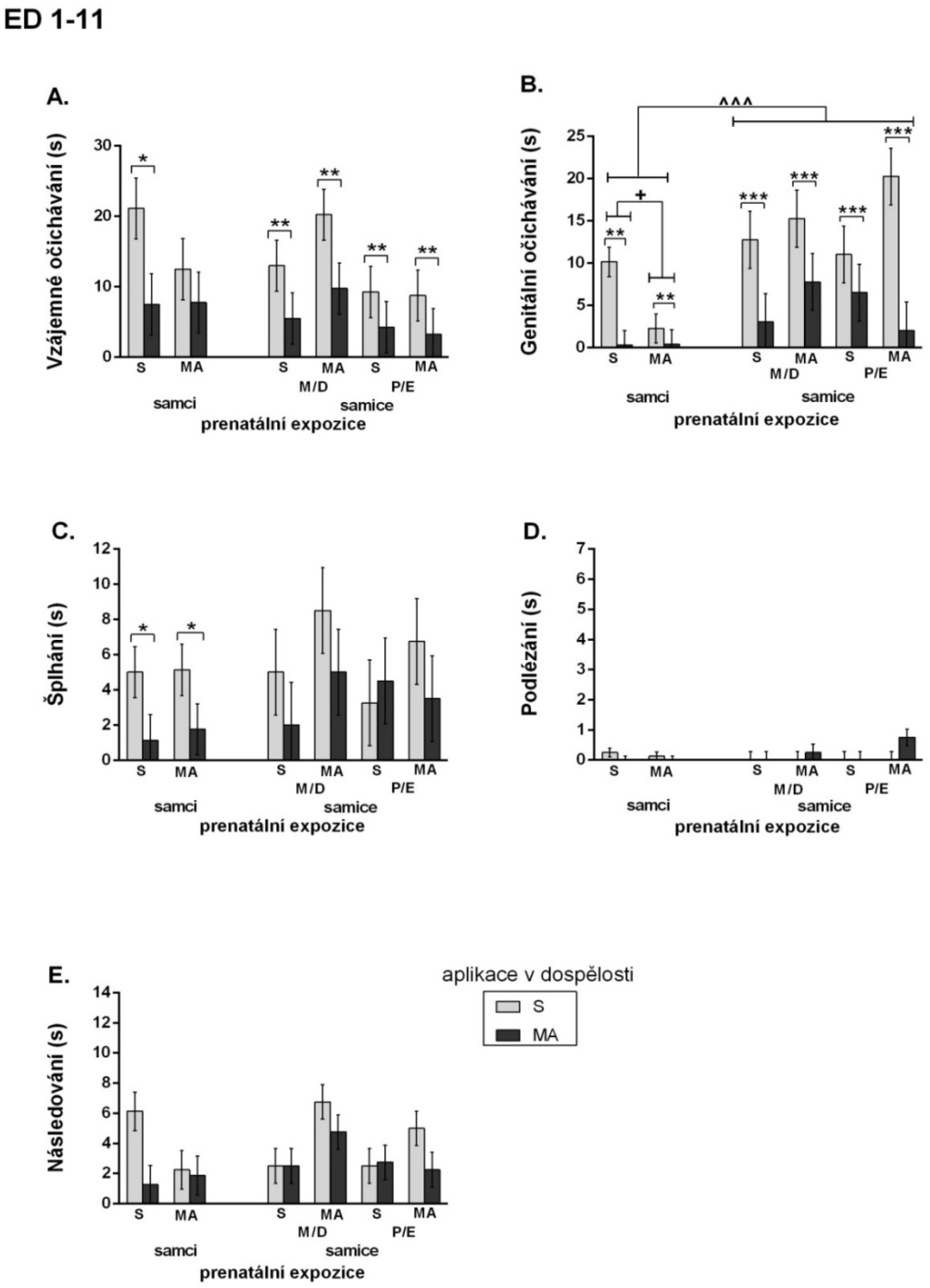
Také u skupiny zvířat exponovaných během ED 12-22 (Obr. 6.5) samice vyhledávaly kontakt té druhé více v porovnání se samci: genitální očichávání [F (3,224)=3,98; p<0,01] (B), následování se [F (3,224)=1,21; p<0,05] (E).

U skupin zvířat ovlivněných neonatálně nepřímo během PD 1-11 (Obr. 6.6) strávili samci více času vzájemným očicháváním [F (3,224)=1,10; p<0,001] (A) než samice. Samice na druhou stranu strávily více času genitálním očicháváním [F (3,224)=3,98; p<0,05] (B) v porovnání se samci.

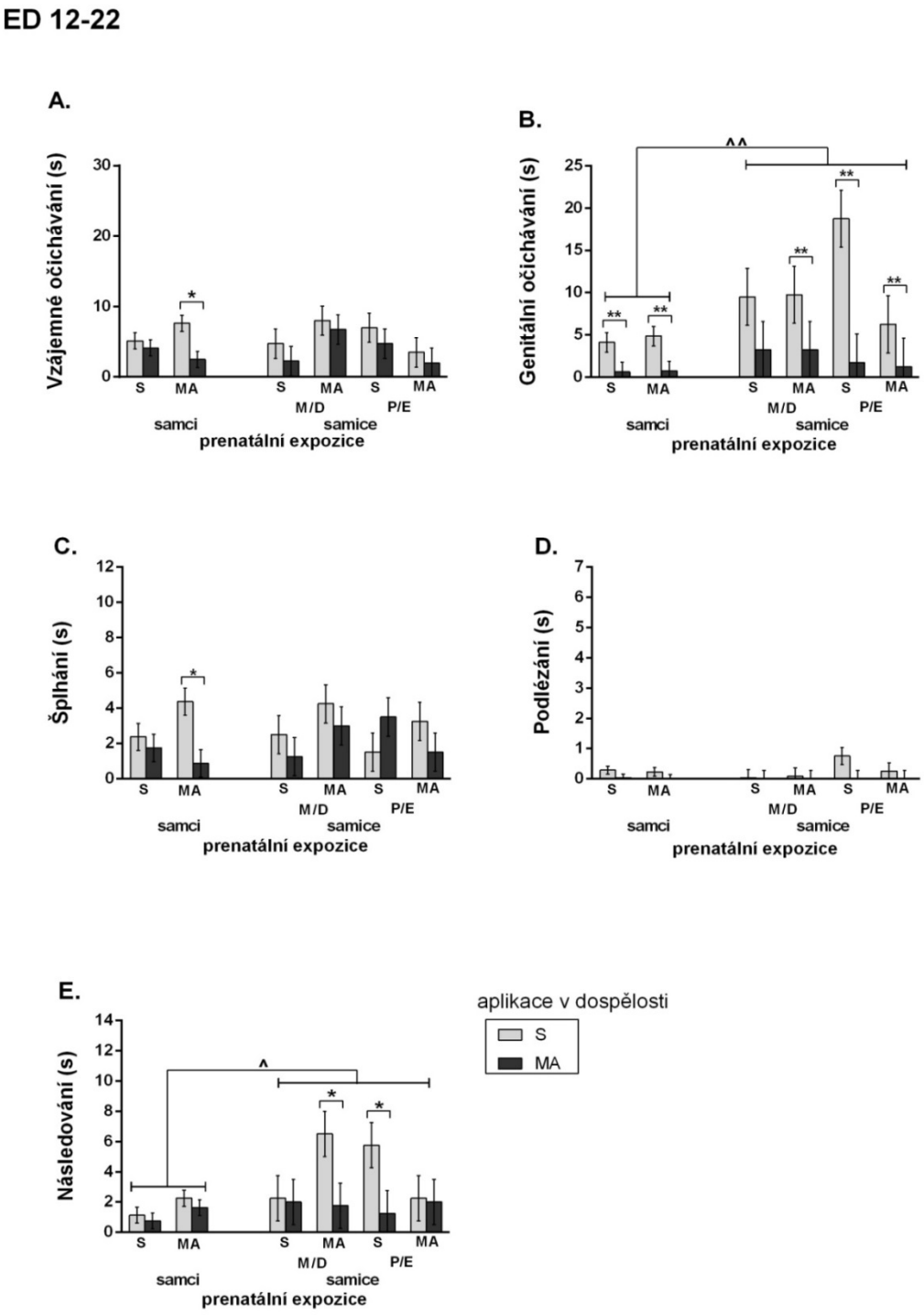
Samci s aplikací během PD 1-11 přímo s.c. (Obr. 6.7) strávili více času vzájemným očicháváním [F (3,224)=1,10; p<0,001] (A) než samice. Samice strávily zase více času podlézáním se [F (3,224)=1,28; p<0,001] (D)

a následováním se [F (3,224)=1,21; p<0,001] (E) než samci ze stejné aplikační periody.

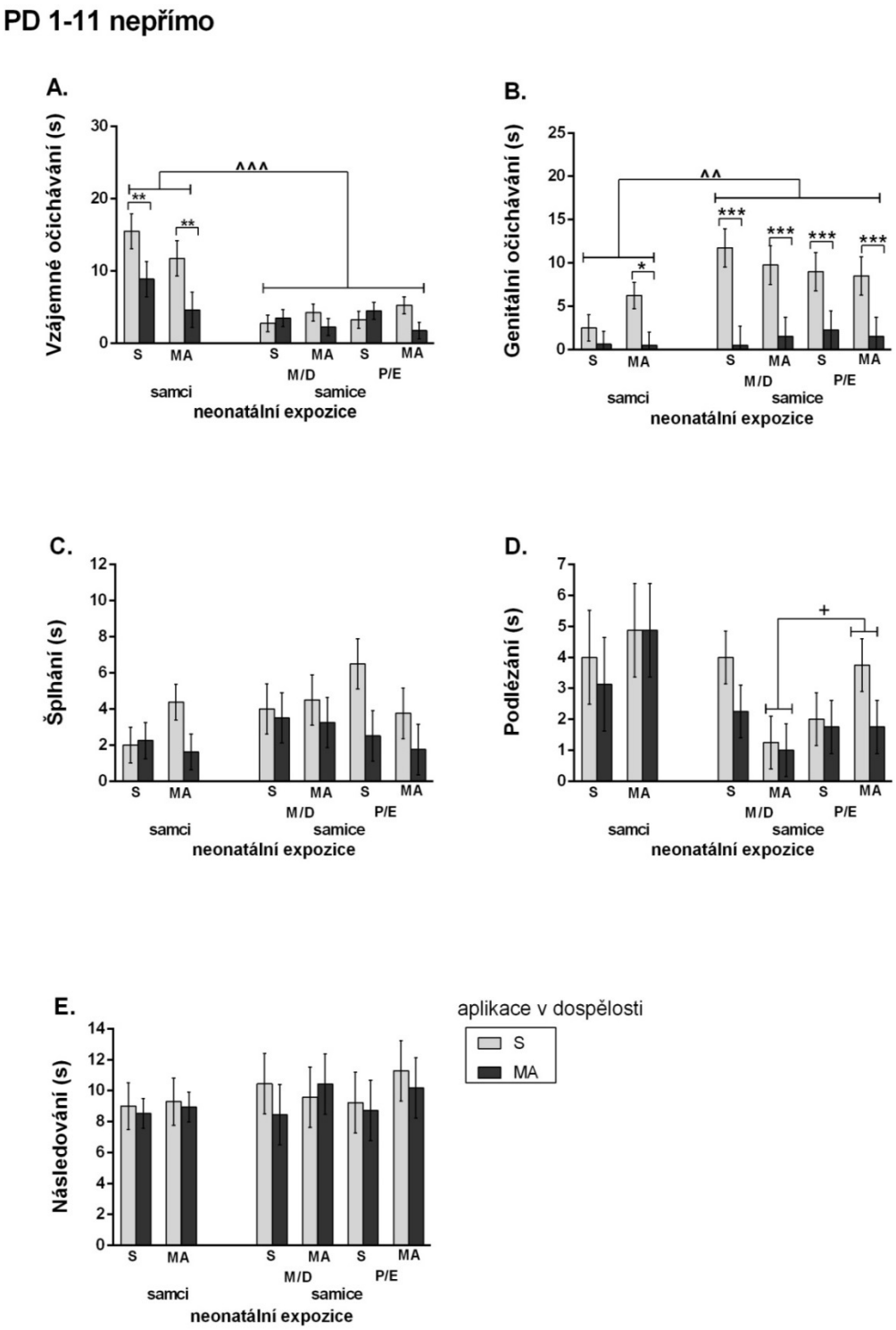
Statistická analýza ukázala vliv estrálního cyklu u samic neonatálně ovlivněných MA prostřednictvím mateřského mléka (PD 1-11, nepřímá aplikace). Samice ve stadiu P/E strávily více času podlézáním se [F (3,224)=1,28; p<0,05] (Obr. 6.6 D) než samice ve stadiu M/D.



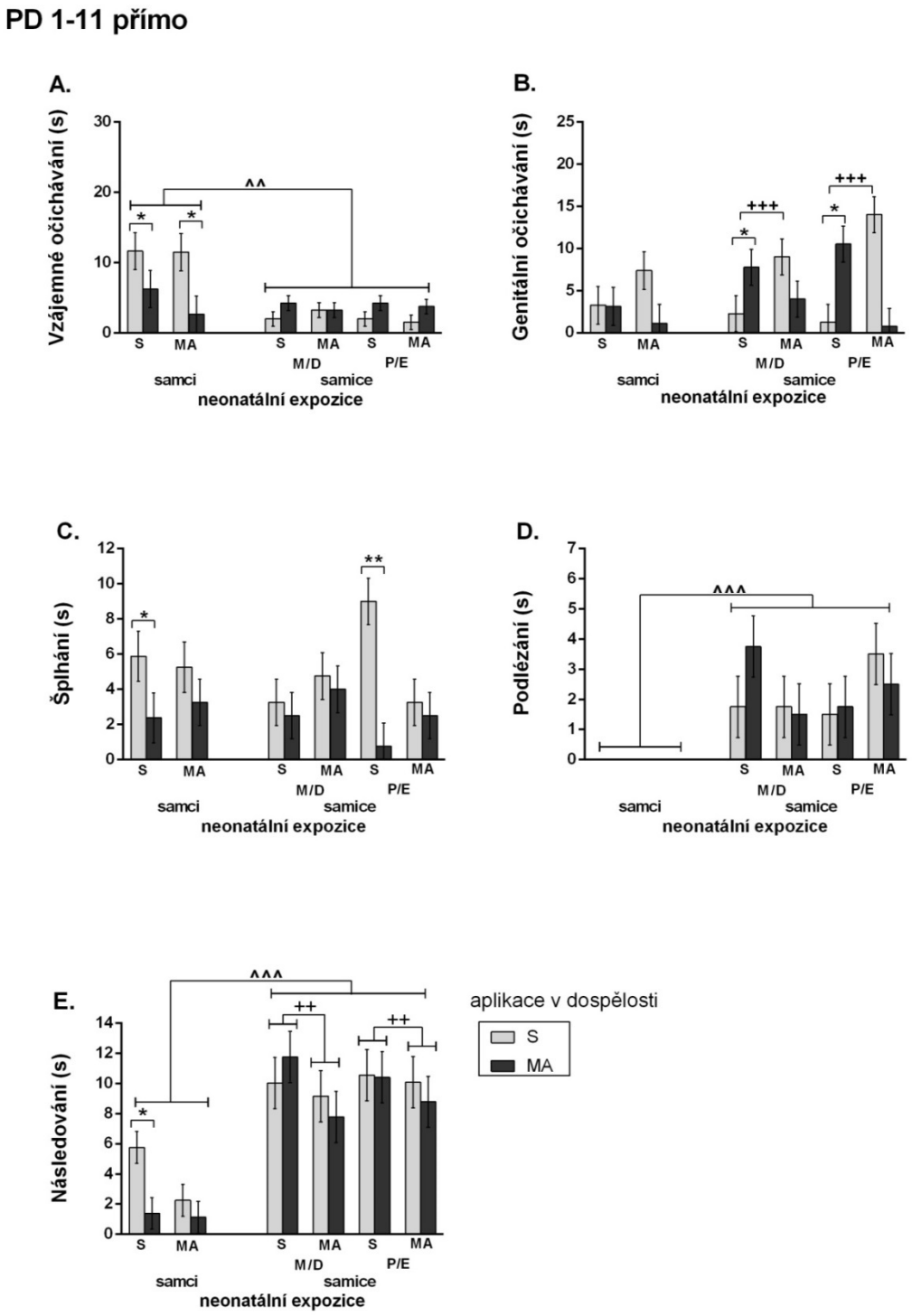
Obr. 6.4 Vliv **prenatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** a **estrálního cyklu** na sociální chování dospělých samců a samic prenatálně ovlivněných během **ED 1-11**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 párů samců, 4 páry samic pro jednotlivé fáze estrálního cyklu. A. Vzájemné očichávání. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samců; **p<0,01 akutní MA vs. akutní S u samic. B. Genitální očichávání. +p<0,05 prenatální MA vs. prenatální S u samců; **p<0,01 akutní MA vs. akutní S u samců; ***p<0,001 akutní MA vs. akutní S u samic; ^^^p<0,001 samice vs. samci. C. Šplhání. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samců. D. Podlézání. E. Následování.



Obr. 6.5 Vliv **prenatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** a **estrálního cyklu** na sociální chování dospělých samců a samic prenatálně ovlivněných během **ED 12-22**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 párů samců, 4 páry samic pro jednotlivé fáze estrálního cyklu. A. Vzájemné očichávání. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samců. B. Genitální očichávání. **p<0,01 akutní MA vs. akutní S u samců i samic; ^^p<0,01 samice vs. samci. C. Šplhání. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samců. D. Podlézání. E. Následování. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samic; ^p<0,05 samice vs. samci.



Obr. 6.6 Vliv **neonatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** a **estrálního cyklu** na sociální chování dospělých samců a samic neonatálně ovlivněných během **PD 1-11 nepřímo**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 párů samců, 4 páry samic pro jednotlivé fáze estrálního cyklu. A. Vzájemné očichávání. **p<0,01 akutní MA vs. akutní S u samců; ^^^p<0,001 samice vs. samci. B. Genitální očichávání. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samců; ***p<0,001 akutní MA vs. akutní S u samic; ^^p<0,01 samice vs. samci. C. Šplhání. D. Podlézání. E. Následování.

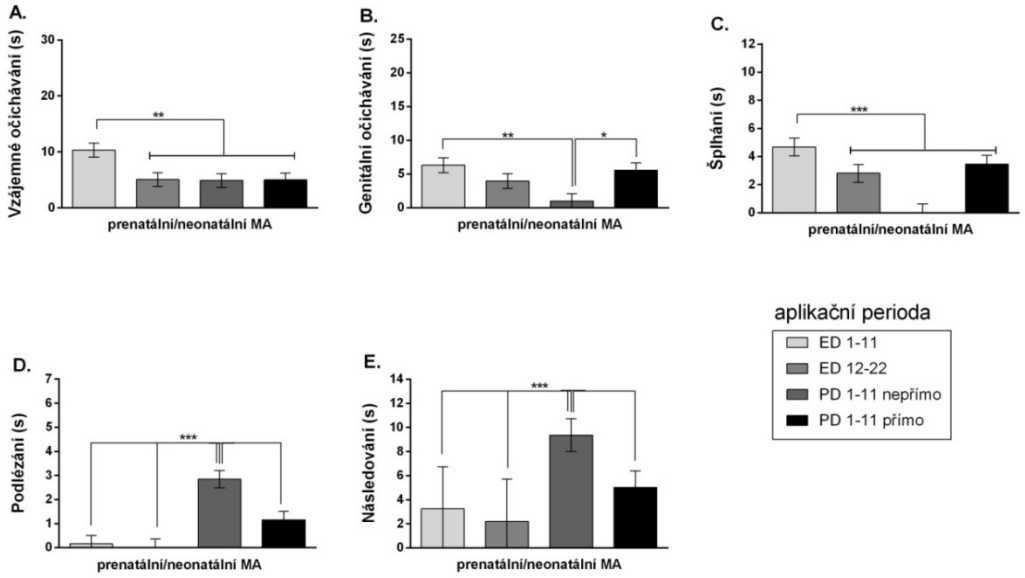


Obr. 6.7 Vliv **neonatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** a **estrálního cyklu** na sociální chování dospělých samců a samic neonatálně ovlivněných během **PD 1-11 přímo**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 párů samců, 4 páry samic pro jednotlivé fáze estrálního cyklu. A. Vzájemné očichávání. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samců; ^^p<0,01 samice vs. samci. B. Genitální očichávání. +++p<0,001 S/S vs. MA/S u samic. C. Šplhání. *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samců; **p<0,01 akutní MA vs. akutní S u samic. D. Podlézání. ^^^p<0,001 samice vs. samci. E. Následování. ++p<0,01 neonatální S vs. neonatální MA u samic; *p<0,05 akutní MA vs. akutní S u samic; ^^^p<0,001 samice vs. samci.

6.2.1.5 Vliv aplikační periody

Statistická analýza ukázala signifikantně významné rozdíly v sociálním chování zvířat exponovaných MA během různých neuro-ontogenetických stadií (Obr. 6.8).

Zvířata exponovaná MA během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) a během rané laktační periody nepřímo a přímo (PD 1-11) strávila méně času vzájemným očicháváním [F (3,224)=4,81; p<0,01] (A) a šplháním [F (3,224)=9,82; p<0,001] (C) než zvířata exponována MA během první poloviny gravidity (ED 1-11). Zvířata exponovaná MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka strávily méně času genitálním očicháváním v porovnání se skupinou zvířat exponovaných MA během ED 1-11 [F (3,224)=4,68; p<0,01] (B) a v porovnání se skupinou zvířat exponovanou MA během PD 1-11 přímo s.c. [F (3,224)=4,68; p<0,05] (B). Signifikantně více času strávila zvířata ovlivněna MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka podlézáním se [F (3,224)=13,61; p<0,001] (D) a následováním se [F (3,224)=77,62 p<0,001] ve srovnání se zvířaty exponovanými MA během gestace (ED 1-11, ED 12-22) a během rané laktační periody přímo s.c. (PD 1-11).



Obr. 6.8 Vliv **prenatální/neonatální expozice MA** na sociální chování dospělých samců a samic v závislosti na aplikační periodě během **různých neuro-ontogenetických stadií**. Hodnoty jsou průměry prenatální/neonatální expozice MA bez ohledu na akutní aplikaci v dospělosti ± SEM, n=32 párů zvířat. A. Vzájemné očichávání. B. Genitální očichávání. C. Šplhání. D. Podlézání. E. Následování. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

6.2.2 Nesociální aktivity

6.2.2.1 Vliv prenatální expozice MA

Statistická analýza odhalila MA-indukované změny v motorické aktivitě dospělých samců a samic prenatálně exponovaných drogou během první poloviny gravidity (ED 1-11) (Obr. 6.9). Samci strávili méně času lokomocí [F (3,224)=3,80; p<0,05] (A), samice strávily méně času vztyčováním [F (3,224)=1,30; p<0,05] (B) v porovnání se skupinou zvířat prenatálně ovlivněnou fyziologickým roztokem.

Vliv prenatální expozice MA jsme také zjistili u samic ovlivněných během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) (Obr. 6.9), které strávily méně času lokomocí [F (3,224)=3,80; p<0,01] (C) v porovnání s kontrolní skupinou samic.

6.2.2.2 Vliv neonatální expozice MA

Jak je vidět na obrázku 6.10, vliv neonatální expozice MA na nesociální aktivity zvířat se prokázal u samic ovlivněných drogou přímo s.c., tyto samice strávily méně času vztyčováním [F (3,224)=1,30; p<0,05] (D) v porovnání s kontrolní skupinou.

6.2.2.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti

Signifikantně významný vliv akutní aplikace MA v dospělosti byl zjištěn u skupiny samců ovlivněných během ED 12-22 (Obr. 6.9), kde aplikace drogy vedla k prodloužení času stráveného lokomocí [F (3,224)=1,83; p<0,05] (C).

Jak je znázorněno na obrázku 6.10 C, akutní MA prodloužil čas strávený lokomocí u samic ovlivněných během PD 1-11 přímo s.c. [F (3,224)=1,83; p<0,01] v porovnání s aplikací akutního S.

6.2.2.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu

Mezipohlavní rozdíly v motorické aktivitě byly patrné u skupiny zvířat exponovaných během první poloviny gravidity (ED 1-11) (Obr. 6.9), kde samci strávili více času lokomocí [F (3,224)=6,16; p<0,05] (A) a vztyčováním [F (3,224)=26,14; p<0,05] (B) v porovnání se samicemi ze stejné aplikační periody.

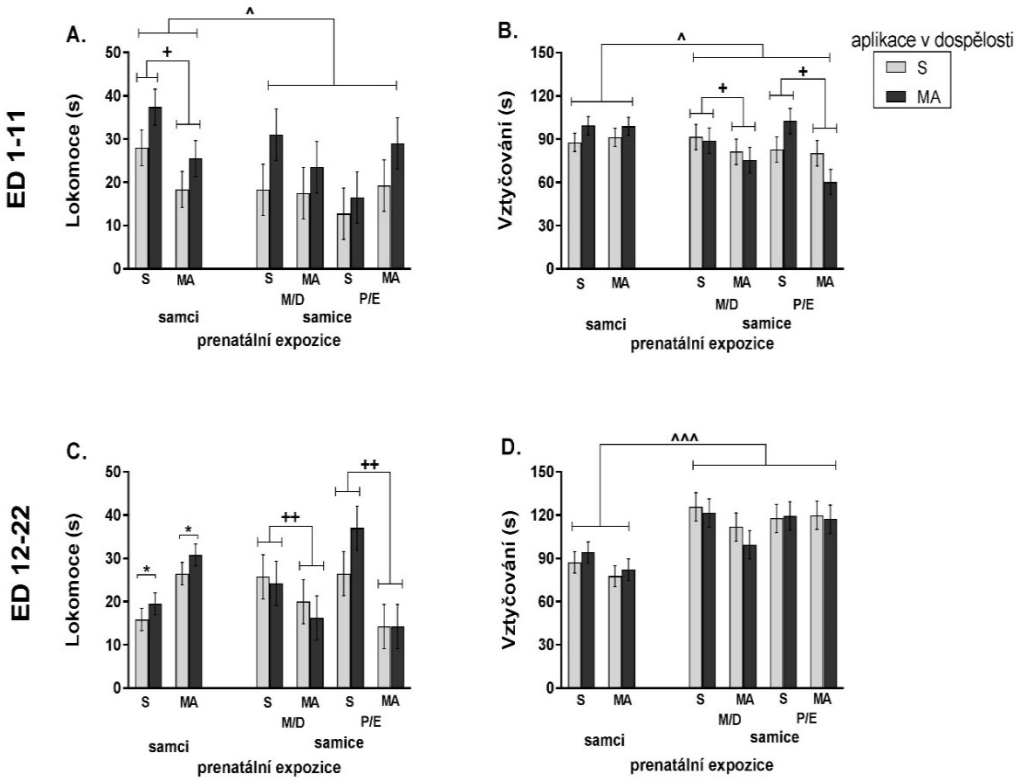
U skupiny zvířat exponovaných během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) (Obr. 6.9) byl nalezen rozdíl mezi pohlavími pouze v čase stráveném

vztyčováním [F (3,224)=26,14; p<0,001] (D), kde samice byly více aktivní než samci.

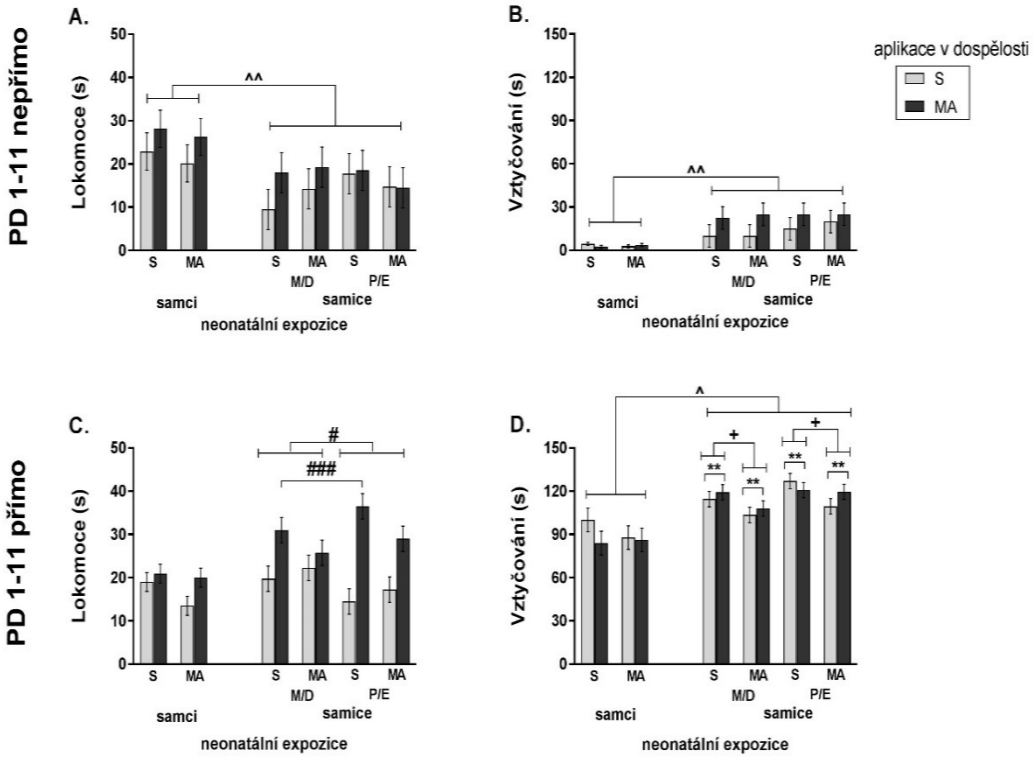
Ve skupině samců a samic exponovaných během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka (Obr. 6.10) strávili samci více času lokomocí [F (3,224)=6,16; p<0,01] (A), na druhé straně samice strávily více času vztyčováním [F (3,224)=26,14; p<0,01] (B).

Samice exponované MA během PD 1-11 přímo s.c. (Obr. 6.10) strávily více času vztyčováním [F (3,224)=26,14; p<0,01] (D) v porovnání s kontrolní skupinou.

Statistická analýza dat odhalila rozdíly v motorické aktivitě samic exponovaných během PD 1-11 přímo s.c. v závislosti na fázi estrálního cyklu (Obr. 6.10). Samice nacházející se v proestru strávily více času lokomocí než samice nacházející se v diestru [F (3,224)=6,16; p<0,05] (C). Post-hoc test navíc ukázal interakci mezi neonatální přímou aplikací, akutní aplikací v dospělosti a estrálním cyklem. Skupina samic neonatálně ovlivněna S s akutní aplikací MA (S/MA) nacházející se v proestru strávila více času lokomocí než skupina samic se stejnou aplikací (S/MA) nacházející se v diestru [F (3,224)=1,28; p<0,001] (Obr. 6.10 C).



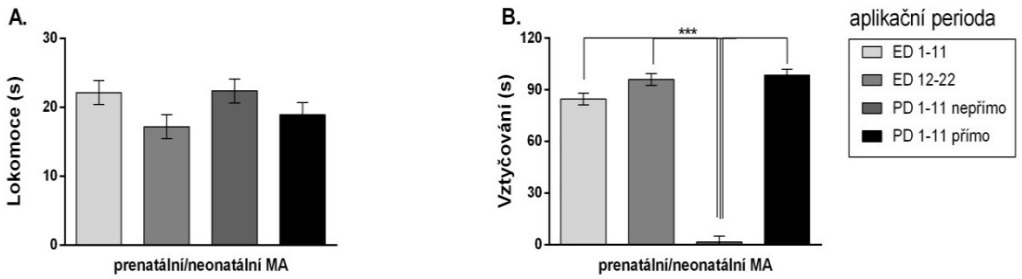
Obr. 6.9 Vliv **prenatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** a **estrálního cyklu** na motorickou aktivitu dospělých samců a samic prenatálně ovlivněných během **ED 1-11** a **ED 12-22**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 párů samců, 4 páry samic pro jednotlivé fáze estrálního cyklu. ED 1-11: A. Lokomoce. +p<0,05 prenatální S vs. prenatální MA u samců; ^p<0,05 samice vs. samci. B. Vztyčování. +p<0,05 prenatální S vs. prenatální MA u samic; ^p<0,05 samice vs. samci. ED 12-22: C. Lokomoce. ++p<0,01 prenatální S vs. prenatální MA u samic; *p<0,05 akutní S vs. akutní MA u samců. D. Vztyčování. ^^^p<0,001 samice vs. samci.



Obr. 6.10 Vliv **neonatální nepřímé** a **přímé expozice MA** a **S**, **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** a **estrálního cyklu** na motorickou aktivitu dospělých samců a samic neonatálně ovlivněných během **PD 1-11**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 párů samců, 4 páry samic pro jednotlivé fáze estrálního cyklu. Nepřímo: A. Lokomoce. ^^p<0,01 samice vs. samci. B. Vztyčování. ^^p<0,01 samice vs. samci. Přímo: C. Lokomoce. #p<0,05 M/D vs. P/E u samic; ###p<0,001 SA/MA v M/D vs. SA/MA v P/E u samic. D. Vztyčování. +p<0,05 neonatální S vs. neonatální MA u samic; **p<0,01 akutní S vs. akutní MA u samic; ^p<0,05 samice vs. samci.

6.2.2.5 Vliv aplikační periody

Statistická analýza dat neprokázala signifikantně významné rozdíly v čase stráveném lokomocí v závislosti na periodě aplikace během různých neuro-ontogenetických stadií vývoje zvířat, během kterých byla zvířata exponována MA. Na rozdíl od druhého parametru nesociálních aktivit, v čase stráveném vztyčováním, byly odhaleny rozdíly mezi jednotlivými aplikačními periodami po prenatální/neonatální expozici MA [F (3,224)=175,49; p<0,001] (Obr. 6.11).



Obr. 6.11 Vliv **prenatální/neonatální expozice MA** na nesociální aktivity dospělých samců a samic v závislosti na aplikační periodě během **různých neuro-ontogenetických stadií**. Hodnoty jsou průměry prenatální/neonatální expozice MA bez ohledu na akutní aplikaci v dospělosti ± SEM, n=32 párů zvířat. A. Lokomoce. B. Vztyčování. ***p<0,001.

6.3 TEST LABORAS

6.3.1 Vliv prenatální expozice MA

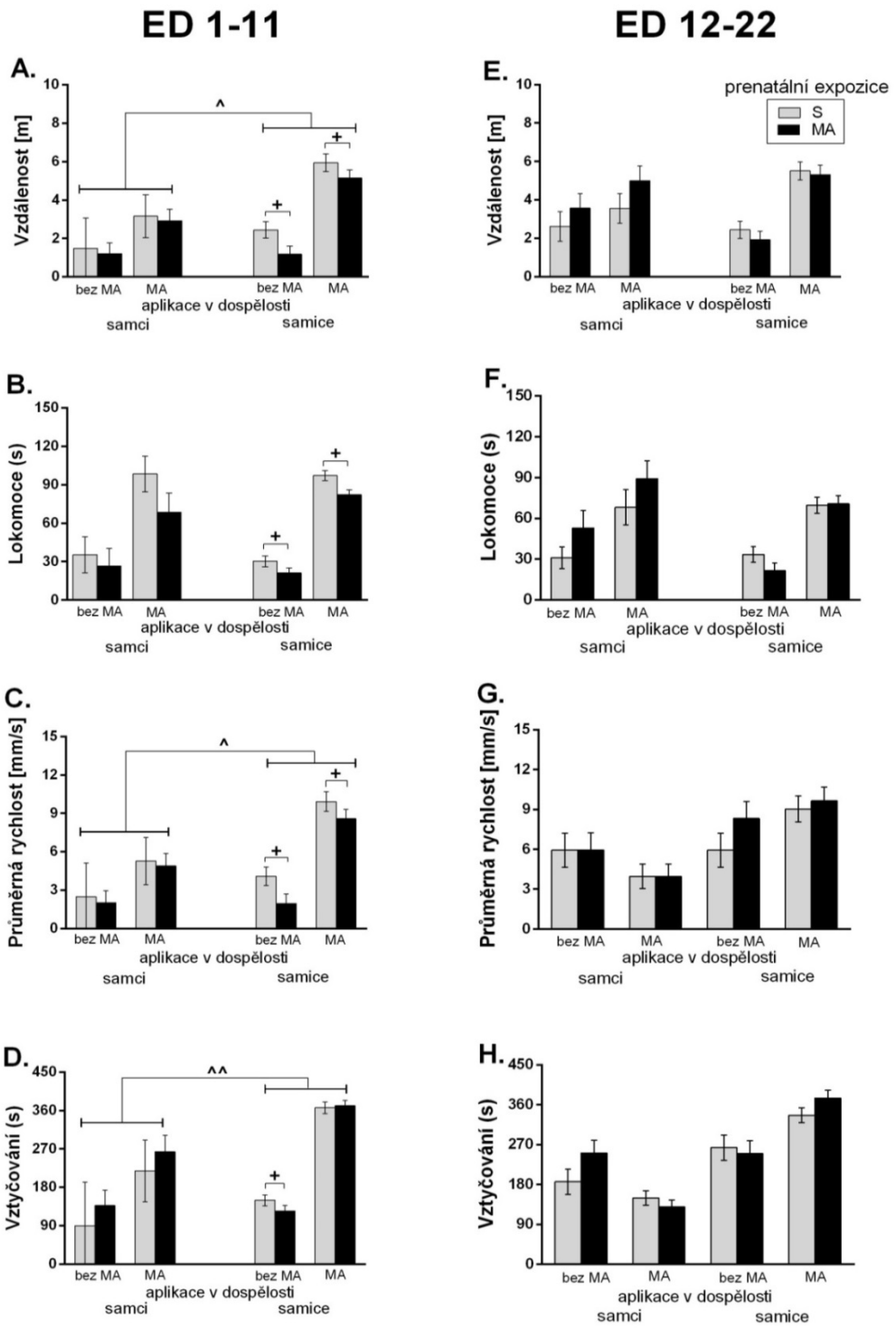
Hlavní vliv prenatální expozice MA během první poloviny gravidity (ED 1-11) (Obr. 6.12) byl nalezen u dospělých samic, které měly delší trajektorii pohybu [F (3,350)=5,00; p<0,05] (A), strávily méně času lokomocí [F (3,350)=10,30; p<0,05] (B), pohybovaly se pomaleji [F (3,350)=4,95; p<0,05] (C) a strávily méně času vztyčováním [F (3,350)=9,46; p<0,05] (D) v porovnání se samicemi prenatálně ovlivněnými fyziologickým roztokem (S).

Prenatální expozice MA během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) (Obr. 6.12) neměla vliv na chování dospělých samců a samic v otevřené aréně.

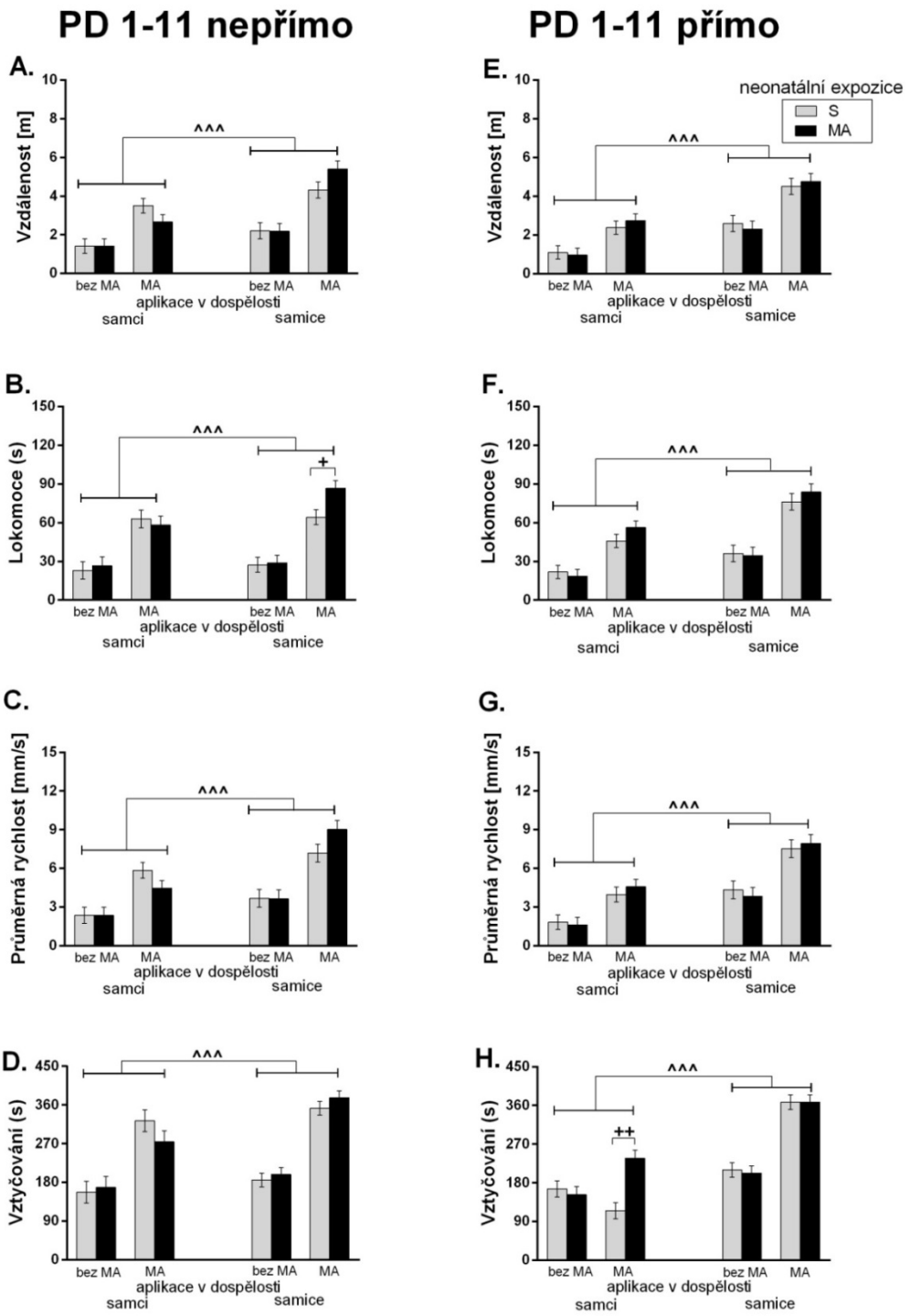
6.3.2 Vliv neonatální expozice MA

Statistická analýza dat odhalila interakci nepřímé neonatální expozice MA (PD 1-11) a akutní aplikace MA v dospělosti u samic (Obr. 6.13 B). Tyto samice (MA/MA) strávily více času lokomocí [F (3,350)=6,16; p<0,01] v porovnání s kontrolní skupinou samic se stejnou aplikací v dospělosti (S/MA).

Interakce přímé neonatální expozice MA (PD 1-11) a akutní aplikace MA v dospělosti (MA/MA) byla zase nalezena u dospělých samců (Obr. 6.13 H), kteří strávili více času vztyčováním [F (3,350)=12,94; p<0,01] v porovnání s kontrolní skupinou samců po akutní dávce drogy (S/MA).



Obr. 6.12 Vliv **prenatální** (ED 1-11, ED 12-22) a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na chování dospělých samců a samic v testu Laboras. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 samců, 20 samic (bez ohledu na fázi estrálního cyklu). Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty šest 10-minutových intervalů. ED 1-11: +p<0,05 prenatální MA snížil celkovou aktivitu v otevřené aréně u samic v porovnání s prenatálním S; ^p<0,05; ^^p < 0.01 samice vs. samci. ED 12-22.



Obr. 6.13 Vliv **neonatální** (nepřímo, přímo) a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na chování dospělých samců a samic v testu Laboras. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 samců, 20 samic (bez ohledu na fázi estrálního cyklu). Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty šest 10-minutových intervalů. Nepřímo: +p<0,05 MA/MA vs. S/MA u samic; ^^^p<0,001 samice vs. samci. Přímo: ++p<0,01 MA/MA vs. S/MA u samců; ^^^p<0,001 samice vs. samci.

6.3.3 Vliv akutní dávky MA v dospělosti

Statistická analýza dat odhalila, že akutní aplikace MA v dospělosti vedla v testu Laboras ke zvýšení horizontální a vertikální aktivity u všech experimentálních skupin zvířat.

U skupiny zvířat exponovaných během první poloviny gravidity (ED 1-11) (Obr. 6.14): samice – vzdálenost [F (3,350)=68,99; p<0,001] (A), čas strávený lokomocí [F (3,350)=177,21; p<0,001] (B), průměrná rychlost [F (3,350)=68,99; p<0,001] (C), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=315,94; p<0,001] (D); samci – vzdálenost [F (3,350)=49,18; p<0,001] (A), čas strávený lokomocí [F (3,350)=162,20; p<0,001] (B), průměrná rychlost [F (3,350)=23,64; p<0,001] (C), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=46,12; p<0,001] (D).

Aktivita v Laboras testu byla zvýšená po akutní aplikaci drogy také u samic exponovaných během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) (Obr. 6.14): vzdálenost [F (3,350)=50,86; p<0,001] (E), čas strávený lokomocí [F (3,350)=52,97; p<0,001] (F), průměrná rychlost [F (3,350)=64,12; p<0,001] (G), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=201,01; p<0,001] (H). Samci ze stejné aplikační periody po akutní dávce drogy vykazovali delší trajektorii pohybu [F (3,350)=46,69; p<0,001] (E), delší čas strávený lokomocí [F (3,350)=9,56; p<0,01] (F), byli rychlejší [F (3,350)=6,72; p<0,01] (G) a strávili více času vztyčováním [F (3,350)=16,45; p<0,01] (H).

Aplikace akutní dávky MA dospělým zvířatům exponovaným během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka (Obr. 6.15) vedla ke zvýšení celkové motorické aktivity nejen u samic: vzdálenost [F (3,350)=48,35; p<0,001] (A), čas strávený lokomocí [F (3,350)=69,96; p<0,001] (B), průměrná rychlost [F (3,350)=41,53; p<0,001] (C), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=128,81; p<0,001] (D); ale také u samců: vzdálenost [F (3,350)=20,09; p<0,001] (A), čas strávený lokomocí [F (3,350)=24,43; p<0,001] (B), průměrná rychlost [F (3,350)=20,09; p<0,001] (C), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=28,03; p<0,001] (D).

Hlavní účinek aplikace drogy v dospělosti byl nalezen pro všechny parametry také u zvířat exponovaných neonatálně (PD 1-11) přímo (Obr. 6.15): samice - vzdálenost [F (3,350)=28,28; p<0,001] (E), čas strávený lokomocí

[F (3,350)=54,56; p<0,001] (F), průměrná rychlost [F (3,350)=27,89; p<0,001] (G), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=93,01; p<0,001] (H); samci - vzdálenost [F (3,350)=19,47; p<0,001] (E), čas strávený lokomocí [F (3,350)=36,08; p<0,001] (F), průměrná rychlost [F (3,350)=19,47; p<0,001] (G).

6.3.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu

Při zohlednění vlivu pohlaví a fáze estrálního cyklu u samic statistická analýza dat odhalila mezipohlavní rozdíly v chování zvířat v otevřené aréně. Samice exponované během první poloviny gravidity (ED 1-11) (Obr. 6.12) byly aktivnější v porovnání se samci: vzdálenost [F (3,350)=6,68; p<0,05] (A), průměrná rychlost [F (3,350)=6,69; p<0,05] (C), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=11,38; p<0,01] (D). Interakce pohlaví a akutní aplikace MA byla prokázaná u samic (Obr. 6.14), které vykazovaly delší trajektorii pohybu [F (3,350)=7,14; p<0,001] (A), byly rychlejší [F (3,350)=8,16; p<0,01] (C) a strávily více času vztyčováním [F (3,350)=5,07; p<0,001] (D) než samci po akutní dávce MA.

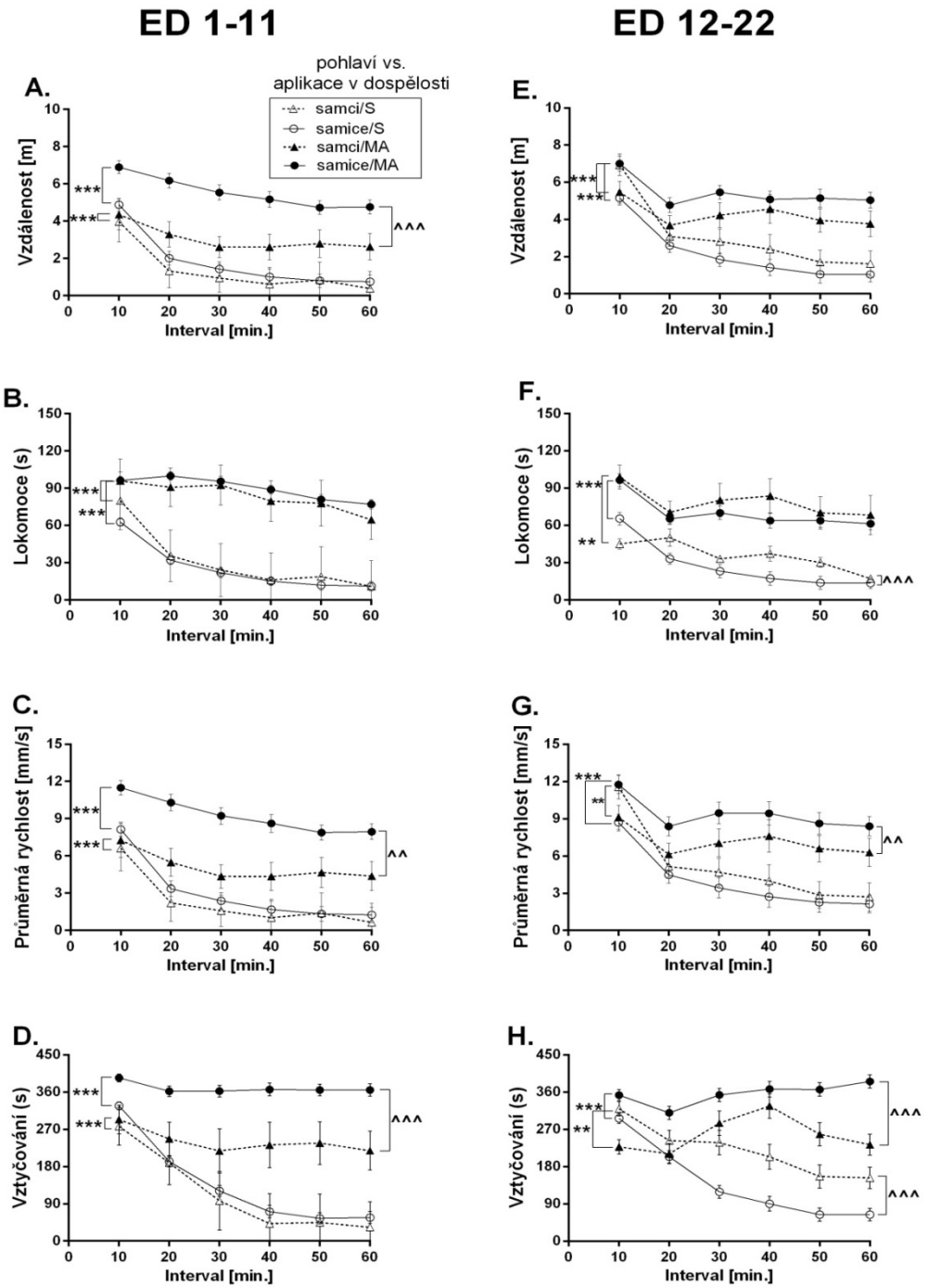
Mezipohlavní rozdíly v rámci zvýšené aktivity zvířat po akutní dávce drogy se ukázaly i u zvířat exponovaných v dalším období gestace (ED 12-22) (Obr. 6.14). Samice po akutní aplikaci MA byly rychlejší [F (3,350)=11,07; p<0,01] (G) a strávily více času vztyčováním [F (3,350)=9,29; p<0,001] (H) než samci po akutní aplikaci MA. Na druhé straně samci po akutní aplikaci S strávili více času lokomocí [F (3,350)=45,78; p<0,001] (F) a vztyčováním [F (3,350)=41,12; p<0,001] (H) než samice po akutní aplikaci S.

U skupiny zvířat exponovaných během rané laktační periody nepřímo (PD 1-11) (Obr. 6.13) byl zjištěn vliv pohlaví u všech měřených parametrů, kde samice byly aktivnější než samci: vzdálenost [F (3,350)=15,62; p<0,001] (A), čas strávený lokomocí [F (3,350)=3,59; p<0,01] (B), průměrná rychlost [F (3,350)=15,82; p<0,001] (C), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=2,55; p<0,001] (D). Dále byly pozorovány interakce pohlaví a akutní aplikace MA v dospělosti, kde samice po akutním MA byly aktivnější než samci po akutním MA (Obr. 6.15): vzdálenost [F (3,350)=11,8; p<0,001] (A), čas strávený lokomocí

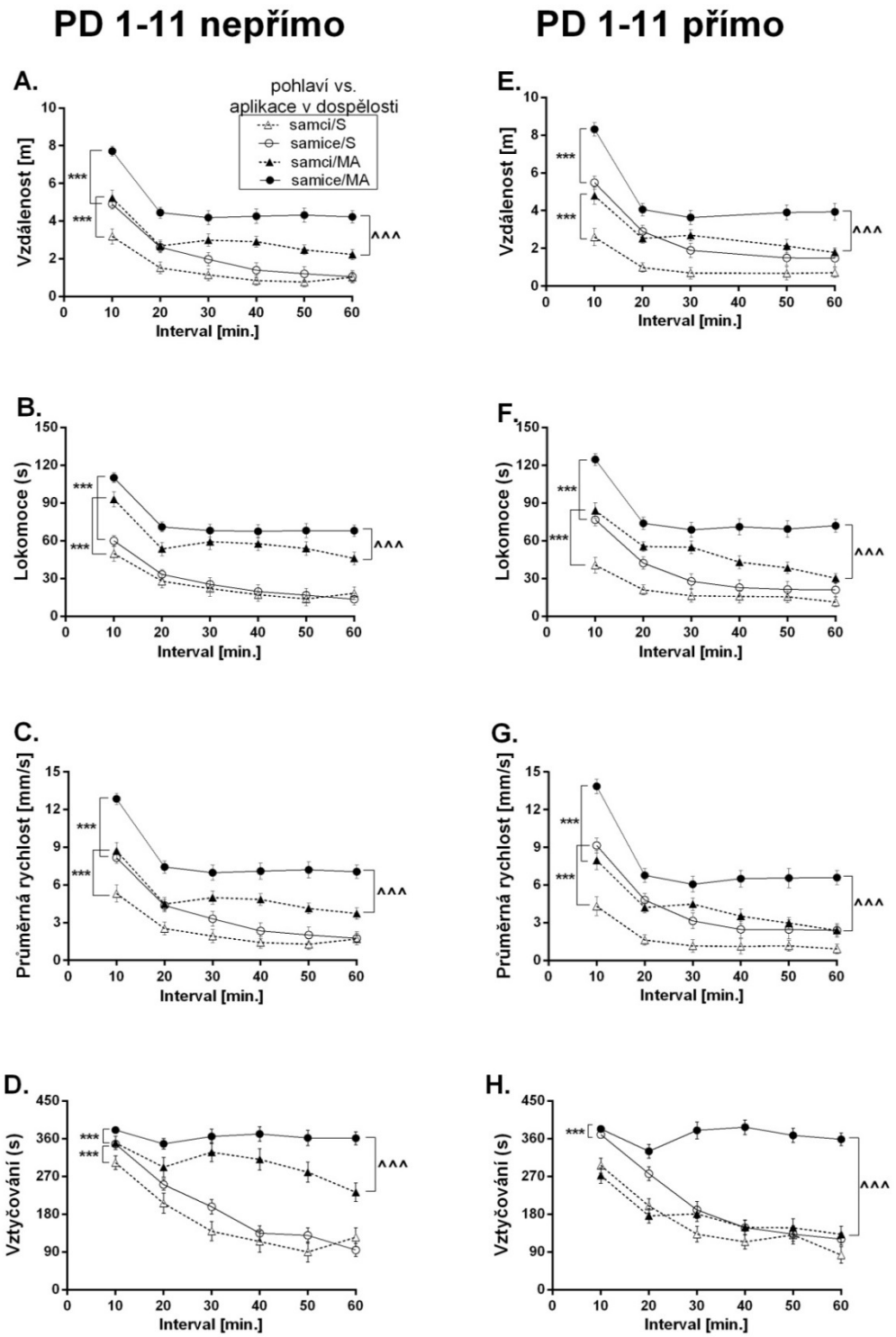
[F (3,350)=8,99; p<0,001] (B), průměrná rychlost [F (3,350)=17,37; p<0,001] (C), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=24,7; p<0,001] (D).

Vliv pohlaví byl odhalen také u skupiny zvířat exponovaných během PD 1-11 přímo (Obr. 6.13), samice byly aktivnější v testu Laboras v porovnání se samci: vzdálenost [F (3,350)=29,86; p<0,001] (E), čas strávený lokomocí [F (3,350)=20,03; p<0,001] (F), průměrná rychlost [F (3,350)=29,87; p<0,001] (G), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=76,61; p<0,001] (H). Pro všechny parametry byla rovněž zjištěna interakce mezi pohlavím a akutní aplikací drogy v dospělosti. Jak lze vidět na obrázku 6.15, samice po akutní aplikaci MA byly aktivnější než samci po akutní aplikaci MA: vzdálenost [F (3,350)=14,12; p<0,001] (E), čas strávený lokomocí [F (3,350)=12,12; p<0,001] (F), průměrná rychlost [F (3,350)=21,59; p<0,001] (G), čas strávený vztyčováním [F (3,350)=37,18; p<0,001] (H).

Statistická analýza neprokázala vliv estrálního cyklu na změny chování u samic v testu Laboras, proto jsme se rozhodli daný faktor nezahrnout do obrázků.



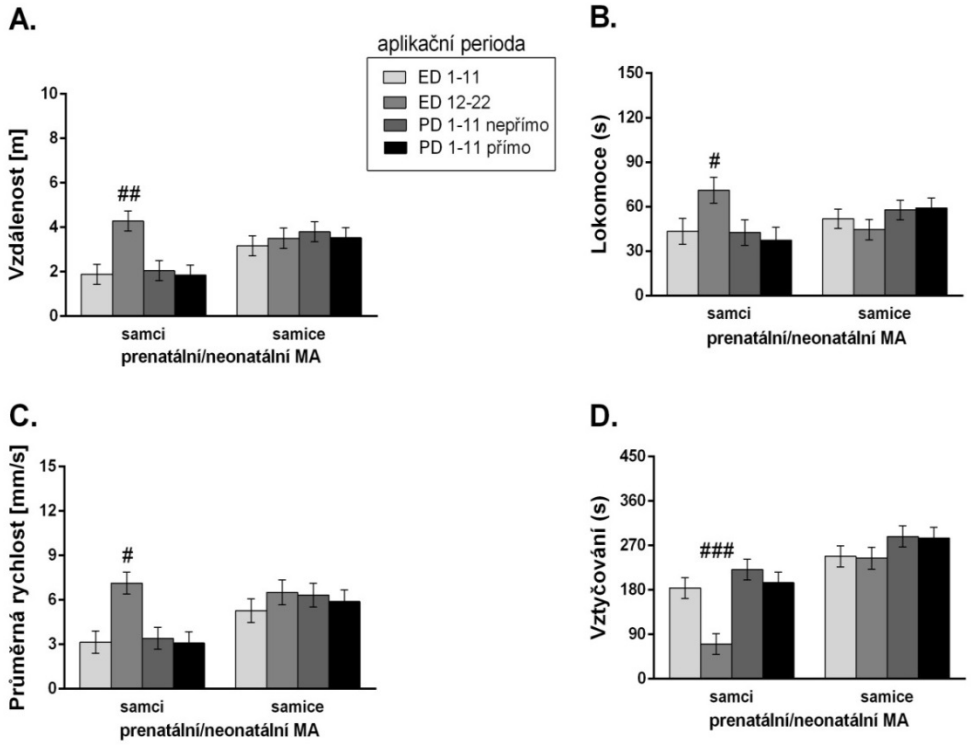
Obr. 6.14 Vliv **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na chování dospělých samců a samic v testu Laboras prenatálně ovlivněných během ED 1-11 a ED 12-22. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 samců, 20 samic (bez ohledu na fázi estrálního cyklu). Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty v jednotlivých šesti 10-minutových intervalech. ED 1-11: ***p<0,001 akutní MA vs. akutní S; ^^p<0,01; ^^^p<0,001 akutní MA u samic vs. akutní MA u samců. ED 12-22: **p<0,01; ***p<0,001 akutní MA vs. akutní S; ^^p<0,01; ^^^p<0,001 akutní MA u samic vs. akutní MA u samců.



Obr. 6.15 Vliv **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na chování dospělých samců a samic v testu Laboras neonatálně ovlivněných během PD 1-11 (nepřímo/přímo). Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8 samců, 20 samic (bez ohledu na fázi estrálního cyklu). Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty v jednotlivých šesti 10-minutových intervalech. Nepřímo: ***p<0,001 akutní MA vs. akutní S; ^^^p<0,001 akutní MA u samic vs. akutní MA u samců. Přímo: ***p<0,001 akutní MA vs. akutní S; ^^^p<0,001 akutní MA u samic vs. akutní MA u samců.

4.3.5 Vliv aplikační periody

Jak je zobrazeno na obrázku 6.16, u skupiny samců ovlivněných MA během první poloviny gravidity (ED 1-11) a skupiny samců ovlivněných MA během rané laktační periody (PD 1-11, nepřímo a přímo), vedla prenatální a neonatální expozice drogou k výrazné redukci horizontální motorické aktivity: vzdálenost [F (3,350)=6,96; p<0,01] (A), čas strávený lokomocí [F (3,350)=3,04; p<0,05] (B), průměrná rychlost [F (3,350)=6,97; p<0,05] (C); a k posílení vertikální explorační aktivity: čas strávený vztyčováním [F (3,350)=10,13; p<0,001] (D) v porovnání se skupinou samců prenatálně ovlivněnou drogou během druhé poloviny gravidity (ED 12-22). Statistická analýza dat neodhalila významné rozdíly ve změně chování samic po prenatální/neonatální expozici MA v závislosti na periodě aplikace během různých neuro-vývojových stadií. Analýza dat neprokázala interakci pohlaví, akutní aplikace MA a periody aplikace.



Obr. 6.16 Vliv **aplikační periody** na chování dospělých samců a samic v testu Laboras prenatálně a neonatálně ovlivněných během **různých neuro-ontogenetických stadií**. Hodnoty jsou průměry prenatální a neonatální MA expozice ± SEM, n=16 samců, 40 samic (bez ohledu na fázi estrálního cyklu). Výsledky jsou prezentovány jako průměrné hodnoty šest 10-minutových intervalů. #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 samci prenatálně exponováni MA během ED 12-22 vs. samci prenatálně exponováni během ED 1-11 a samci neonatálně exponováni během PD 1-11 (nepřímo a přímo).

6.4 TEST MORRISOVA VODNÍHO BLUDIŠTĚ (MWM)

6.4.1 Učení

6.4.1.1 Vliv prenatální expozice MA

Jak je znázorněno na obrázku 6.17 (A-D), prenatální expozice MA během první poloviny gestace (ED 1-11) neovlivnila proces učení u samců v dospělosti. U samic exponovaných během stejného stadia neuro-ontogeneze (ED 1-11) vedla expozice drogou ke zvýšení chyby hledání [F (5,280)=7,06; p<0,05] (Obr. 6.17 B) a k prodloužení latence k nalezení ostrůvku [F (5,280)=4,50; p<0,05] (Obr. 6.17 C). Prenatální expozice drogou vedla ke zpomalení procesu učení u samic, kterým byl v dospělosti podáván fyziologický roztok, nikoliv u samic s aplikací MA.

Prenatální expozice MA během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) (Obr. 6.17 E-H) neměla vliv na prostorové učení dospělých samců. U samic ze stejné aplikační periody vedla prenatální expozice MA ke zkrácení uplavané vzdálenosti ke skrytému ostrůvku [F (5,280)=5,04; p<0,05] (Obr. 6.17 E) v porovnání se skupinou samic ovlivněných fyziologickým roztokem bez ohledu na akutní aplikaci v dospělosti.

6.4.1.2 Vliv neonatální expozice MA

Neonatální nepřímá aplikace MA (PD 1-11) prostřednictvím mateřského mléka vedla u samců v dospělosti k prodloužení uplavané vzdálenosti ke skrytému ostrůvku v porovnání s kontrolní skupinou [F (5,280)=8,21; p<0,01] (Obr. 6.18 A). U samic se projevil negativní účinek neonatální nepřímé expozice MA v prodloužení chyby hledání [F (5,280)=7,08; p<0,05] (Obr. 6.18 B) a v prodloužení latence [F (5,280)=6,34; p<0,05] (Obr. 6.18 C) v porovnání s kontrolní skupinou.

Neonatální přímá expozice MA s.c. během PD 1-11 vedla i u samců i u samic k prodloužení chyby hledání a latence (Obr. 6.18): samci – chyba hledání [F (5,280)=4,28; p<0,05] (F), latence [F (5,280)=3,28; p<0,05] (G); samice – chyba hledání [F (5,280)=5,10; p<0,05] (F), latence [F (5,280)=5,11; p<0,05] (G).

6.4.1.3 Vliv akutní dávky MA v dospělosti

Akutní aplikace MA vedla ke zvýšení rychlosti plavání u samců ze skupiny ovlivněné během ED 1-11 [F (5,280)=4,05; p<0,01] (Obr. 6.17 D) v porovnání s kontrolní skupinou bez ohledu na prenatální expozici. Akutní aplikace drogy neovlivnila proces učení u samic (Obr. 6.17).

Akutní aplikace MA vedla u samců exponovaných prenatálně MA během ED 12-22 (MA/MA) ke zvýšení rychlosti plavání v porovnání se skupinou samců ovlivněných akutně S (MA/S) [F (5,280)=6,14; p<0,01] (Obr. 6.17 H). Proces učení nebyl u samic exponovaných během ED 12-22 ovlivněn akutní aplikací MA.

Aplikace akutní dávky MA dospělým zvířatům exponovaných během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka (Obr. 6.18) vedla u samců ke zvýšení rychlosti plavání bez ohledu na neonatální expozici
[F (5,280)=5,09; p<0,05] (D). U samic akutní aplikace MA neměla vliv na proces učení.

Statistická analýza neodhalila vliv akutní aplikace MA v dospělosti na proces učení u skupiny samců ovlivněných neonatálně během PD 1-11 přímo s.c. (Obr. 6.18). U samic ze stejné aplikační skupiny akutní aplikace MA snížila délku uplavané trajektorie ke skrytému ostrůvku, ale jen u skupiny samic neonatálně ovlivněných drogou (MA/MA vs. MA/S) [F (5,280)=4,22; p<0,05] (Obr. 6.18 E).

6.4.1.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu

U skupiny zvířat exponovaných během první poloviny gravidity (ED 1-11) statistická analýza odhalila mezipohlavní rozdíly v rychlosti plavání. Samice celkově dosahovaly vyšší rychlost plavání než samci [F (5,280)=19,86; p<0,001] (Obr. 6.17 D). U stejné skupiny zvířat se prokázala také interakce pohlaví a akutní aplikace; samice byly rychlejší po akutní aplikaci S [F (5,280)=4,42; p<0,001] (Obr. 6.17 D), akutní aplikace MA zvýšila rychlost plavání jak u samic, tak u samců.

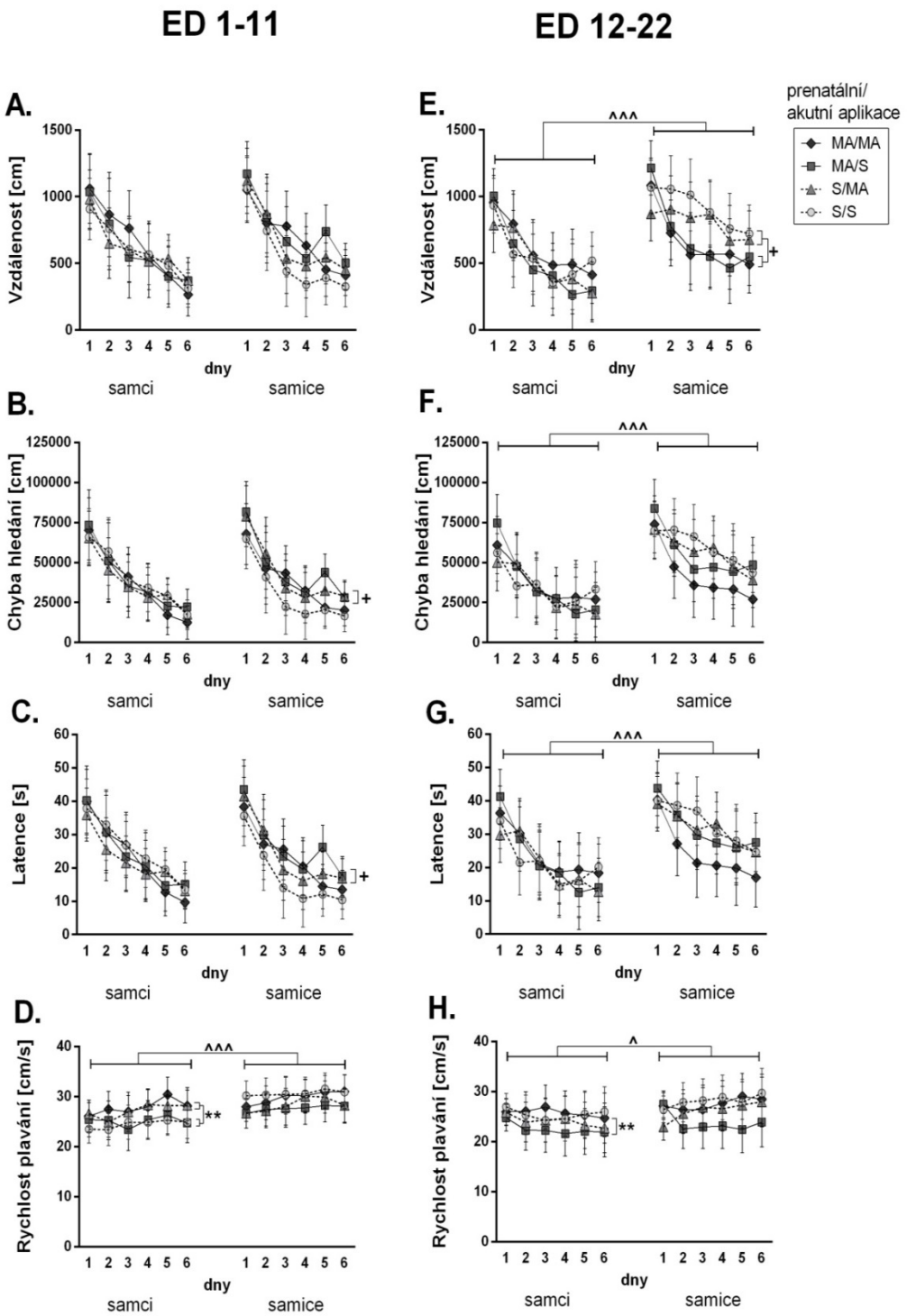
Mezipohlavní rozdíly v rámci zvýšené aktivity u samic v porovnání se samci byly patrné také u skupiny zvířat exponovaných během druhé poloviny

gravidity (ED 12-22) (Obr. 6.17): samice uplavaly delší vzdálenost [F (5,280)=21,82; p<0,001] (E), vykazovaly vyšší chybu hledání [F (5,280)=22,63; p<0,001] (F), delší latenci [F (5,280)=19,16; p<0,001] (G), rychlost plavání [F (5,280)=5,00; p<0,05] bez ohledu na prenatální či akutní aplikaci.

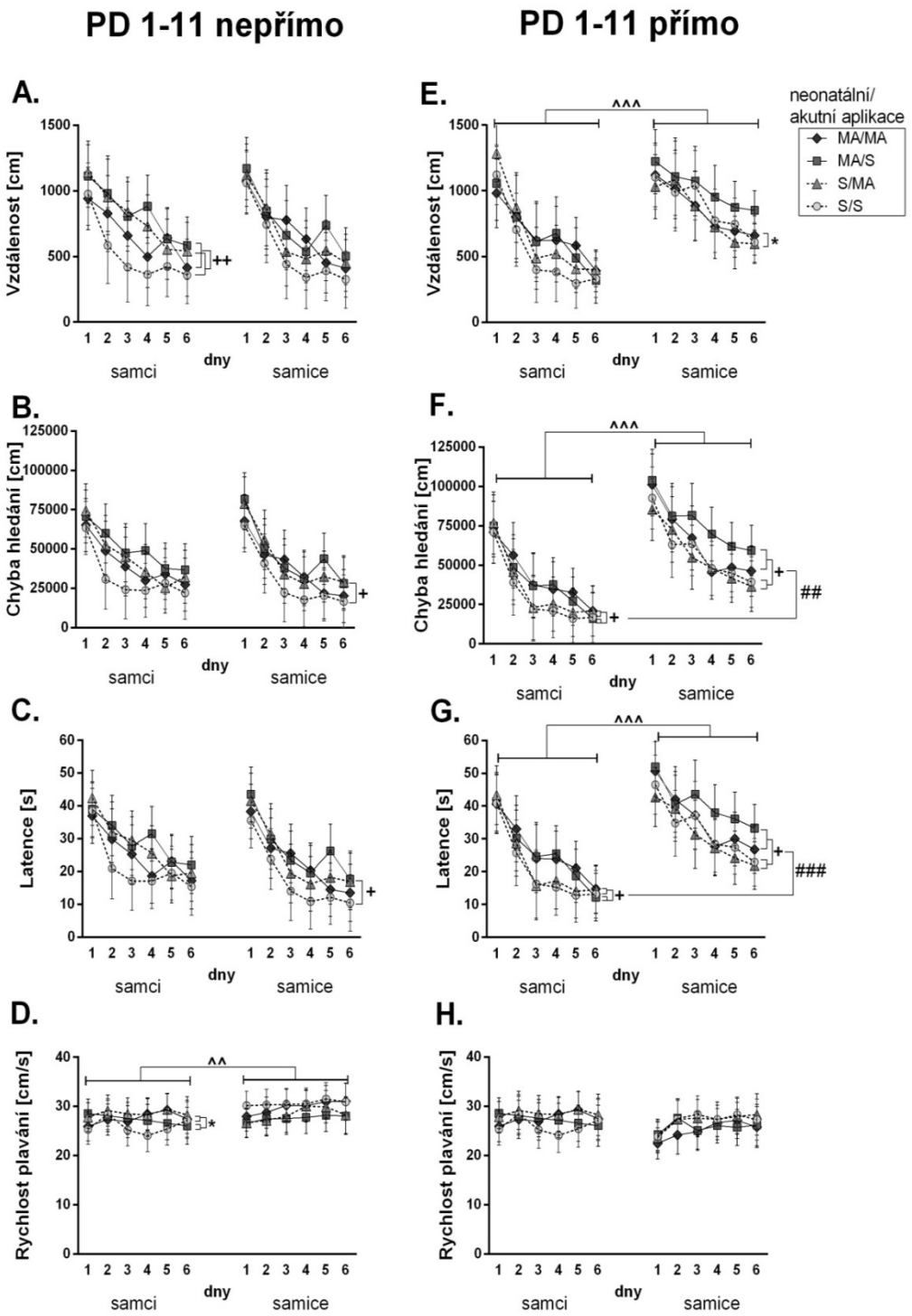
Při zohlednění vlivu pohlaví statistická analýza odhalila mezipohlavní rozdíl v rychlosti plavání u skupiny zvířat exponovaných během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka. Samice bez ohledu na neonatální či akutní léčbu plavaly rychleji v testu učení než samci [F (5,280)=7,43; p<0,01] (Obr. 6.18 D).

U skupiny zvířat exponovaných přímo s.c. během PD 1-11 (Obr. 6.18) byly prokázané mezipohlavní rozdíly v uplavané vzdálenosti [F (5,280)=45,38; p<0,001] (E), chybě hledání [F (5,280)=60,48; p<0,001] (F) a latence [F (5,280)=49,45; p<0,001] (G), kde samice dosahovaly vyšších hodnot než samci, a to bez ohledu na neonatální či akutní aplikaci. Statistická analýza odhalila interakci neonatální expozice MA a pohlaví, výraznější negativní dopad na proces učení byl patrný u samic v porovnání s vlivem neonatální expozice MA u samců: chyba hledání [F (5,280)=12,31; p<0,01] (F), latence [F (5,280)=41,28; p<0,001] (G).

Statistická analýza neprokázala vliv estrálního cyklu na proces učení u samic, proto jsme daný faktor nezahrnuli do obrázků.



Obr. 6.17 Vliv **prenatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na proces učení během první fáze MWM (6 dní) u dospělých samců a samic prenatálně ovlivněných během **ED 1-11** a **ED 12-22**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8. ED 1-11: A. Vzdálenost. B. Chyba hledání. C. Latence. D. Rychlost plavání. +p<0,05 prenatální MA (MA/S vs. S/S); **p<0,01 akutní MA vs. akutní S; ^^^p<0,001 samice vs. samci. ED 12-22: E. Vzdálenost. F. Chyba hledání. G. Latence. H. Rychlost plavání. **p<0,01 akutní MA vs. akutní S (MA/MA vs. MA/S); ^p<0,05, ^^^p<0,001 samice vs. samci.

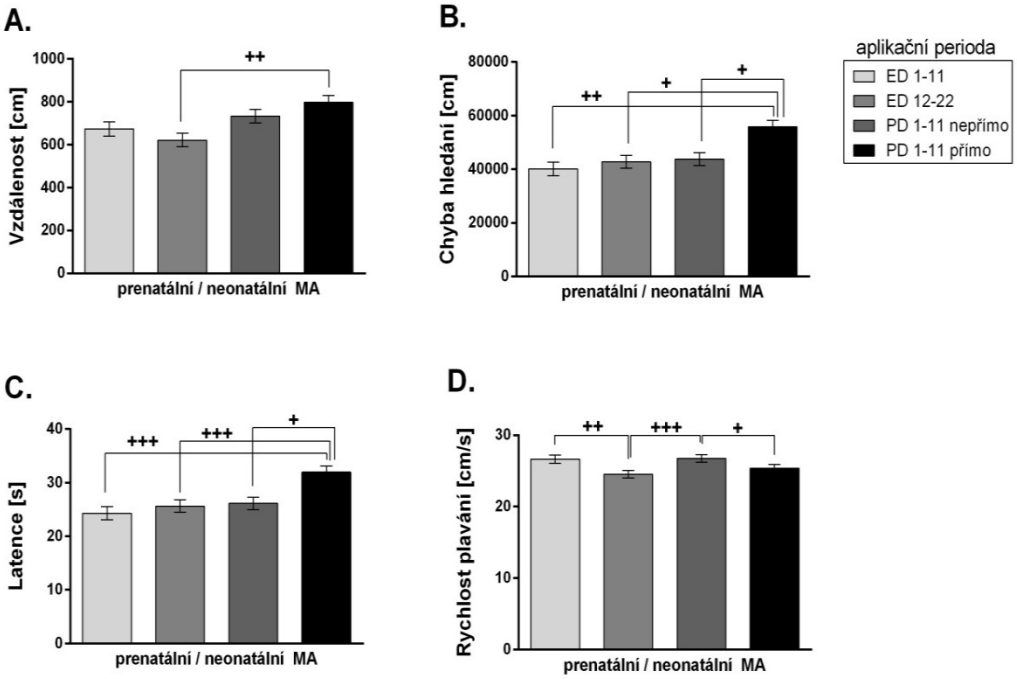


Obr. 6.18 Vliv **neonatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na proces učení během první fáze MWM (6 dní) u dospělých samců a samic neonatálně ovlivněných během **PD 1-11 nepřímo** a **přímo**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8. PD 1-11 nepřímo: A. Vzdálenost. B. Chyba hledání. C. Latence. D. Rychlost plavání. +p<0,05, +p<0,01 neonatální MA; *p<0,05 akutní MA vs. akutní S; ^^p<0,01 samice vs. samci. PD 1-11 přímo: E. Vzdálenost. F. Chyba hledání. G. Latence. H. Rychlost plavání. +p<0,01 neonatální MA; ##p<0,01, ###p<0,001 interakce neonatální MA vs. pohlaví; *p<0,05 akutní MA vs. akutní S; ^^^p<0,001 samice vs. samci.

6.4.1.5 Vliv aplikační periody

Statistická analýza odhalila signifikantně významné rozdíly v procesu učení po prenatální/neonatální expozici MA v závislosti na aplikační periodě během jednotlivých neuro-ontogenetických stadií (Obr. 6.19).

Nejvýznamnější negativní dopad měla expozice drogou během rané laktační periody přímou aplikací s.c.: vzdálenost [F (5,280)=3,20; p<0,01] (A); chyba hledání [F (5,280)=5,14; p<0,05], [F (5,280)=5,14; p<0,01] (B); latence [F (5,280)=2,72; p<0,001], [F (5,280)=5,14; p<0,05] (C). V rámci porovnání vlivu prenatální/neonatální expozice MA na rychlost plavání (D) vedla prenatální expozice MA během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) [F (5,280)=7,94; p<0,01] a neonatální expozice MA během PD 1-11 přímo s.c. [F (5,280)=7,94; p<0,05] k výraznějšímu poklesu rychlosti plavání v porovnání s expozicí MA během první poloviny gravidity (ED 1-11) a během PD 1-11 nepřímo mateřským mlékem.



Obr. 6.19 Vliv **prenatální/neonatální expozice MA** na proces učení v závislosti na **aplikační periodě** během jednotlivých **neuro-ontogenetických stadií**. Hodnoty jsou průměry prenatální/neonatální expozice MA bez ohledu na akutní aplikaci v dospělosti ± SEM, n=32. A. Vzdálenost. B. Chyba hledání. C. Latence. D. Rychlost plavání. +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001.

6.4.2 Probe test

6.4.2.1 Vliv prenatální expozice MA

Prenatální expozice MA během PD 1-11 neměla vliv na probe test u samců testovaných v dospělosti. Prenatální MA aplikován během stejné aplikační periody (ED 1-11) vedl u samic k prodloužení latence [F (3,224)=5,65; p<0,05] v porovnání s kontrolní skupinou samic.

U skupiny zvířat exponovaných během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) statistická analýza dat odhalila interakci prenatální expozice a akutní aplikace v probe testu. Samci po prenatální expozici MA a akutní aplikaci S (MA/S) uplavali kratší vzdálenost [F (3,224)=4,98; p<0,05] a plavali rychleji [F (3,224)=4,95; p<0,05] (Tab. 6.1) v porovnání s kontrolní skupinou samců (S/S). Prenatální expozice MA během ED 12-22 neměla vliv na žádný z testovaných parametrů probe testu u samic v dospělosti.

6.4.2.2 Vliv neonatální expozice MA

Neonatální expozice MA během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka a také přímo s.c. neovlivnila probe test ani u samců ani u samic v dospělosti.

6.4.2.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti

Akutní aplikace MA neměla vliv na žádný z testovaných parametrů probe testu u samců a samic prenatálně exponovaných během první poloviny gravidity (ED 1-11).

Akutní aplikace drogy neovlivnila probe test u samců ze skupiny zvířat prenatálně exponovaných během druhé poloviny gravidity (ED 12-22), na rozdíl od samic ze stejné aplikační periody, u kterých byla patrná interakce prenatální expozice MA a akutní aplikace MA. Samice MA/MA dosahovaly delší latence [F (3,224)=5,32; p<0,05] v porovnání se samicemi MA/S.

U skupiny zvířat exponovaných během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka vedla akutní aplikace drogy k zvýšení rychlosti plavání u samců [F (3,224)=13,82; p<0,001] bez ohledu na neonatální expozici (Tab. 6.1).

Statistická analýza dat probe testu ze skupiny zvířat exponovaných během PD 1-11 přímo s.c. odhalila interakci neonatální expozice MA a akutní aplikace MA u samců i u samic: samci MA/MA dosahovali delší latence [F (3,224)=4,37; p<0,05], samice MA/MA uplavaly delší vzdálenosti [F (3,224)=10,75; p<0,01] v porovnání se skupinami MA/S.

6.4.2.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu

V rámci porovnání mezipohlavních rozdílů v probe testu odhalila statistická analýza signifikantně významné rozdíly v rychlosti plavání u všech skupin zvířat exponovaných během různých neuro-ontogenetických stadií vývoje. Samice ze všech aplikačních period dosahovaly vyšší rychlosti plavání než samci bez ohledu na prenatální/neonatální či akutní aplikaci [F (3,224)=3,68; p<0,05]. Hodnoty jsou zobrazeny v tabulce 6.1.

Statistická analýza neprokázala vliv estrálního cyklu u samic na parametry v probe testu, proto jsme daný faktor nezahrnuli do tabulky.

Tabulka 6.1 Vliv **prenatální/neonatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S,** vliv **pohlaví** na rychlost plavání (cm/s) v probe testu u dospělých samců a samic exponovaných během **jednotlivých stadií neuro-ontogenetického vývoje.** Hodnoty jsou průměry ±SEM, n=8. +p<0,05 MA/S vs. S/S; ***p<0,001 akutní MA vs. akutní S; ^p<0,05 samice vs. samci; #p<0,05 ED 12-22 vs. PD 1-11 nepřímo.

aplikační perioda		pohlaví	S/S	S/MA	MA/S	MA/MA
ED 1-11		♂	24,48±1,55	27,83±1,47	27,81±1,90 +	29,02±1,76
		♀ ^	26,42±1,69	29,17±1,92	30,17±1,43	31,98±1,17
ED 12-22 #		♂	27,47±1,64	26,04±1,64	22,20±1,64	28,66±1,64
		♀ ^	29,11±1,12	30,98±1,37	29,14±1,29	30,92±1,15
PD 1-11	nepřímo	♂	21,14±1,42	28,81±1,78***	23,77±1,14	28,74±1,05***
		♀ ^	27,42±1,65	31,69±1,64	27,54±1,64	31,42±1,64
	přímo	♂	26,29±1,62	27,41±1,62	26,91±1,37	28,80±1,12
		♀ ^	32,00±1,64	30,38±1,64	28,20±1,64	30,41±1,64

6.4.2.5 Vliv aplikační periody

Statistická analýza odhalila interakci prenatální/neonatální expozici MA a aplikační periody na rychlost plavání zvířat v dospělosti. Zvířata exponovaná MA během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) dosahovala nižší rychlost plavání než zvířata exponovaná během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka [F (3,224)=3,33; p<0,05] (Tab. 6.1). Statistická analýza dat neodhalila další signifikantně významné rozdíly v parametrech probe testu vzhledem na prenatální/neonatální expozici MA během jednotlivých aplikačních period.

6.4.3 Test paměti

6.4.3.1 Vliv prenatální expozice MA

Prenatální expozice MA během první poloviny gravidity (ED 1-11) (Obr. 6.20) neměla vliv na test paměti samců testovaných v dospělosti. U samic vedla prenatální expozice drogou během stejné aplikační periody (ED 1-11) k prodloužení uplavané vzdálenosti [F (3,208)=5,86; p<0,05] (A) a k prodloužení latence [F (3,208)=4,21; p<0,05] (C).

U skupiny samců exponovaných během druhé poloviny gestačního období (ED 12-22) (Obr. 6.20) vedla prenatální expozice MA ke zkrácení uplavané vzdálenosti ke skrytému ostrůvku [F (3,208)=4,04; p<0,05] (E) v porovnání s kontrolní skupinou. U skupiny samic ze stejné aplikační periody nedošlo po prenatální expozici MA k výrazným změnám v testu paměti.

6.4.3.2 Vliv neonatální expozice MA

Neonatální expozice MA během rané laktační periody (PD 1-11) nepřímo prostřednictvím mateřského mléka neměla vliv na test paměti ani u samců ani u samic v dospělosti (Obr. 6.21).

Neonatální expozice MA během rané laktační periody (PD 1-11) (Obr. 6.21) aplikovaná přímo s.c. neovlivnila test paměti u samců v dospělosti. Statistická analýza odhalila signifikantně významné rozdíly v testu paměti u dospělých samic po přímé neonatální expozici drogou během PD 1-11, kde samice proplavaly delší vzdálenost [F (3,208)=5,74; p<0,05] (E), potřebovaly více

času, než skrytý ostrůvek našly [F (3,208)=11,94; p<0,01] (G) a plavaly pomaleji [F (3,208)=6,16; p<0,05] (H) v porovnání s kontrolou.

6.4.3.3 Vliv akutní dávky MA v dospělosti

Akutní aplikace MA během testu MWM neměla vliv na test paměti u skupiny zvířat exponovaných během ED 1-11 (Obr. 6.20).

Statistická analýza odhalila interakci prenatální expozice a akutní aplikace v dospělosti u samců exponovaných během ED 12-22 (Obr. 6.20). Samci po prenatální expozici S a akutní aplikaci MA (S/MA) uplavali kratší vzdálenost [F (3,208)=7,42; p<0,01] (E), měli kratší chyby hledání [F (3,208)=2,72; p<0,05] (F) a potřebovali méně času k nalezení skrytého ostrůvku [F (3,208)=4,12; p<0,05] (G) v porovnání s kontrolní skupinou samců (S/S). Akutní aplikace MA neměla vliv na test paměti u samic ze stejné aplikační skupiny.

Akutní aplikace MA v dospělosti neměla vliv na test paměti u zvířat ze skupiny exponované během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka a také přímo aplikací s.c. (Obr. 6.21).

6.4.3.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu

V rámci porovnání vlivu pohlaví na test paměti odhalila statistická analýza významné mezipohlavní rozdíly u všech skupin zvířat s aplikací během jednotlivých neuro-ontogenetických stadií.

U skupiny zvířat exponovaných během první poloviny gravidity (ED 1-11) (Obr. 6.20) dosahovaly samice horších výsledků v testu paměti než samci: vzdálenost [F (3,208)=21,23; p<0,001] (A); chyba hledání [F (3,208)=24,63; p<0,001] (B); latence [F (3,208)=16,16; p<0,001] (C); rychlost plavání [F (3,208)=4,21; p<0,05] (D). Statistická analýza odhalila interakci prenatální expozice a pohlaví, samice po prenatální expozici MA dosahovaly horších výsledků v testu paměti než samci po prenatální expozici MA: vzdálenost [F (3,208)=8,21; p<0,001] (A); chyba hledání [F (3,208)=4,47; p<0,001] (B); latence [F (3,208)=7,38; p<0,01] (C).

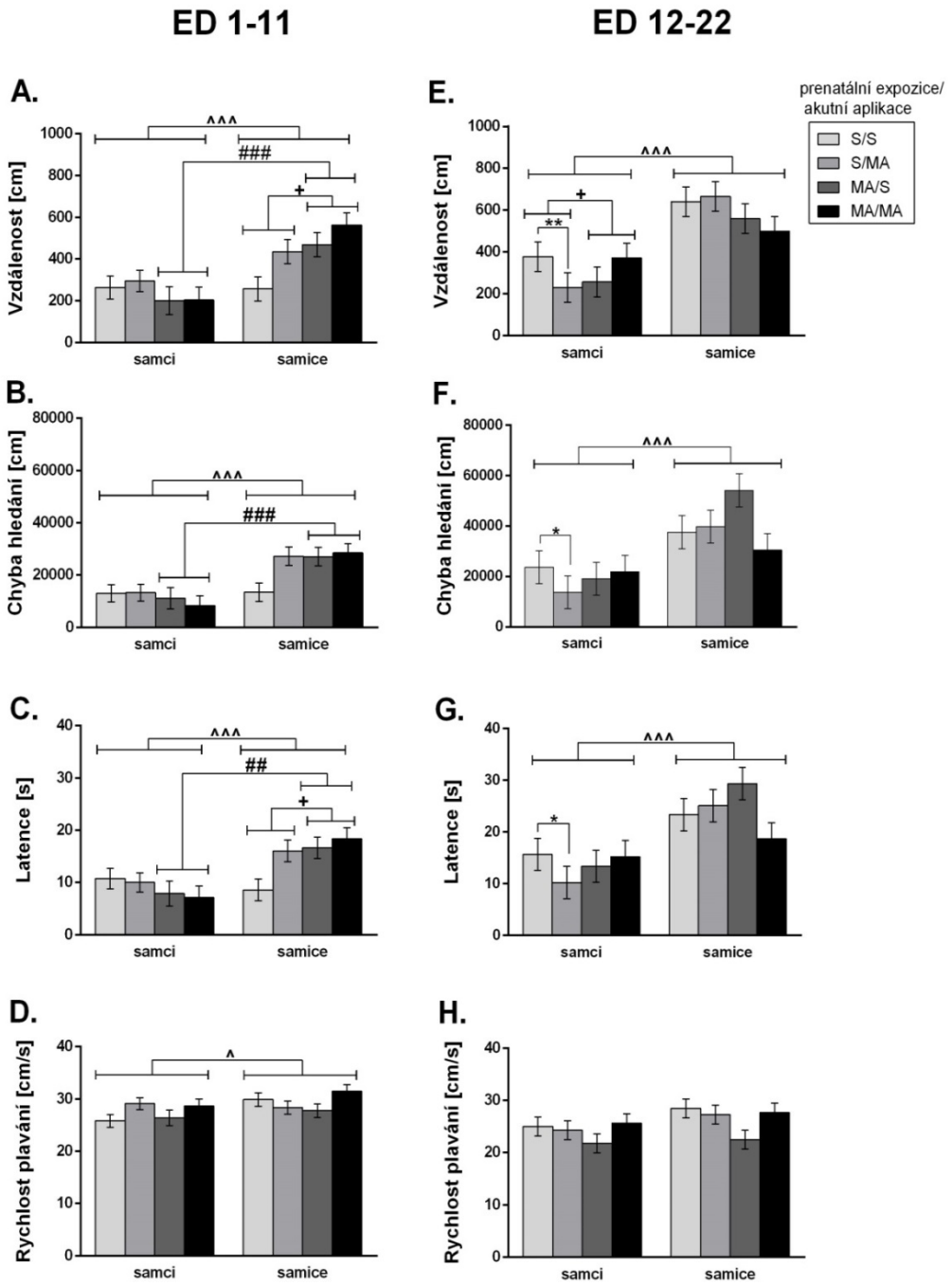
Také samice exponované během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) (Obr. 6.20) dosahovaly horších výsledků v testu paměti v porovnání se samcemi:

vzdálenost [F (3,208)=31,79; p<0,001] (E); chyba hledání [F (3,208)=20,31; p<0,001] (F); latence [F (3,208)=22,59; p<0,001] (G).

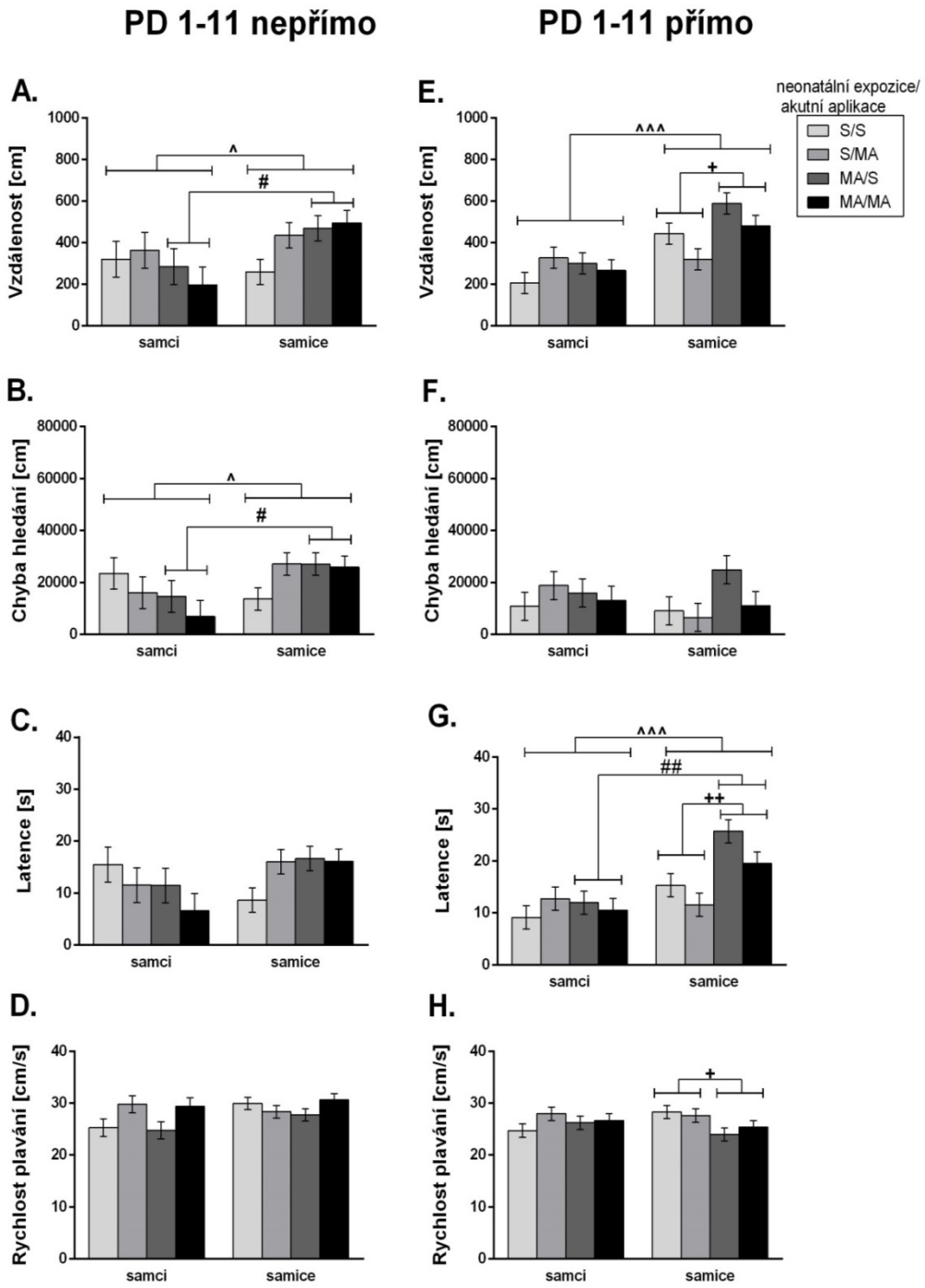
U skupin zvířat ovlivněných neonatálně nepřímo (PD 1-11) (Obr. 6.21) proplavaly samice delší vzdálenost [F (3,208)=5,51; p<0,05] (A) a delší chyby hledání [F (3,208)=4,79; p<0,05] (B) v porovnání se samcemi. Statistická analýza dat odhalila interakci neonatální nepřímé expozice a pohlaví, kde samice po neonatální nepřímé expozici MA dosahovaly horších výsledů v testu paměti než samci po neonatální nepřímé expozici MA: vzdálenost [F (3,208)=5,01; p<0,05] (A); chyba hledání [F (3,208)=4,41; p<0,05] (B).

Samice s aplikací během PD 1-11 přímo s.c. (Obr. 6.21) uplavaly delší vzdálenost [F (3,208)=25,97; p<0,001] (E) a potřebovaly více času na nalezení skrytého ostrůvku [F (3,208)=19,27; p<0,001] (G) než samci. Patrná byla také interakce neonatální přímé expozice s.c. a pohlaví v latenci, kde samice po neonatální přímé expozici MA dosahovaly delší latence [F (3,208)=7,80; p<0,01] (G) než samci po neonatální přímé aplikaci MA.

Statistická analýza neprokázala vliv estrálního cyklu na proces učení u samic, proto jsme daný faktor nezahrnuli do obrázků.



Obr. 6.20 Vliv **prenatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na test paměti u dospělých samců a samic prenatálně exponovaných během **ED 1-11** a **ED 12-22**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8. ED 1-11: A. Vzdálenost. B. Chyba hledání. C. Latence. D. Rychlost plavání. +p<0,05 prenatální MA vs. prenatální S u samic; ^p<0,05, ^^p<0,01, ^^^p<0,001 samice vs. samci; ##p<0,01, ### p<0,001 interakce prenatálního MA a pohlaví. ED 12-22: E. Vzdálenost. F. Chyba hledání. G. Latence. H. Rychlost plavání. +p<0,05 prenatální MA vs. prenatální S u samců; *p<0,05. **p<0,01 akutní MA (S/MA vs. S/S); ^^^p<0,001 samice vs. samci.

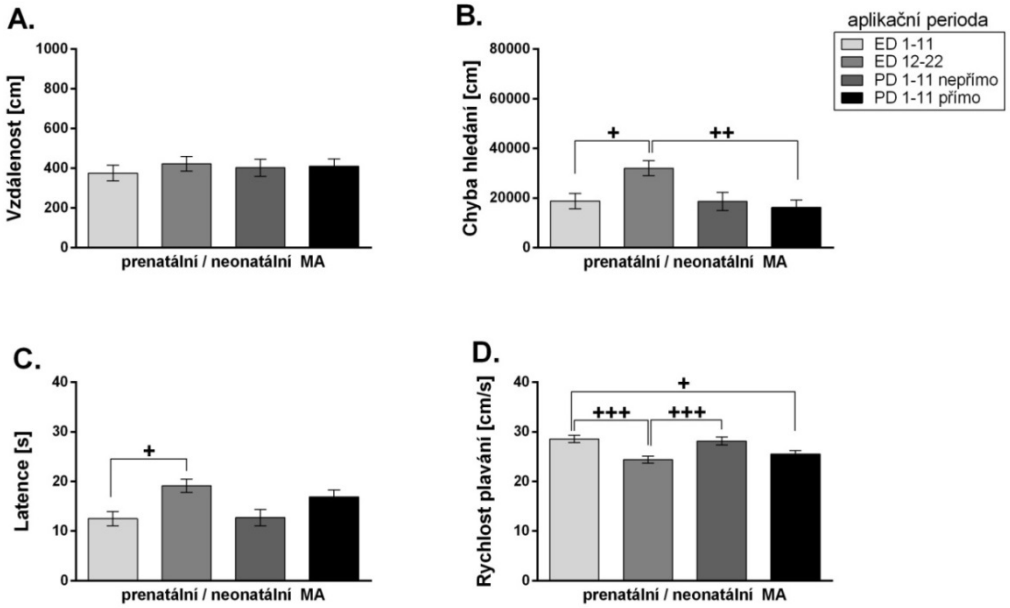


Obr. 6.21 Vliv **neonatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na test paměti u dospělých samců a samic neonatálně exponovaných během **PD 1-11 nepřímo** a **přímo**. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8. PD 1-11 nepřímo: A. Vzdálenost. B. Chyba hledání. C. Latence. D. Rychlost plavání. ^p<0,05 samice vs. samci; #p<0,05 interakce neonatálního MA a pohlaví. PD 1-11 přímo: E. Vzdálenost. F. Chyba hledání. G. Latence. H. Rychlost plavání. +p<0,05, +p<0,01 neonatální MA vs. neonatální S u samic; ^^^p<0,001 samice vs. samci; ##p<0,01 interakce neonatálního MA a pohlaví.

6.4.3.5 Vliv aplikační periody

Statistická analýza odhalila signifikantně významné rozdíly v testu paměti po prenatální/neonatální expozici MA v závislosti na aplikační periodě během různých neuro-ontogenetických stadií (Obr. 6.22).

Při porovnání vlivu prenatální a neonatální expozice MA na uchovávání paměťové stopy statistická analýza odhalila, že zásadnější negativní vliv měla prenatální expozice během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) v porovnání s aplikací drogy během první poloviny gravidity (ED 1-11): chyba hledání [F (3,208)=5,62; p<0,05] (B); latence [F (3,208)=5,22; p<0,05] (C); rychlost plavání [F (3,208)=7,79; p<0,001] (D). Expozice MA během druhé poloviny gravidity (ED 12-22) vedla také k výraznějšímu zhoršení výsledků v testu paměti v porovnání s neonatální expozicí MA během PD 1-11 nepřímo: rychlost plavání [F (3,208)=7,79; p<0,001] (D) a také v porovnání s neonatální přímou aplikací MA s.c. (PD 1-11): chyba hledání [F (3,208)=5,62; p<0,01] (B). Neonatální přímá expozice MA během PD 1-11 vedla k výraznějšímu zpomalení rychlosti plavání [F (3,208)=7,79; p<0,05] (D) v porovnání s prenatální expozicí MA během první poloviny gravidity (ED 1-11).



Obr. 6.22 Vliv **prenatální/neonatální expozice MA** na test paměti v závislosti na **aplikační periodě** během různých **neuro-ontogenetických stadií**. Hodnoty jsou průměry prenatální/neonatální expozice MA bez ohledu na akutní aplikaci v dospělosti ± SEM, n=32. A. Vzdálenost. B. Chyba hledání. C. Latence. D. Rychlost plavání. +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001.

6.4.4 Strategie hledání ostrůvku

6.4.4.1 Vliv prenatální expozice MA

Prenatální expozice MA během ED 1-11 neovlivnila strategie hledání ostrůvku u samců během všech fází testu MWM. Samice ze stejné aplikační skupiny (ED 1-11) po prenatální expozici MA a akutní aplikaci S (MA/S) používaly na 3., 6. a 12. den více tigmotaxi [$\chi 2=11,72$; $p<0,01$] (Obr. 6.23 A) v porovnání se skupinou samic MA/MA, S/S. Negativní vliv prenatální expozice MA se projevil u samic také v počtu použité strategie skenování na 12. den testu MWM [$\chi 2=4,21$; $p<0,05$] (Obr. 6.23 B) a to bez ohledu na akutní aplikaci v dospělosti.

Prenatální expozice MA během ED 12-22 neměla vliv na strategie hledání ostrůvku ani u samců ani u samic v testu MWM (Obr. 6.23 C, D).

6.4.4.2 Vliv neonatální expozice MA

Neonatální nepřímá expozice MA během PD 1-11 prostřednictvím mateřského mléka vedla u samců i samic na 12. den testu MWM k početnějšímu používání strategie skenování (samci [$\chi 2=3,29$; $p<0,05$], samice [$\chi 2=7,31$; $p<0,05$]) (Obr. 6.23 F) v porovnání se skupinou samců a samic neonatálně nepřímo exponovaných S.

Neonatální přímá expozice MA během PD 1-11 s.c. vedla u samců i samic k početnějšímu výskytu strategie tigmotaxe na 3., 6. a 12. den testu MWM (samci [$\chi 2=4,67$; $p<0,05$], samice [$\chi 2=11,75$; $p<0,01$]) (Obr. 6.23 G) v porovnání se samci a samicemi ze skupiny MA/MA, S/S. Negativní vliv neonatální přímé expozice MA s.c. se projevil u samců a samic také v počtu použité strategie skenování na 12. den testu MWM (samci [$\chi 2=3,97$; $p<0,05$], samice [$\chi 2=5,24$; $p<0,05$]) (Obr. 6.23 G).

6.4.4.3 Vliv akutní aplikace MA v dospělosti

Akutní aplikace MA v dospělosti neměla vliv na strategie hledání ostrůvku v testu MWM ani u samců ani u samic exponovaných během jednotlivých stadiích neuro-ontogenetického vývoje (Obr. 6.23).

6.4.4.4 Vliv pohlaví a fáze estrálního cyklu

Statistická analýza strategií použitých na nalezení ostrůvku během testu MWM odhalila signifikantně významné mezipohlavní rozdíly po prenatální léčbě drogou u skupiny zvířat exponovaných během ED 1-11. Samice prenatálně exponované MA používaly častěji strategii tigmotaxe na 3., 6. a 12. den než samci po prenatální expozici MA [$\chi2$=21,37; p<0,001] (Obr. 6.23 A). Interakce prenatální expozice a pohlaví byla patrná také ve výskytu strategie skenování na 12. den testu MWM, kde samice po prenatální expozici MA používaly častěji tuto strategii v porovnání se samcemi po prenatální expozici MA [$\chi2$=29,74; p<0,001] (Obr. 6.23 B).

Mezipohlavní rozdíly ve výskytu strategií byly patrné také u skupiny zvířat exponovaných během ED 12-22. Samice z této aplikační periody používaly během prvních dní testu MWM (1. a 3. den) častěji strategii tigmotaxe [$\chi2$=4,28; p<0,05] (Obr. 6.23 C), v dalších fázích testu MWM (6. a 12. den) používaly častěji strategii skenování [$\chi2$=5,31; p<0,05] (Obr. 6.23 D) než samci ze stejné aplikační skupiny.

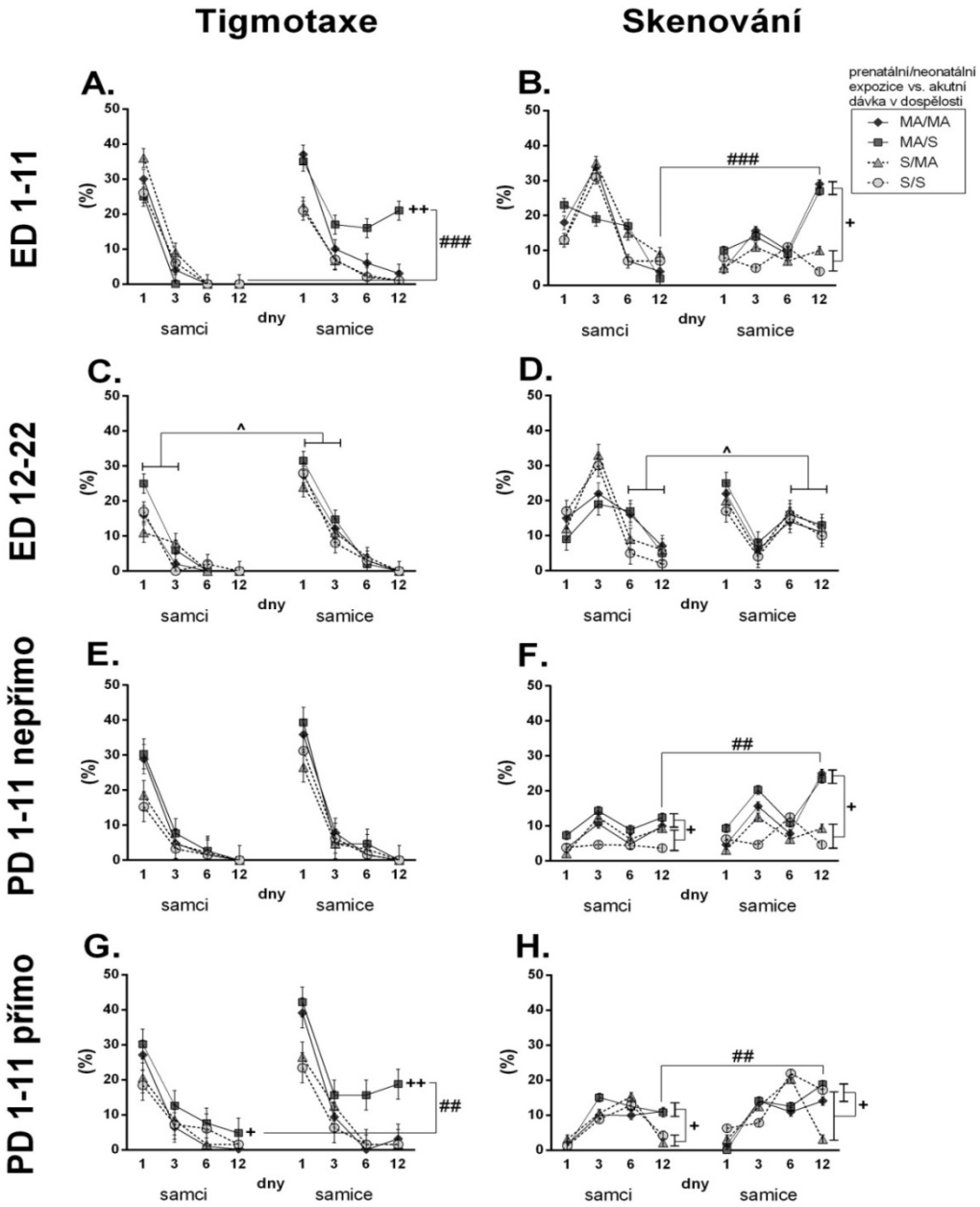
Neonatální expozice MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka měla zásadnější vliv na výskyt strategie skenování na 12. den testu u samic, které používaly tuto strategii na hledání ostrůvku častěji než samci [$\chi2$=14,39; p<0,01] (Obr. 6.23 F).

Neonatální přímá expozice MA s.c. během PD 1-11 měla výraznější negativní dopad na výskyt strategií během testu MWM u samic než u samců. Samice po neonatální expozici MA používaly více tigmotaxi během celého testu MWM [$\chi2$=18,94; p<0,01] (Obr. 6.23 G)a více skenování v testu paměti [$\chi2$=7,38; p<0,05] (Obr. 6.23 H).

6.4.4.5 Vliv aplikační periody

Statistická analýza dat odhalila interakci aplikační periody a prenatální/neonatální expozice MA. Zvířata exponovaná MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka používaly na nalezení ostrůvku v testu paměti častěji strategii skenování v porovnání se zvířaty exponovanými MA prenatálně během ED 12-22 a také se zvířaty exponovanými MA neonatálně s.c. během PD 1-11 [$\chi2$=6,97; p<0,05]. Zvířata exponovaná MA během PD 1-11

přímo s.c. používala na 12. den testu MWM častěji strategii tigmotaxi [$\chi 2$=4,59; p<0,05] v porovnání se skupinou zvířat exponovanou MA během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka.



Obr. 6.23 Vliv **prenatální/neonatální** a **akutní** aplikace **MA** a **S**, vliv **pohlaví** na použité strategie hledání ostrůvku během testu učení (1., 3. a 6. den) a testu paměti (12. den) samců a samic exponovaných během jednotlivých stadií neuro-ontogenetického vývoje. Hodnoty jsou průměry ± SEM, n=8. Tigmotaxe: +p<0,05, +p<0,01 prenatální/neonatální MA vs. prenatální/neonatální S po akutní aplikaci S; ##p<0,01, ###p<0,001 interakce prenatální/neonatální MA vs. pohlaví; ^p<0,05 samice vs. samci. Skenování: +p<0,05, prenatální/neonatální MA vs. prenatální/neonatální S; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 interakce prenatální/neonatální MA vs. pohlaví; ^p<0,05 samice vs. samci.

7 DISKUZE

Hlavním cílem této disertační práce bylo ověřit naši hypotézu, že se negativní účinky aplikace MA potkaním matkám na jejich potomstvo budou lišit v závislosti na době aplikace během jednotlivých stadií gestace a laktace. V předkládané studii jsme použili preklinický model laboratorního potkana, kterého jsme během jeho první a druhé poloviny prenatálního vývoje (ED 1-11, ED 12-22) a během časného neonatálního období (PD 1-11) vystavili účinkům MA v dávce 5 mg/ml/kg. Jednotlivé fáze vývoje CNS korelují s načasováním expozice MA během jednotlivých trimestrů gestace u lidí (Clancy *et al.* 2007). Dávka drogy, kterou jsme zvolili, je koncentrována v mozku plodu v takové hodnotě, která odpovídá hodnotám naměřeným u plodů drogově závislých matek (Acuff-Smith *et al.* 1996; Rambousek *et al.* 2014). Naše předchozí studie ukázala, že tato dávka negativně ovlivňuje vývoj laboratorního potkana (Šlamberová *et al.* 2006). Také distribuce MA do mateřského mléka v této dávce koreluje s hladinami drogy u potkanů a u lidí (Behnke *et al.* 2013; Rambousek *et al.* 2014). Toto dávkování proto slouží jako vhodný experimentální model pro stanovení rizik expozice účinkům drogy *in utero* a při přenosu mateřským mlékem.

7.1 VLIV METAMFETAMINU NA BEHAVIORÁLNÍ TESTY

7.1.1 Test podmíněného vyhledávání drogy (CPP)

Test CPP jsme použili na sledování vlivu prenatální a neonatální expozice MA na aktivní vyhledávání drogy v dospělosti.

Výsledky CPP testu ukázaly, že MA v dávce 5 mg/ml/kg podávaný v dospělosti během fáze podmiňování vede k vytvoření drogové závislosti. Zvířata strávila více času v komoře, spojené s podáváním drogy. Výsledky neodhalili korelaci mezi podáváním drogy během fáze podmiňování a počtem vstupů do komory, ve které jim byla droga aplikována. Tyto výsledky jsou v souladu s našimi předchozími studiemi (Šlamberová *et al.* 2012; Šlamberová *et al.* 2011b), stejně jako se studiemi jiných autorů (Gehrke *et al.* 2003; Schindler *et al.* 2002). Gehrke *et al.* (2003) ve své studii prokázali, že proces podmiňování je přímo úměrný dávce drogy. Opakované podávání nižších dávek MA (0,3-2 mg/ml/kg) během fáze podmiňování vedlo v CPP testu ke zvýšené horizontální

motorické aktivity. Příčinou zvýšené lokomoce po podání nižších dávek MA je nejen v testu CPP, ale také v dalších behaviorálních testech, zvýšená hladina dopaminu uvolněného z nervových terminálů, co ve výsledku vede k psychomotorickým aktivačním účinkům, které lze prokázat jako zvýšení počtu vstupů do komory asociované s aplikací drogy (Shimosato and Ohkuma 2000; Schindler *et al.* 2002). Studie Gehrke *et al.* (2003) rovněž odhalila, že aplikace vysokých dávek MA způsobila celkový pokles aktivity (nižší počet vstupů) v prospěch času stráveného v komorách asociovaných s aplikací drogy.

Výsledky testu CPP nepotvrdily naši hypotézu, že by prenatální a neonatální expozice MA během jednotlivých stadií neuro-ontogenetického vývoje indukovala zvýšenou míru aktivního vyhledávání drogy v dospělosti. Pouze skupina zvířat exponovaná MA během PD 1-11 prokázala značné rozdíly ve vyhledávání drogy během testu CPP. Tato zvířata strávila méně času v komorách asociovaných s aplikací drogy. Naše dřívější studie zjistily, že prenatální expozice MA zvyšuje citlivost k účinkům amfetaminu během podmiňování, ale současně vyvolává toleranci k podmiňování kokainem (Šlamberová *et al.* 2012; Šlamberová *et al.* 2011b). Rozdíly v citlivosti prenatálního MA vůči drogám během podmiňování spočívají v různém mechanismu účinku. MA a jiné amfetaminy ovlivňují nejčastěji noradrenergní systém, méně dopaminergní a nejméně ze všech serotoninergní systém, zatímco kokain ovlivňuje nejčastěji serotoninergní systém (Gygi *et al.* 1996; Rothman *et al.* 2001; Shoblock *et al.* 2003). Výsledky dalších studií potvrzují zvýšené aktivní vyhledávání drogy v testu CPP či testu „self-administration“ po prenatální expozici kokainu (Estelles *et al.* 2006; Heyser *et al.* 1992; Rocha *et al.* 2002), nicméně všechny tyto studie používaly během fáze podmiňování různé drogy (kokain, amfetamin, morfin). V současné době neexistují žádné studie, které by zkoumaly dlouhodobý účinek prenatální či neonatální expozice MA na aktivní vyhledávání drogy v dospělosti. Domníváme se, že prenatální ani neonatální expozice MA během různých stadií neuro-ontogenetického vývoje nevyvolává změny v aktivním vyhledávání drogy v dospělosti.

Jeden z aspektů předkládané studie v rámci CPP testu byl také vysvětlit potencionální mezipohlavní rozdíly ve vztahu k účinkům MA a vzniku drogové

závislosti. Mezipohlavní rozdíly v dopaminovém systému odměny vysvětlují rozdíly nejenom v samotném efektu drogy, ale také se podílejí na variabilitě hloubky závislosti mezi pohlavími (Belin and Everitt 2008). Zatímco klinické studie poukazují na zvýšenou citlivost žen na účinek drogy, u žen snadněji a rychleji vznikne závislost v porovnání s muži (Becker and Hu 2008; Becker *et al.* 2001; Schindler *et al.* 2002), v našem případě však samci (ED 1-11, PD 1-11) strávili mnohem více času v komorách asociovaných s aplikací drogy v porovnání se samicemi. Podobné výsledky naznačují i další neopublikované výsledky z naší laboratoře. V případě dalších studií (Schindler *et al.* 2002), ve kterých se během fáze podmiňování aplikoval MA v širokém spektru dávkování (0,1-5,6 mg/kg), se buď neprokázaly mezipohlavní rozdíly, nebo byli samci aktivnější ve vyhledávání drogy v testu CPP než samice. Shansky and Woolley (2016) se domnívají, že rychlý přechod do kompulzivního užívání drog je způsoben zvýšeným uvolněním dopaminu v dorsolaterálním striatu v porovnání s nucleus accumbens. Muži s nižšími hodnotami dopaminu v nucleus accumbens jsou impulzívnější a mají větší pravděpodobnost vzniku drogové závislosti (Belin and Everitt 2008; Dalley *et al.* 2007). Toto tvrzení částečně vysvětluje naše výsledky, že samci po neonatální expozici MA během PD 1-11 (nepřímo prostřednictvím mateřského mléka), co představuje období největšího neuronálního vývoje a v našem případě největší dopad neonatální expozice MA, vyhledávali komoru související s aplikací drogy méně, než skupina samců neonatálně exponovaná fyziologickému roztoku. V závěru lze konstatovat, že naše výsledky podporují dosavadní poznatky o vlivu pohlavních hormonů na dopaminergní systém u samců a samic, jak bylo popsáno výše.

7.1.2 Test sociálních interakcí (SIT)

Sociální chování zahrnuje komplex různých forem interakcí mezi jednotlivci, které jsou nezbytné pro zdravý duševní a tělesný vývoj po celou dobu života (Fentress 1988). Studie Homer *et al.* (2008) zabývající se neurotoxickými účinky prenatální a postnatální expozice MA na dopaminergní a serotoninergní neurotransmiterový systém poukázala na korelaci mezi neurochemickými změnami v CNS a změnami v sociálních interakcích potkanů. Výsledky našeho experimentu ukázaly, že prenatální a neonatální expozice MA v dávce 5 mg/ml/kg

snižuje sociální kontakt mezi dvěma neznámými potkany. Samci po prenatální expozici MA během ED 1-11 strávili méně času genitálním očicháváním. Samice exponované během ED 1-11, ED 12-22 a po přímé expozici MA s.c. během PD 1-11 vykazovaly nižší aktivitu v následování se. K podobným výsledkům dospěly také naše předcházející studie (Schutová *et al.* 2013; Šlamberová *et al.* 2010; Šlamberová *et al.* 2011a). Byly publikovány studie, které dokumentují negativní účinky prenatální expozice MA na sociálnu hru v pubertálním období, tyto studie dále uvádějí, že neexistuje souvislost mezi negativním dopadem na sociální hru adolescentních potkanů a snížením sociálního kontaktu v dospělosti (Behnke *et al.* 2013). Klinické zprávy prokázaly, že zneužívání MA během různých fází gestace u těhotných matek způsobuje poškození čelního laloku mozku plodu, co může vést ke zhoršení společenského fungování v dospělosti (Behnke *et al.* 2013; Jablonski *et al.* 2015; Robinson and Kolb 2004). Na základě našich výsledků se zdá, že expozice MA během prenatálního a neonatálního období ovlivňuje vývoj monoaminergních nervových zakončení různými způsoby jak u samců, tak u samic, které jsou nejvýraznější v období pozdní gestace a časné novorozenecké periody neuro-ontogeneze u potkanů.

Jedním z paradoxů spojených s užíváním MA je to, že tato psychoaktivní droga je mnohokrát zneužívaná právě za účelem navázání společenských kontaktů a interakcí (Clemens *et al.* 2004; Homer *et al.* 2008). Mnoho studií naznačuje právě opačné účinky, jako je paranoia, deprese, zvýšená agresivita (Clemens *et al.* 2004; Miczek and Tidey 1989). Navzdory původnímu záměru, MA narušuje sociální chování (Homer *et al.* 2008). Pozměněné sociální chování po akutní aplikaci MA (1 mg/ml/kg) bylo také prokázáno v naší studii. Zvířata po akutní aplikaci MA v dospělosti vykazovala ve srovnání s kontrolními skupinami signifikantně méně sociálních interakcí. Tyto výsledky jsou v souladu s našimi předchozími studiemi (Schutová *et al.* 2013; Šlamberová *et al.* 2010; Šlamberová *et al.* 2011a) a dalšími (Clemens *et al.* 2004; Davidson *et al.* 2001), které ukazují, že akutní MA vede ke snížení sociálních kontaktů mezi potkany.

MA se váže na dopaminové transportéry, které regulují dopaminergní přenos inhibicí zpětného vychytávání dopaminu (Davidson *et al.* 2001; Homer *et al.* 2008). Tento proces vede ke zvýšení produktivity, motorické aktivity a energie

uživatelů (Meredith *et al.* 2005). Výsledky této studie ukázaly, že akutní aplikace MA v dospělosti zvyšuje čas strávený lokomocí u samců exponovaných během ED 12-22 a čas strávený vztyčováním (průzkumné chování) u samic exponovaných během PD 1-11 přímo s.c. ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat. Tato studie potvrzuje naše předchozí poznatky, že akutní aplikace MA vede ke zvýšení nesociálních aktivit dvou neznámých zvířat (Šlamberová *et al.* 2015; Šlamberová *et al.* 2011a) a studie dalších (Clemens *et al.* 2004). Můžeme spekulovat, zda nebylo snížení sociálních interakcí spíše důsledkem zvýšení nesociálních aktivit po akutním podání MA? Naše statistické výsledky však ukázaly, že akutní podání MA zvýšilo lokomoci a průzkumné chování pouze u dvou skupin potkanů, zatímco sociální kontakt byl nižší u všech testovaných zvířat. Clemens *et al.* (2004) zjistili, že i několik týdnů po podání akutního MA vyhledávaly potkany podstatně méně sociální kontakt než kontrolní skupina. Všechna tato zjištění naznačují, že změny v sociálním chování jsou spojeny s akutní aplikací MA v dospělosti.

Meso-kortiko-limbická dopaminergní dráha hraje klíčovou roli ve zprostředkovávání sociálních interakcí a chováním způsobeným užitím drogy. Tento systém tvoří neurony produkující dopamin, axony zasahují z ventrální tegmentální oblasti středního mozku do dalších oblastí předního mozku, včetně nucleus accumbens, prefrontální kůry, ventrální tegmentální oblasti a amygdaly. Tento neurální obvod obsahuje také receptory steroidních pohlavních hormonů; cirkulující androgen a estrogen ovlivňují ontogenezi těchto specifických oblastí mozku, čím se zvýrazňuje sexuální dimorfismus po neuroanatomické, chemoarchitektonické a nakonec i behaviorální stránce nejenom během vývoje, ale také v dospělosti (Pak *et al.* 2007; Patisaul *et al.* 2003). Hladiny pohlavních hormonů jsou dynamické a mohou interagovat s drogou (Gleason *et al.* 2009; Patisaul *et al.* 2003). Výsledky naší studie neprokázaly žádné mezipohlavní rozdíly v prenatální či neonatální expozici MA.

S ohledem na expozici MA během jednotlivých neuro-ontogenetických stadií vývoje naše výsledky ukázaly, že čas strávený ve speciálních vzorcích sociálního chování (vzájemné očichávání, podlézání) je u samců delší než u samic. Jiné speciální vzorce sociálního chování (genitální očichávání) byly

naopak delší u samic než u samců. Existují studie, které uvádějí, že samice strávily více času vztyčováním (nesociální aktivita) než samci. Pohlavní rozdíly v sociální a nesociální aktivitě pravděpodobně souvisejí s pohlavními rozdíly v neuroanatomii neuronové sítě pro sociální chování, která se vyvíjí během druhé poloviny gestace do prvních tří týdnů postnatálně. V mechanismu účinku pohlavních hormonů během časných postnatálních fází vývoje hraje klíčovou roli hormon estradiol. V samčím mozku během tohoto stadia enzym aromatáza konvertuje cirkulující testosteron na estradiol, který inhibuje apoptózu neuronů v těchto specifických oblastech mozku. Tento proces tedy vede k většímu objemu mediální preoptické oblasti a mediální amygdaly u samců v porovnání se samicemi (Arai *et al.* 1996; Pak *et al.* 2007; Patisaul *et al.* 2003). Tyto struktury zpracovávají informace pro sociální čichové stimuly (Dudley *et al.* 1992), které mohou odpovídat v našem případě vzájemnému očichávání. Na druhou stranu ventrální tegmentální oblast, nucleus accumbens, prefrontální kortex a další části neurální sítě pro sociální chování mají 2-3 x početnější dendritické trny u samic než u samců (Kingsbury *et al.* 2012; Weissman and Caldecott-Hazard 1995), což může být důvodem, proč samice strávily více času genitálním očicháváním a následováním se než samci. Studie Margolis *et al.* (2006) naznačuje, že dopaminergní neurony ve ventrální tegmentální oblasti jsou v sociálních kontextech senzitivnější u žen oproti mužům. Pomocí experimentu, založeného na sledování koncentrací c-fos/tyrosinhydroxylázy, jako esenciálního enzymu pro syntézu dopaminu, bylo zjištěno, že ženy testované v SIT měly více c-fos/tyrosinhydroxylázových neuronů v celé ventrální tegmentální oblasti ve srovnání s muži. Aktivita dopaminergních neuronů byla závislá pouze na specifických společenských podnětech.

Jak již bylo uvedeno výše, po akutním podání psychostimulačních drog dochází v neuronálním okruhu systému odměny k uvolňování dopaminu. Mnoho studií popisuje, že amfetaminy a kokain indukují silnější uvolňování dopaminu a serotoninu u žen oproti mužům (Homer *et al.* 2008; Milesi-Halle *et al.* 2005). Průzkumové chování je zprostředkováno prostřednictvím dopaminergního systému, což by vysvětlovalo korelaci s našimi dalšími výsledky, kdy samice strávily více času vztyčováním se v porovnání se samci. Všechna dosavadní studie

podporují naše výsledky o mezipohlavních rozdílech v sociálním a nesociálním chování dospělých zvířat.

Naše výsledky navíc ukázaly, že hormonální změny během ovariálního cyklu ovlivňují nesociální chování samic v testu SIT. Toto zjištění souhlasí se studií Stack *et al.* (2010), která neodhalila vliv ovariálního cyklu na sociální interakce potkanů. Rey et al. (2014) ve své studii vysvětluje příčinu. Během pohlavní fáze cyklu, kdy jsou hladiny estradiolu vysoké, dochází k zániku sociálního chování důsledkem exprese c-fos v prefrontálním kortexu a bazolaterální amygdale. Když jsou hladiny estradiolu nižší, je tento vztah obrácen a sociální chování posíleno. V naší studii samice po akutní aplikaci MA, nacházející se v pohlavní fázi cyklu proestrus, strávily více času lokomocí v porovnání se skupinou samic, nacházející se v mezipohlavní fázi cyklu diestrus. Jak je známo z předcházejících studií, estradiol stimuluje sekreci dopaminu ve striatu po užití psychostimulačních drog, co se projeví zvýšenou motorickou aktivitou u samic, ale ne u samců. Rozdíly v motorické aktivitě samic během ovariálního cyklu naznačují, že s výjimkou mesolimbické dopaminové dráhy je pravděpodobně také glutamátergní systém ovlivněn vyššími hladinami estrogenu během pohlavní fáze cyklu (Hrubá *et al.* 2012).

7.1.3 Test Laboras

Test Laboras jsme použili při sledování vlivu MA na horizontální a vertikální pohybovou aktivitu zvířat v neznámém prostředí, ale s domácími podmínkami.

Naše výsledky ukázaly, že expozice MA během jednotlivých stadií neuro-ontogenetického vývoje vedla ke snížení celkové motorické aktivity pouze u samic prenatálně exponovaných během první poloviny gestační periody (ED 1-11). Tyto výsledky jsou v souladu s našimi předchozími studiemi a studiemi jiných autorů (Glatt *et al.* 2000; Schutová *et al.* 2010; Schutová *et al.* 2013; Šlamberová *et al.* 2013), ve kterých prenatální expozice MA během celé gestace neovlivnila lokomoční a průzkumné chování u samců, ale snížila úroveň motorické aktivity u samic. Naše výsledky nepotvrdily naši hypotézu, že prenatální a neonatální expozice MA může vyvolat změny v chování samců a samic přetrvávajících do dospělosti. Stejné výsledky ukazuje práce Acevedo *et*

al. (2007), která neprokázala účinky neonatální expozice MA (5 mg/kg) na chování dospělých myší. Studie Vorhees *et al.* (1994b) demonstruje sníženou lokomoci u dospělých samců po neonatální expozici MA v dávce 30 mg/kg během PD 1-10 a PD 11-20, zatímco u samic neměla neonatální expozice MA vliv na lokomoci. Rozdíly ve výsledcích Laboras testu mezi naši studii a studiemi jiných mohou být způsobeny rozdílnou expoziční dávkou drogy, ale také rozdílnou aplikační periodou a načasováním expozice.

Podobně jako ve výsledcích naši předchozí studie (Schutová *et al.* 2013), rozdílný účinek prenatální expozice MA u samic a samců může být způsoben pohlavním dimorfismem ve vývoji mesolimbického dopaminergního systému mozku (Gentry *et al.* 2004; Milesi-Halle *et al.* 2005). Vzestup hladin estrogenu působí pozitivně na velikost dendritického pole v některých strukturách (prefrontální kůra, nucleus accumbens) u samců, ale ne u samic, zatímco u ostatních struktur (orbitofrontální kůra) vyšší hladiny estrogenu působí pozitivně na velikost dendritické pole u samic, ale ne u samců (Robinson and Kolb 2004). Vzhledem k tomu, že hladina estrogenu vzrůstá s postupujícím stupněm maturace CNS, estrogen ve stále větší míře desenzitizuje také transportéry pro dopamin ve vyvíjejícím se mozku samců a samic rozdílně (Castner *et al.* 1993), což mezipohlavní rozdíly v účincích MA během vývoje CNS ještě zvýrazňuje. Jak již bylo diskutováno v předešlé části o motorické aktivitě potkanů v SIT, také výsledky testu Laboras naznačují, že samice jsou citlivější k účinkům psychostimulancií než samci. Další studie prokázala zvýšenou aktivitu tyrosinhydroxylázy v nucleus caudatus a putamen, v substantia nigra u samců, ale ne u samic po aplikaci MA během neonatálního období (Gomes-da-Silva *et al.* 2000). Tyto poznatky z předcházejících studií podporují naše výsledky a naznačují, že expozice MA během gestace a časného postnatálního vývoje může mít stimulační účinek na dozrávání klíčového enzymu pro biosyntézu dopaminu v nigrostriatálním dopaminergním systému.

Pokud jde o akutní aplikaci MA v dospělosti, naše výsledky ukázaly, že dávka 1 mg/ml/kg podaná těsně před vložením zvířete do otevřené arény, vedla ke zvýšení horizontální i vertikální motorické aktivity všech testovaných zvířat, a to bez ohledu na prenatální a neonatální expozici. Tyto výsledky odpovídají

našim předchozím studiím (Hrubá *et al.* 2012; Šlamberová *et al.* 2010; Šlamberová *et al.* 2011a). Shodují se také se studiemi jiných autorů, které ukázaly, že nízké dávky psychostimulancií způsobily u zvířat zvýšení lokomoce v závislosti na dávce. I v tomto případě byly příčinou zvýšené motorické aktivity změny v meso-limbickém dopaminergním systému, jelikož se v jedné studii ukázalo, že lokomoce nebyla následkem amfetaminů zvýšená u zvířat s lézí nucleus accumbens (Kelly *et al.* 1975).

Naše výsledky také ukázaly, že samice jsou v neznámém prostředí mnohem aktivnější než samci, což odpovídá výsledkům předcházejících studií, které tento poznatek doplňují o vysvětlení důvodu zvýšené motorické aktivity samic. Uvádí, že neznámé prostředí je pro samice zajímavějším stimulem než pro samce, což vede k vyššímu uvolňování dopaminu u samic než u samců (Gentry *et al.* 2004). Tyto mezipohlavní rozdíly byly patrné také u zvířat po akutní aplikaci MA v dospělosti. Výsledky potvrdily naše dosavadní poznatky, že akutní MA v dávce 1 mg/ml/kg vede k zvýšení celkové motorické aktivity v testu Laboras více u samic než u samců. Příčina pravděpodobně spočívá v mechanismu degradace drogy. Je známo, že ženy eliminují drogy pomaleji než muži kvůli rozdílným hladinám cytochromu P450 a dalších degradačních enzymů (Kato and Yamazoe 1992; Milesi-Halle *et al.* 2005; Roth and Carroll 2004). Toto tvrzení podporuje studie Rambousek *et al.* (2014), ve které vykazovaly samice v plazmě a v mozku po akutní dávce MA (1 a 5 mg/ml/kg) významně vyšší koncentraci MA v porovnání se samci.

7.1.4 Test Morrisova vodního bludiště (MWM)

V kognitivních testech jsme testovali vliv prenatální, neonatální a akutní aplikace MA v dospělosti na proces učení a paměti, ale také na lokomoci, jelikož v každém testu byla u zvířat zaznamenána rychlost plavání.

Naše výsledky ukazují, že prenatální expozice MA v dávce 5 mg/ml/kg během první poloviny gestace (ED 1-11) vedla k narušení procesu učení a paměti u samic, na rozdíl od skupiny samic po prenatální expozici MA během druhé poloviny gestace (ED 12-22), které neprojevily zhoršení kognitivních funkcí. U samců prenatální expozice MA během první a druhé poloviny gestačního období neměla vliv na učení ani konsolidaci prostorové mapy, testované na 12.

den testu MWM. Naše výsledky ukázaly, že deficity v učení u samic exponovaných prenatálně během ED 1-11 se projevily také v probe testu a testu paměti, tyto samice uplavaly delší vzdálenosti a potřebovaly více času, než skrytý ostrůvek našly. Výsledky jsou v souladu s našimi předchozími studiemi (Macúchová *et al.* 2013; Macúchová *et al.* 2014; Schutová *et al.* 2008; Šlamberová *et al.* 2014), ve kterých prenatální expozice MA ve stejné dávce během celého období gestace neovlivnila schopnost učení a paměti jak u samců, tak u samic v dospělosti. Také další studie ukázaly, že prenatální expozice MA v různém dávkování (0,625-10 mg/kg/den) (Weissman and Caldecott-Hazard 1995) během delších aplikačních period (jeden týden před zabřeznutím a během gestace) (McDonnell-Dowling *et al.* 2014) neměla vliv na prostorové učení a paměť zvířat v dospělosti. Acuff-Smith *et al.* (1996) ve své studii zjistili, že učení a konsolidace paměťové stopy dospělých zvířat, testovaných v MWM, byly poškozeny pouze po prenatální expozici MA vyššími dávkami (15 a 20 mg/kg). Janus (2004) poukazuje na fakt, že dvě zvířata, která na nalezení skrytého ostrůvku potřebují přibližně stejný čas, mohou využívat rozdílné strategie k nalezení ostrůvku, což může být rovněž známkou deficitu v kognitivních funkcích. Zatímco strategie tigmotaxe představuje přetrvávající plavání podél okraje bazénu s ojedinělým plaváním do středu bazénu, které zvíře využívá první 1-2 dny během učení, strategie skenování představuje neorganizované plavání v centru bazénu a náhodné nalezení ostrůvku, charakteristické pro 3. -4. den učení. V dalších fázích testu MWM by už zvíře mělo znát přibližnou polohu skrytého ostrůvku a plavat přímo na něj. Analýza strategií potvrdila negativní vliv prenatální expozice MA během ED 1-11 na prostorové učení a paměť samic v dospělosti. Tyto samice používaly stále a ve vyšší míře tigmotaxi na 3. a 6. den testu učení a na 12. den testu paměti skenování místo přímého plavání na ostrůvek v porovnání s kontrolní skupinou. Doposud neexistuje mnoho studií, které by opisovaly vliv prenatální expozice MA na prostorové učení a paměť u samic v dospělosti. Na základě předešlých výsledků z naší laboratoře lze v této studii shrnout, že prenatální expozice MA nevede k vytvoření deficitů v prostorovém učení a paměti u samců v dospělosti a že vliv prenatální expozice MA

na kognitivní schopnosti samic závisí od načasování expozice během jednotlivých stadií prenatálního vývoje.

Výsledky této studie dále ukázaly, že oba druhy neonatální expozice MA (5 mg/ml/kg) během PD 1-11 (nepřímá a přímá) vedou ke zhoršení schopnosti naučit se polohu skrytého ostrůvku. Samci i samice po neonatální expozici drogou vykazovali vyšší chybu hledání a delší latence. Dostupné studie naznačují, že chyba hledání je přesnějším ukazovatelem orientace v prostoru než latence (Gallagher *et al.* 1993). Výkon dvou potkanů se stejnou latencí může být značně odlišný. Potkan, který si přibližně pamatuje lokalizaci ostrůvku, krouží v příslušné oblasti a najde ostrůvek za stejnou dobu jako potkan, který si ostrůvek nepamatuje a plave v různě velké vzdálenosti od ostrůvku, který pak najde náhodně. Navíc latence úzce souvisí s rychlostí plavání. Chyba hledání vyjadřuje přímou vzdálenost potkana od ostrůvku v průběhu pokusu (Gallagher *et al.* 1993). Naše výsledky tedy jasně poukazují na narušení procesu učení během testu MWM. Na druhé straně, výsledky probe testu neodhalily vliv neonatální expozice MA během rané laktační periody ani u samců ani u samic. V testu paměti na 12. den MWM se projevili deficity pouze u skupiny zvířat exponované MA přímo s.c. Samci i samice proplavali delší vzdálenost a měli delší latence, než ostrůvek našli. Analýza strategií prostorového mapování potvrdila negativní dopad nepřímé a přímé expozice MA během PD 1-11 na učení a paměť dospělých zvířat. Neonatální nepřímá expozice MA vedla u samců i samic v testu paměti k početnějšímu používání strategie skenování v porovnání s kontrolní skupinou zvířat. Vyšší výskyt tigmotaxe na 3., 6. a 12. testu a skenování na 12. den u skupiny zvířat exponované MA přímo s.c. v porovnání s kontrolou potvrdily narušení procesu učení a konsolidace paměťové stopy. Výsledky odpovídají našim dosavadním studiím, ve kterých jsme prokázali výrazné deficity v prostorovém učení a paměti samců po postnatální expozici MA během PD 1-21 (Hrubá *et al.* 2010). Existují další studie popisující poruchy v učení a paměti způsobené expozicí MA během různých senzitivních období během vývoje mláďat. Např. aplikační periody PD 6-15 a PD 11-20, během kterých byl aplikován MA v dávkách 10-25 mg/kg, se ukázaly jako více citlivé na podání MA, zatímco aplikační periody PD 1-10 nebo PD 21-30 byly méně citlivé na

podání MA (Jablonski *et al.* 2015; Schaefer *et al.* 2008; Vorhees *et al.* 2009). Vorhees *et al.* (2004) ukázali, že podávání MA během PD 1-10 v dávce 30 mg/kg/den vyvolalo změny pouze v motorické aktivitě dospělých potkanů testovaných v MWM, zatímco podávání MA v dávce 40 mg/kg/4-x/den během PD 11-20 vedlo k redukci schopnosti naučit se polohu skrytého ostrůvku (Vorhees *et al.* 1994a; Vorhees *et al.* 1994b). Také další studie ukázala, že neonatální podávání MA v dávkách 5, 10 nebo 15 mg/kg/4-x/den během PD 11-20 způsobilo poruchy v prostorovém učení a paměti (Williams *et al.* 2003b). Výsledky této studie a studie jiných autorů naznačují, že rozsáhlé deficity v učení a paměti mohou být spojeny s negativním dopadem expozice MA na vývoj hipokampu, který probíhá od ED 14 do prvních tří týdnů postnatálně.

Co se týče vlivu akutní aplikace MA v dávce 1 mg/ml/kg na první fázi testu MWM, fázi učení, zjistili jsme, že aplikace drogy v dospělosti neměla vliv na prostorové učení zvířat exponovaných během všech aplikačních period. V testu probe jsme odhalili interakci prenatální a neonatální MA expozice s akutní aplikací drogy v dospělosti. Skupina samic, exponovaných MA během ED 12-22 a skupina samců, exponovaných MA během PD 1-11 přímo s.c. dosahovala delších latencí po akutní aplikaci MA. Skupina samic, exponovaných MA během PD 1-11 přímo s.c. dosahovala delších vzdáleností po akutní aplikaci MA v porovnání s kontrolní skupinou. V tomto případě přisuzujeme deficity v prostorovém učení spíše účinkům prenatální a neonatální expozici MA než aplikaci MA v dospělosti. Akutní aplikace MA v dospělosti neměla vliv na test paměti u zvířat exponovaných během ED 1-11 a PD 1-11 (nepřímo a přímo). Pouze u skupiny samců exponovaných během ED 12-22 vedla akutní aplikace MA ke zkrácení uplavané vzdálenosti, chyby hledání a latence. 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 (Simoes *et al.* 2007). Některé preklinické studie uvádějí, že akutní aplikace MA při nízkých dávkách (0,1-0,4 mg/ml/kg) může způsobit zlepšení v kognitivním zpracování (Grilly and Loveland 2001), zatímco vyšší dávky MA (3 mg/ml/kg a více) indukují zhoršení prostorového učení a paměti (Robinson and Kolb 2004).

Jak bylo zmíněno ve studii Meredith *et al.* (2005), závažnost kognitivních deficitů závisí na dávce a frekvenci užívání drogy.

Účinek akutní dávky MA se projevil jen u samců ve zvýšení rychlosti plavání v porovnání s kontrolní skupinou samců. V další fázi testu MWM, probe testu, akutní aplikace zvýšila rychlost plavání pouze u skupiny zvířat exponovaných během PD 1-11 nepřímo prostřednictvím mateřského mléka. V testu paměti neměla akutní aplikace MA vliv na rychlost plavání. Akutní aplikace MA nevedla ke zvýšení rychlosti plavání ani v jednom testu MWM u testovaných samic v dospělosti. Tyto výsledky jsou v souladu s předešlými výsledky z naší laboratoře. Schutová *et al.* (2009) ve své studii zaznamenali zvýšené rychlosti plavání u samců způsobené akutní aplikací MA, na rozdíl od studie Macúchové *et al.* (2013), která ukázala, že aplikace MA v dospělosti nemá vliv na rychlost plavání u samic. Rychlost plavání slouží jako ukazovatel míry motivace k nalezení ostrůvku. Naše výsledky naznačují, že akutní aplikace MA vedla k zesílení motivace samců najít polohu skrytého ostrůvku v testu učení, kdy skrytý ostrůvek představoval nový, zajímavý objekt, zatímco během dalších fází testu MWM mohli mít samci nižší zájem o tento známý objekt (Lubbers *et al.* 2007). MA aplikovaný v dospělosti pravděpodobně způsobil změny v meso-limbickém dopaminergním systému, který je znám také jako okruh motivace (Kandel *et al.* 1986; Nocjar and Panksepp 2002). Tato naše domněnka je podporována zjištěním, že rychlost plavání postupně klesala během 6-denního testu učení ve stejné míře mezi skupinami MA a S. Další možností, jak vysvětlit zvýšenou rychlost plavání samců v testu učení by mohla být zvýšená motorická aktivita vyvolaná samotnou aplikací drogy. Existují studie, které by tuto hypotézu podporovaly (Bisagno *et al.* 2003; Gentry *et al.* 2004). Před uplatněním této hypotézy na naše výsledky však musíme poznamenat, že zvířata byla denně testována nejdříve po 24 hodinách od předešlé aplikace MA (MA byl vždy v ten den injekčně aplikován na konci posledního pokusu plavání), takže akutní účinek drogy v tom čase už vymizel. Navíc výsledky, jak již zmiňujeme, ukazují, že zvýšená rychlost plavání byla jenom v testu učení a ne v probe testu a testu paměti, co tuto hypotézu nepodporuje.

Dalším zjištěním této práce bylo, že samice ze všech aplikačních period bez ohledu na prenatální, neonatální či akutní aplikaci v dospělosti dosahovaly horších výsledků v testu učení a paměti v porovnání se samci. Dosavadní studie z naší laboratoře (Macúchová *et al.* 2013; Macúchová *et al.* 2014) souhlasí se zjištěními této práce. Navíc výsledky ukázaly, že prenatální a neonatální expozice MA tyto mezipohlavní rozdíly ještě zvýraznila. Samice exponované MA dosahovaly horších výsledků v testu učení a paměti než samci po stejné expozici. Navíc tyto výsledky potvrdily i strategie použité při hledání ostrůvku. Samice exponované MA používaly během pokročilejších fází testu MWM strategii tigmotaxe a skenování mnohem častěji než samci. Existují tvrzení o působení pohlavních hormonů během gravidity a laktace na učení a vytváření paměťových stop u dospělých jedinců (Allen and Gorski 1991). Estradiol ovlivňuje procesy učení a vybavování si paměťové stopy, estrogen pak ovlivňuje verbální složku paměti (Caldwell and Watson 1952). Pohlavní hormony zasahují do aktivace neuronálních drah, které se postupně formují až do období dospělosti a tím ovlivňují různé psychofyziologické procesy jedinců. Experimentální studie potvrzují mezipohlavní rozdíly ve většině kognitivních testů (Caldwell and Watson 1952; Šlamberová *et al.* 2005b). Muži/samci vynikají ve schopnostech alocentrického učení, ženy/samice mají naopak posílenou složku verbálních schopností, snadnějšího a rychlejšího učení (Janik *et al.* 1975; Macúchová *et al.* 2013; Schutová *et al.* 2009). Z dosavadních studií je také známo, že existují významné mezipohlavní rozdíly ve všech úrovních intracelulární signalizace molekulárního mechanismu učení a paměti, od receptorů, přes druhé posly až po histonovou modifikaci (Keiser and Tronson 2016). Tyto rozdíly mezi pohlavími se projevují mj. ve strategiích prostorového mapování. Samci a samice používají jiné strategie, což vede k rozdílům v rychlosti a přesnosti řešení kognitivních úloh. Samci zpracovávají méně informací o prostoru a vytvoří si rychleji, ale i přesněji kognitivní mapu. Samice zpracovávají všechny dostupné informace o prostoru, dokonce, kvůli kolísání hladiny pohlavních hormonů během ovariálního cyklu neustále „přepínají“ z jedné strategické mapy na jinou. Proto jsou v kognitivních testech horší a pomalejší. Studie Jonasson (2005) zjistila, že

samice využívají mnohem častěji strategii tigmotaxe ve srovnání se samcemi. Naše výsledky souhlasí s výsledky zmiňované studie.

7.2 VLIV NEPŘÍMÉ A PŘÍMÉ EXPOZICE METAMFETAMINU V PRŮBĚHU NEONATÁLNÍHO OBDOBÍ

Abychom v naší studii mohli porovnat přenos účinku neonatálního MA na potomstvo ovlivněných matek nepřímo prostřednictvím mateřského mléka, zvolili jsme si další skupinu, kde jsme podávali neonatálně MA přímo subkutánním vpichem mláďatům. Proto dalším cílem této práce bylo porovnat míru vlivu neonatální expozice MA na chování dospělých zvířat exponovaných MA těmito dvěma způsoby, nepřímo (mateřským mlékem) a přímo (vpichem), během PD 1-11.

Výsledky CPP testu ukázaly, že zvířata exponovaná MA nepřímo prostřednictvím mateřského mléka vstupovala více do komor asociovaných s aplikací drogy a také strávila v těchto komorách více času než zvířata exponovaná MA přímo subkutánně. Toto zjištění může naznačovat, že zásadnější vliv na vytvoření drogové závislosti v dospělosti má expozice MA prostřednictvím mateřského mléka. Na druhou stranu snížená motorická aktivita a schopnost naučit se rozpoznat komůrku, asociovanou s aplikací drogy, může naznačovat deficity v kognitivních schopnostech zvířat exponovaných MA přímo aplikací drogy subkutánně. Toto zjištění zase podporuje zásadnější vliv neonatální přímé expozice MA subkutánně.

V dalším behaviorálním testu, v testu sociálních interakcí se vliv nepřímé a přímé expozice MA lišil v závislosti na typu sociálních interakcí. Zvířata exponovaná MA nepřímo prostřednictvím mateřského mléka strávila méně času genitálním očicháváním než zvířata exponovaná MA přímo subkutánně. Na druhou stranu se výraznější redukce času stráveného podlézáním a následováním projevila u zvířat, kterým byla droga aplikovaná přímo subkutánně v porovnání se skupinou zvířat exponovanou MA nepřímo prostřednictvím mateřského mléka. Co se týče vlivu neonatální nepřímé a přímé expozice MA na nesociální aktivity v testu SIT, výsledky ukázaly, že zásadnější vliv na vertikální motorickou aktivitu má přímá expozice MA subkutánně.

Na základě všech zjištění lze shrnout, že výraznější negativní dopad na SIT má neonatální přímá expozice MA subkutánně.

Výsledky Laboras testu neodhalily rozdíly v přenose účinku neonatální expozice MA prostřednictvím mateřského mléka a v neonatální expozici MA podávaného přímo subkutánně.

V testu Morrisova vodního bludiště výsledky ukázaly, že neonatální přímá expozice MA vedla v dospělosti k vytvoření deficitů v kognitivních funkcích potkanů ve větším rozsahu v porovnání s vlivem neonatální nepřímé expozice MA. Zvířata exponovaná MA přímo subkutánně dosahovala v testu učení delších vzdáleností, delších chyb hledání, potřebovala více času na nalezení skrytého ostrůvku a plavala pomaleji v porovnání s nepřímou expozicí MA prostřednictvím mateřského mléka. Navíc v testu paměti plavala pomaleji než skupina zvířat s neonatální nepřímou expozicí MA. Zhoršené výsledky v testu paměti ukázaly po analýze strategií prostorového mapování, že zvířata po přímé expozici MA subkutánně měly větší výskyt tigmotaxe na 12. den testu než zvířata exponovaná MA nepřímo prostřednictvím mateřského mléka.

Výsledky této studie ukázaly, že negativní vliv neonatální expozice MA během PD 1-11 nezávisí jenom na způsobu podání drogy, ale také na typu behaviorálního testu, pomocí kterého jsme testovali chování zvířat v dospělosti. V současné době neexistuje studie, která by pojednávala o účincích různě podané neonatální expozice MA na chování zvířat v dospělosti. Výsledky naší práce lze porovnat pouze s jednou studií z naší laboratoře. Ševčíková *et al.* (2017) 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. Domníváme se, že rozdíly mezi naší studií a studií Ševčíkové *et al.* (2017) jsou způsobeny testováním zvířat v různých stadiích postnatálního vývoje (PD 1-23 vs. PD 60-90). Předcházející studie ukázaly, že aplikace MA matkám během laktace vede k narušení mateřského chování, snižuje taktilní stimulaci, která sehrává významnou roli v pozitivním vývoji potomka (Šlamberová *et al.* 2005b). Zhoršené výsledky v testu negativní

geotaxe či vzpřimovacího reflexu pouze u skupiny mláďat exponovaných MA nepřímo prostřednictvím mateřského mléka naznačují ve studii Ševčíkové *et al.* (2017) důležitou roli mateřské péče o mládě. U skupiny intaktních matek, ve které byla injekčně exponována mláďata, výsledky ukázaly, že nedošlo ke změnám v mateřské péči a také, že neonatální přímá expozice MA mláďatům nevedla k deficitům v somatosenzorickém vývoji během prvních dní po porodu (Ševčíková *et al.* 2017). Tato zjištění podporují naší domněnku, 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 biodegradačnímu mechanismu v těle matky, jak je to při přenosu účinku prostřednictvím mateřského mléka. Poločas rozpadu MA u potkanů představuje přibližně 70 minut (Cho *et al.* 2001; Melega *et al.* 2007). 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 nevymizí. 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. Studie porovnávající vliv injekční aplikace drogy a drogy užité *per os* připisují výraznější účinek injekční aplikaci. Rambousek *et al.* (2014) ve své studii demonstruje přítomnost MA nejen v plazmě a mozku exponovaných matek, ale také v mateřském mléce, které bylo odebráno ze žaludku mláďat těchto matek. Přenos drogy prostřednictvím mateřského mléka potvrzuje také přítomností MA a jeho degradačnímu metabolitu, amfetaminu, v séru (0,1-1 ng/ml) a mozku (1-10 ng/g) odebraných z mláďat exponovaných MA v dávce 5 mg/ml/kg během PD 1-21. Do jaké míry se ale přenáší účinek MA z matky na mládě prostřednictvím

mateřského mléka, není zatím zcela objasněno. 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.

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

Podrobná analýza výsledků této studie, získaných z různých testů, sledujících vliv aplikace MA na chování potkanů v dospělosti, upozorňuje na fakt, jak významnou a kritickou může být prenatální či neonatální aplikace drogy během různých stadií vývoje mozku plodu. Existují studie, které ukazují, že amfetaminy ovlivňují zakončení neuronů, zasahují do maturace struktur mozku, které se postupně začínají vyvíjet od 14. -15. dne gestace u potkanů (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 gestace či laktace, kdy je vyvíjející se a dozrávající neurotransmiterový systém více senzitivní na účinek drogy. Della Grotta *et al.* (2010) ve své studii 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. Negativní účinky MA na vývoj potomstva závislých matek je už podrobně přezkoumán početnými klinickými a experimentálními studiemi. Doposud není ale zcela známo, které období gestace u lidí je tím nejkritičtějším, nejvíce senzitivním, pro negativní účinky této drogy? Proto 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 to, abychom závěry naší preklinické studie získané z testování laboratorního potkana mohli aplikovat na klinické studie, stanovili jsme aplikační periody expozice MA tak,

aby odpovídaly vývojovým obdobím CNS u lidí během prvního, druhého a třetí trimestru gravidity (Andersen 2003; Clancy *et al.* 2007; Rice and Barone 2000b).

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 deficity v chování než aplikace drogy během ED 1-11 u potkanů, což odpovídá prvnímu trimestru a první polovině druhého trimestru u lidí. Statistická analýza výsledků této studie ukázala, že zvířata exponovaná MA během PD 1-11 mnohem více aktivně vyhledávala komoru spojenou s aplikací drogy v testu CPP. Výsledky testu sociálního chování v testu SIT ukázaly, že zvířata exponovaná MA během ED 12-22 a PD 1-11 vyhledávala mnohem méně kontakt druhého zvířete. Redukce motorické aktivity byla zaznamenána v nejvyšší míře u zvířat exponovaných MA během PD 1-11, testovaných v SIT a testu Laboras. Nejvýraznější deficity v učení byly patrné u skupin zvířat exponovaných MA během PD 1-11. Nejvýznamnější dopad na schopnost zapamatovat si polohu skrytého ostrůvku v testu MWM měla expozice MA během ED 12-22.

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 (Kish *et al.* 2008; Rothman *et al.* 2001). Experimentální studie s použitím různých technik (antagonisty monoaminů, léze, mikrodialýza) 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 zpracovávání informací o prostoru, k prostorové

navigaci a vytvoření kognitivní mapy (Moser *et al.* 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 (Andersen 2003; Rice and Barone 2000b). 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 *et al.* 2016; Jablonski *et al.* 2015; Ricaurte *et al.* 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 (Davidson *et al.* 2001; Chang *et al.* 2009; Chang *et al.* 2004; Ricaurte *et al.* 1984; Seiden *et al.* 1993). Jak popisují jiné studie, účinek MA nezávisí jenom na dávce, způsobu podání či délky expozice, ale také na načasování aplikace během určitých kritických fází vývoje CNS. Výsledky naší studie všechny zmiňované tvrzení podporují. Na základě výsledků naší práce lze říci, 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.

8 ZÁVĚR

Z našich výsledků vyplývají následující závěry:

8.1 VLIV METAMFETAMINU NA BEHAVIORÁLNÍ TESTY

8.1.1 Test podmíněného vyhledávání drogy (CPP)

- Prenatální expozice MA během ED 1-11 a ED 12-22 neovlivnila vyhledávání drogy v dospělosti.
- Neonatální expozice MA během PD 1-11 neovlivnila vyhledávání drogy v dospělosti.
- Akutní aplikace MA v dospělosti vedla k vytvoření drogové závislosti.
- Samci strávili více času v komorách asociovaných s aplikací drogy než samice.

8.1.2 Test sociálních interakcí (SIT)

- Prenatální expozice MA během ED 1-11 a ED 12-22 vedla k redukci sociálního chování a motorické aktivity v dospělosti.
- Neonatální expozice MA během PD 1-11 snížila sociální chování a motorickou aktivitu v dospělosti.
- Akutní aplikace MA v dospělosti vedla ke snížení sociálních interakcí a ke zvýšené motorické aktivitě.
- Samice strávily více času sociálním chováním než samci. Samci strávili více času horizontální motorickou aktivitou než samice, zatímco samice strávily více času vertikální motorickou aktivitou než samci.
- Samice v P/E strávily více času sociálním chováním než samice v M/D.
- Samice byly citlivější na akutní podání MA ve fázi P/E.

8.1.3 Test Laboras

- Prenatální expozice MA během ED 1-11 vedla k redukci motorické aktivity v dospělosti, zatímco prenatální expozice MA během ED 12-22 neměla na motorickou aktivitu v dospělosti vliv.

- Neonatální expozice MA během PD 1-11 neměla vliv na motorickou aktivitu v dospělosti.
- Samice byly aktivnější než samci a akutní aplikace MA v dospělosti mezipohlavní rozdíly v motorické aktivitě zvýraznila.

8.1.4 Test Morrisova vodního bludiště (MWM)

- Prenatální expozice MA během ED 1-11 vedla k zhoršení výsledků testu učení a paměti v dospělosti, zatímco prenatální expozice MA během ED 12-22 neměla na učení a paměť v dospělosti vliv.
- Neonatální expozice MA během PD 1-11 bez ohledu na přímou/nepřímou expozici zhoršila výsledky testu učení v dospělosti.
- Neonatální expozice MA během PD 1-11 přímo s.c. vedla ke zhoršení výsledků testu paměti v dospělosti.
- Akutní aplikace MA v dospělosti neovlivnila test učení bez ohledu na prenatální/neonatální expozici, zatímco vedla ke zlepšení výsledků testu paměti u zvířat exponovaných během ED 12-22.
- Akutní aplikace MA v dospělosti zvýšila rychlost plavání u samců během fáze učení.
- Samice dosahovaly horších výsledků v testu učení a paměti než samci, navíc tyto mezipohlavní rozdíly byly výraznější po prenatální a neonatální expozici MA.

8.2 VLIV NEPŘÍMÉ A PŘÍMÉ EXPOZICE METAMFETAMINU V PRŮBĚHU NEONATÁLNÍHO OBDOBÍ

- Expozice MA nepřímo prostřednictvím mateřského mléka měla zásadnější vliv na aktivní vyhledávání drogy v dospělosti v testu CPP.
- Expozice MA přímo s.c. vedla k výraznější redukce sociálního chování a vertikální motorické aktivitě v dospělosti, testované v SIT.
- V testu Laboras nebyly nalezeny rozdíly v negativním dopadu na motorickou aktivitu mezi nepřímou a přímou expozicí MA.
- Expozice MA přímo s.c. měla zásadnější vliv na vytvoření kognitivních deficitů v testu MWM.

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

- Kritická vývojová perioda pro účinky MA na aktivní vyhledávání drogy v testu CPP je perioda neonatální expozice během PD 1-11.
- Kritické vývojové periody pro účinky MA na sociální chování v testu SIT jsou periody prenatální expozice během ED 12-22 a neonatální expozice během PD 1-11.
- Kritická vývojová perioda pro účinky MA na motorickou aktivitu v SIT a testu Laboras je perioda neonatální expozice během PD 1-11.
- Kritické vývojové periody pro účinky MA na kognitivní funkce v testu MWM 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 to, abychom závěry naší preklinické studie získané z testování laboratorního potkana mohli aplikovat na klinické studie, stanovili jsme aplikační periody expozice MA tak, aby odpovídaly vývojovým obdobím CNS u lidí během prvního, druhého a třetí trimestru gestace.

Tato studie testovala vliv prenatální a neonatální expozice MA na aktivní vyhledávání drog, na vzájemné chování dvou jedinců, na chování jedince v neznámém prostředí a na učení a paměť dospělých potomků ovlivněných matek. Zjistili jsme, že prenatální ani neonatální expozice MA během různým stadií neuro-ontogenetického vývoje potomků ovlivněných matek nemá vliv na vytvoření drogové závislosti u těchto zvířat v dospělosti. Dále jsme zjistili, že prenatální a neonatální expozice MA vedou k redukci sociálního a nesociálního chování. Rovněž bylo zjištěno, že prenatální a neonatální expozice MA vedou ke kognitivním deficitům exponovaných mláďat v dospělosti. Naše výsledky podporují tvrzení, že prenatální a neonatální expozice MA v dávce 5 mg/ml/kg může negativním způsobem zasahovat do vývoje mozku plodu laboratorního

potkana, kterých následky se projevují dlouhotrvajícími změnami v chování zvířat. Psychomotorický účinek MA v dávce 1 mg/ml/kg byl prokázán zvýšením motorické aktivity zvířat. Dále jsme zjistili, že akutní aplikace MA v dospělosti snižuje sociální kontakt dvou jedinců. Dalším zjištěním bylo, že samice jsou všeobecně aktivnější než samci a že akutní dávka MA mezipohlavní rozdíly v motorické aktivitě ještě zdůrazňuje. V naší studii jsme také prokázali vliv hladiny pohlavních hormonů na chování samic v závislosti na fázi ovariálního cyklu. Potvrdili jsme také, že samice dosahují horších výsledků v kognitivních testech.

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. 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.

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 jejích negativních následků na vyvíjející se potomstvo. Naše výsledky prohloubí dosavadní poznatky o účincích MA na vyvíjející se mozek během prenatálního a časně 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.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ACEVEDO SF, DE ESCH IJP and RABER J: Sex- and histamine-dependent long-term cognitive effects of methamphetamine exposure. *Neuropsychopharmacology* 32: 665-672, 2007.
2. ACUFF-SMITH K, GEORGE M, LORENS S and VORHEES C: Preliminary evidence for methamphetamine-induced behavioral and ocular effects in rat offspring following exposure during early organogenesis. *Psychopharmacology (Berl)* 109: 255-263, 1996.
3. ALLEN LS and GORSKI RA: Sexual dimorphism of the anterior commissure and massa intermedia of the human brain. *J Comp Neurol* 312: 97-104, 1991.
4. ANDERSEN SL: Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27: 3-18, 2003.
5. ANGLIN MD, BURKE C, PERROCHET B, STAMPER E and DAWUD-NOURSI S: History of the methamphetamine problem. *J Psychoactive Drugs* 32: 137-41, 2000.
6. ARAI T, JONES CR, RAPOPORT SI and WEISS SR: Evidence for membrane remodeling in ipsilateral thalamus and amygdala following left amygdala-kindled seizures in awake rats. *Brain Res* 743: 131-40, 1996.
7. BAEI F, RAJABZADEH A, BAGHERI J, JALAYERI Z and EBRAHIMZADEH-BIDESKAN A: Effect of methamphetamine exposure during pregnancy and lactation on polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression in rat's offspring hippocampus. *Metab Brain Dis* 32: 991-1002, 2017.
8. BARTU A, DUSCI LJ and ILETT KF: Transfer of methylamphetamine and amphetamine into breast milk following recreational use of methylamphetamine. *Br J Clin Pharmacol* 67: 455-9, 2009.
9. BECKER JB and HU M: Sex differences in drug abuse. *Front Neuroendocrinol* 29: 36-47, 2008.

10. BECKER JB, MOLENDA H and HUMMER DL: Gender differences in the behavioral responses to cocaine and amphetamine. Implications for mechanisms mediating gender differences in drug abuse. *Ann N Y Acad Sci* 937: 172-87, 2001.
11. BEHNKE M, SMITH VC, COMMITTEE ON SUBSTANCE A, COMMITTEE ON F and NEWBORN: Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus. *Pediatrics* 131: e1009-24, 2013.
12. BELCHER AM, FEINSTEIN EM, O'DELL SJ and MARSHALL JF: Methamphetamine influences on recognition memory: comparison of escalating and single-day dosing regimens. *Neuropsychopharmacology* 33: 1453-63, 2008.
13. BELIN D and EVERITT BJ: Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron* 57: 432-41, 2008.
14. BELL DS: The experimental reproduction of amphetamine psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 29: 35-40, 1973.
15. BERNÁŠKOVÁ K, TOMKOVÁ S and ŠLAMBEROVÁ R: Are changes in excitability in the hippocampus of adult male rats induced by prenatal methamphetamine exposure or stress? *Epilepsy Research* 137: 132-138, 2017.
16. BISAGNO V, FERGUSON D and LUINE VN: Chronic D-amphetamine induces sexually dimorphic effects on locomotion, recognition memory, and brain monoamines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 74: 859-867, 2003.
17. BOCKHORST KH, NARAYANA PA, LIU R, AHOBILA-VIJJULA P, RAMU J, KAMEL M, WOSIK J, BOCKHORST T, HAHN K, HASAN KM and PEREZ-POLO JR: Early postnatal development of rat brain: in vivo diffusion tensor imaging. *J Neurosci Res* 86: 1520-8, 2008.
18. BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ V, KAČER P, SYSLOVÁ K, RAMBOUSEK L, JANOVSKÝ M, SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L and

ŠLAMBEROVÁ R: Prenatal methamphetamine exposure affects the mesolimbic dopaminergic system and behavior in adult offspring. *Int J Dev Neurosci* 27: 525-30, 2009.

19. CALDWELL BM and WATSON RI: An evaluation of psychologic effects of sex hormone administration in aged women. I. Results of therapy after six months. *J Gerontol* 7: 228-44, 1952.
20. CAMPBELL LF and BEDI KS: The effects of undernutrition during early life on spatial learning. *Physiol Behav* 45: 883-90, 1989.
21. CARLSSON M and CARLSSON A: A regional study of sex differences in rat brain serotonin. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12: 53-61, 1988.
22. CASS WA and MANNING MW: GDNF protection against 6-OHDA-induced reductions in potassium-evoked overflow of striatal dopamine. *Journal of Neuroscience* 19: 1416-1423, 1999.
23. CASTNER SA, XIAO L and BECKER JB: Sex differences in striatal dopamine: in vivo microdialysis and behavioral studies. *Brain Res* 610: 127-34, 1993.
24. CLANCY B, FINLAY BL, DARLINGTON RB and ANAND KJ: Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 28: 931-7, 2007.
25. CLEMENS KJ, VAN NIEUWENHUYZEN PS, LI KM, CORNISH JL, HUNT GE and MCGREGOR IS: MDMA ("ecstasy"), methamphetamine and their combination: long-term changes in social interaction and neurochemistry in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 173: 318-25, 2004.
26. CRAWFORD CA, WILLIAMS MT, NEWMAN ER, MCDOUGALL SA and VORHEES CV: Methamphetamine exposure during the preweanling period causes prolonged changes in dorsal striatal protein kinase A activity, dopamine D2-like binding sites, and dopamine content. *Synapse* 48: 131-7, 2003.
27. CRUICKSHANK CC and DYER KR: A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction* 104: 1085-99, 2009.

28. CUI C, SAKATA-HAGA H, OHTA K, NISHIDA M, YASHIKI M, SAWADA K and FUKUI Y: Histological brain alterations following prenatal methamphetamine exposure in rats. *Congenit Anom (Kyoto)* 46: 180-7, 2006.

29. DALLEY JW, FRYER TD, BRICHARD L, ROBINSON ES, THEOBALD DE, LAANE K, PENA Y, MURPHY ER, SHAH Y, PROBST K, ABAKUMOVA I, AIGBIRHIO FI, RICHARDS HK, HONG Y, BARON JC, EVERITT BJ and ROBBINS TW: Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science* 315: 1267-70, 2007.

30. DARKE S, KAYE S, MCKETIN R and DUFLOU J: Major physical and psychological harms of methamphetamine use. *Drug Alcohol Rev* 27: 253-62, 2008.

31. DATTEL BJ: Substance abuse in pregnancy. *Semin Perinatol* 14: 179-87, 1990.

32. DAVIDSON C, GOW AJ, LEE TH and ELLINWOOD EH: Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Research Reviews* 36: 1-22, 2001.

33. DELLA GROTTA S, LAGASSE LL, ARRIA AM, DERAUF C, GRANT P, SMITH LM, SHAH R, HUESTIS M, LIU J and LESTER BM: Patterns of methamphetamine use during pregnancy: results from the Infant Development, Environment, and Lifestyle (IDEAL) Study. *Matern Child Health J* 14: 519-27, 2010.

34. DIAMOND A: Evidence for the importance of dopamine for prefrontal cortex functions early in life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351: 1483-93; discussion 1494, 1996.

35. DIXON SD and ORO A: Cocaine and Amphetamine Exposure in Neonates - Perinatal Consequences. *Pediatric Research* 21: A359-A359, 1987.

36. DOBBING J and SANDS J: Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* 48: 757-67, 1973.

37. DUDLEY CA, RAJENDREN G and MOSS RL: Induction of FOS immunoreactivity in central accessory olfactory structures of the female rat following exposure to conspecific males. *Mol Cell Neurosci* 3: 360-9, 1992.

38. EMCDDA EM and ADDICTION CFDAD (2009). Statistical bulletin 2009. Lisbon.

39. ERIKSSON M, LARSSON G, WINBLADH B and ZETTERSTROM R: The influence of amphetamine addiction on pregnancy and the newborn infant. *Acta Paediatr Scand* 67: 95-99, 1978.

40. ESTELLES J, RODRIGUEZ-ARIAS M, MALDONADO C, MANZANEDO C, AGUILAR MA and MINARRO J: Prenatal cocaine alters later responses to morphine in adult male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 1073-82, 2006.

41. FENTRESS J: Expressive contexts, fine structure, and central mediation of rodent grooming. *Ann N Y Acad Sci* 525: 18-26, 1988.

42. FILE SEAH, J.R.: Can social interaction be used to measure anxiety? . *Br J Pharmacol* 62: 19-24, 1978.

43. FISCHMAN MW and SCHUSTER CR: Tolerance development to chronic methamphetamine intoxication in the rhesus monkey. *Pharmacol Biochem Behav* 2: 503-8, 1974.

44. FOX WM: Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav* 13: 234-41, 1965.

45. FRAŇKOVÁ S: Drug-Induced Changes in Maternal-Behavior of Rats. *Psychopharmacology* 53: 83-87, 1977.

46. RYLANDER G: Stereotype behavior in man following amphetamine abuse: Amsterdam: In: Baker SB deC (ed) The correlation of Adverse Effects in Man with Observation in Animals. 1971.

47. GALLAGHER M, BURWELL R and BURCHINAL M: Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 107: 618-26, 1993.

48. GASPAR P, CASES O and MAROTEAUX L: The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neurosci* 4: 1002-12, 2003.

49. GEHRKE BJ, HARROD SB, CASS WA and BARDO MT: The effect of neurotoxic doses of methamphetamine on methamphetamine-conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 166: 249-57, 2003.

50. GENTRY WB, GHAFOOR AU, WESSINGER WD, LAURENZANA EM, HENDRICKSON HP and OWENS SM: (+)-Methamphetamine-induced spontaneous behavior in rats depends on route of (+)METH administration. *Pharmacol Biochem Behav* 79: 751-60, 2004.

51. GLATT SJ, BOLANOS CA, TRKSAK GH, CROWDER-DUPONT C and JACKSON D: Prenatal cocaine exposure alters behavioral and neurochemical sensitization to amphetamine in adult rats. *Neuropharmacology* 39: 599-610, 2000.

52. GLEASON ED, FUXJAGER MJ, OYEGBILE TO and MARLER CA: Testosterone release and social context: when it occurs and why. *Front Neuroendocrinol* 30: 460-9, 2009.

53. GOLDMAN-RAKIC PS: Cellular basis of working memory. *Neuron* 14: 477-85, 1995.

54. GOMES-DA-SILVA J, PEREZ-ROSADO A, DE MIGUEL R, FERNANDEZ-RUIZ J, SILVA MC and TAVARES MA: Neonatal methamphetamine in the rat: evidence for gender-specific differences upon tyrosine hydroxylase enzyme in the dopaminergic nigrostriatal system. *Ann N Y Acad Sci* 914: 431-8, 2000.

55. GOULDING MD, LUMSDEN A and GRUSS P: Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117: 1001-16, 1993.

56. GRAHAM DL, AMOS-KROOHS RM, BRAUN AA, GRACE CE, SCHAEFER TL, SKELTON MR, WILLIAMS MT and VORHEES CV: Neonatal +-methamphetamine exposure in rats alters adult locomotor responses to dopamine D1 and D2 agonists and to a glutamate NMDA

receptor antagonist, but not to serotonin agonists. *Int J Neuropsychopharmacol* 16: 377-91, 2013.

57. GREENOUGH WT, BLACK JE and WALLACE CS: Experience and brain development. *Child Dev* 58: 539-59, 1987.

58. GRILLY DM and LOVELAND A: What is a "low dose" of d-amphetamine for inducing behavioral effects in laboratory rats? *Psychopharmacology (Berl)* 153: 155-69, 2001.

59. GROBSTEIN C: In EnvironmentalInfluences on Genetic Expression. *Government Printing Office, Washington*: 1-3, 1970.

60. GYGI MP, GYGI SP, JOHNSON M, WILKINS DG, GIBB JW and HANSON GR: Mechanisms for tolerance to methamphetamine effects. *Neuropharmacology* 35: 751-7, 1996.

61. HANSEN RL, STRUTHERS JM and GOSPE SM: Visual-Evoked Potentials and Visual Processing in Stimulant Drug-Exposed Infants. *Developmental Medicine and Child Neurology* 35: 798-805, 1993.

62. HERLENIUS E and LAGERCRANTZ H: Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 190 Suppl 1: S8-21, 2004.

63. HEYSER CJ, MILLER JS, SPEAR NE and SPEAR LP: Prenatal exposure to cocaine disrupts cocaine-induced conditioned place preference in rats. *Neurotoxicol Teratol* 14: 57-64, 1992.

64. HOMER BD, SOLOMON TM, MOELLER RW, MASCIA A, DERALEAU L and HALKITIS PN: Methamphetamine abuse and impairment of social functioning: a review of the underlying neurophysiological causes and behavioral implications. *Psychol Bull* 134: 301-10, 2008.

65. HOYER D, HANNON JP and MARTIN GR: Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 533-54, 2002.

66. HRUBÁ L, SCHUTOVÁ B, POMETLOVÁ M, ROKYTA R and ŠLAMBEROVÁ R: Effect of methamphetamine exposure and cross-

fostering on cognitive function in adult male rats. *Behav Brain Res* 208: 63-71, 2010.

67. HRUBÁ L, SCHUTOVÁ B and ŠLAMBEROVÁ R: Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following prenatal and postnatal methamphetamine exposure in adult rats. *Physiol Behav* 105: 364-70, 2012.

68. HRUBÁ L, SCHUTOVÁ B, ŠLAMBEROVÁ R and POMETLOVÁ M: Does cross-fostering modify the impairing effect of methamphetamine on postnatal development of rat pups? *Prague Med Rep* 109: 50-61, 2008.

69. HUBSCHER CH, BROOKS DL and JOHNSON JR: A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem* 80: 79-87, 2005.

70. CHANG L, CLOAK C, JIANG CS, FARNHAM S, TOKESHI B, BUCHTHAL S, HEDEMARK B, SMITH LM and ERNST T: Altered neurometabolites and motor integration in children exposed to methamphetamine in utero. *Neuroimage* 48: 391-7, 2009.

71. CHANG L, SMITH LM, LOPRESTI C, YONEKURA ML, KUO J, WALOT I and ERNST T: Smaller subcortical volumes and cognitive deficits in children with prenatal methamphetamine exposure. *Psychiatry Research-Neuroimaging* 132: 95-106, 2004.

72. CHO AK, MELEGA WP, KUCZENSKI R and SEGAL DS: Relevance of pharmacokinetic parameters in animal models of methamphetamine abuse. *Synapse* 39: 161-6, 2001.

73. CHO D, LYU H, LEE H, KIM P and CHIN K: Behavioral teratogenity of methamphetamine. *J Toxicol Sci* 16: 37-49, 1991.

74. CHOMCHAI C, CHOMCHAI S and KITSOMMART R: Transfer of Methamphetamine (MA) into Breast Milk and Urine of Postpartum Women who Smoked MA Tablets during Pregnancy: Implications for Initiation of Breastfeeding. *J Hum Lact* 32: 333-9, 2016.

75. IARIA G, PETRIDES M, DAGHER A, PIKE B and BOHBOT VD: Cognitive strategies dependent on the hippocampus and caudate

nucleus in human navigation: variability and change with practice. *J Neurosci* 23: 5945-52, 2003.

76. ILETT KF, HACKETT LP, KRISTENSEN JH and KOHAN R: Transfer of dexamphetamine into breast milk during treatment for attention deficit hyperactivity disorder. *Br J Clin Pharmacol* 63: 371-5, 2007.

77. IVERSEN L, GIBBONS S, TREBLE R, SETOLA V, HUANG X and ROTH B: Neurochemical Profiles of some novel psychoactive substances. *Eur J Pharmacol.* 700: 147–151, 2013.

78. JABLONSKI SA, GRAHAM DL, VORHEES CV and WILLIAMS MT: Effects of Neonatal Methamphetamine and Stress on Brain Monoamines and Corticosterone in Preweanling Rats. *Neurotox Res* 31: 269-282, 2016.

79. JABLONSKI SA, WILLIAMS MT and VORHEES CV: Neurobehavioral Effects from Developmental Methamphetamine Exposure. *Curr Top Behav Neurosci*, 2015.

80. JANIK P, BRIAND P and HARTMANN NR: The effect of estrone-progesterone treatment on cell proliferation kinetics of hormone-dependent GR mouse mammary tumors. *Cancer Res* 35: 3698-704, 1975.

81. JANUS C: Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learn Mem* 11: 337-46, 2004.

82. JONASSON Z: Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 811-25, 2005.

83. KANDEL ER, KLEIN M, CASTELLUCCI VF, SCHACHER S and GOELET P: Some principles emerging from the study of short- and long-term memory. *Neurosci Res* 3: 498-520, 1986.

84. KATO R and YAMAZOE Y: Sex-Specific Cytochrome P450 as a Cause of Sex-Related and Species-Related Differences in Drug Toxicity. *Toxicology Letters* 64-5: 661-667, 1992.

85. KEISER AA and TRONSON NC: Molecular mechanism of Memory in Males and Females. *Sex Differences in the Central Nervous System*: 27-44, 2016.

86. KELLY PH, SEVIOUR PW and IVERSEN SD: Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res* 94: 507-22, 1975.

87. KING JA: *Psychol Bull* 55: 46-54, 1958.

88. KINGSBURY MA, GLEASON ED, OPHIR AG, PHELPS SM, YOUNG LJ and MARLER CA: Monogamous and promiscuous rodent species exhibit discrete variation in the size of the medial prefrontal cortex. *Brain Behav Evol* 80: 4-14, 2012.

89. KIRKPATRICK MG, GUNDERSON EW, PEREZ AY, HANEY M, FOLTIN RW and HART CL: A direct comparison of the behavioral and physiological effects of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 219: 109-22, 2012.

90. KISH SJ, TONG J, HORNYKIEWICZ O, RAJPUT A, CHANG LJ, GUTTMAN M and FURUKAWA Y: Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain* 131: 120-31, 2008.

91. KITA T, WAGNER GC and NAKASHIMA T: Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption. *J Pharmacol Sci* 92: 178-95, 2003.

92. KONKOL RJ: Is There a Cocaine Baby Syndrome. *Journal of Child Neurology* 9: 225-226, 1994.

93. KONKOL RJ, MURPHEY LJ, FERRIERO DM, DEMPSEY DA and OLSEN GD: Cocaine Metabolites in the Neonate - Potential for Toxicity. *Journal of Child Neurology* 9: 242-248, 1994.

94. KŘEČEK J: In: Advances in Biological Sciences. *Publishing House of the Czechoslovak Academy of Science, Praha*: 198-214, 1962.

95. KŘEČEK J: Kritické vývojové periody, vývojová fyziologie a preventivní lékařství.. *Čas. Lék. čes.* 106: 3-11, 1967.

96. KŘEČEK J: The Biopsychology of Development. *Academic Press, New Yourk, London*: 233-248, 1971.

97. KŘEČEK J: O kritických vývojových periodách. *Čs. fysiol.* 22: 505-520, 1973.

98. KUČEROVÁ-RUDÁ J, AMCHOVÁ P, BABINSKÁ Z, DUŠEK L, MICALE V, ŠULCOVÁ A: Sex differences in the reinstatement of methamphetamine seeking after forced abstinence in Sprague-Dawley rats. *front Psychiatry* 6: Num. 91, 2015.

99. KUČEROVÁ J, VRŠKOVÁ D, ŠULCOVÁ A: Impact of repeated methamphetamine pretreatment on intravenous self-administration of the drug in males and estrogenized or non-estrogenized ovariectomized female rats. *Neuro Endocrinol Left* 30(5**)**:663-70, 2009.

100. LE DOUARIN NM: Plasticity in the development of the peripheral nervous system. *Ciba Found Symp* **83**: 19-50, 1981.

101. LUBBERS ME, VAN DEN BOS R and SPRUIJT BM: Mu opioid receptor knockout mice in the Morris Water Maze: a learning or motivation deficit? *Behav Brain Res* 180: 107-11, 2007.

102. MACÚCHOVÁ E, NOHEJLOVÁ-DEYKUN K and ŠLAMBEROVÁ R: Effect of methamphetamine on cognitive functions of adult female rats prenatally exposed to the same drug. *Physiol Res* 62 Suppl 1: S89-98, 2013.

103. MACÚCHOVÁ E, NOHEJLOVÁ K, ŠEVČÍKOVÁ M, HREBÍČKOVÁ I and 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.

104. MACÚCHOVÁ E, NOHEJLOVÁ K and ŠLAMBEROVÁ R: Gender differences in the effect of adult amphetamine on cognitive functions of rats prenatally exposed to methamphetamine. *Behav Brain Res* 270: 8-17, 2014.

105. MALINOVÁ-ŠEVČÍKOVÁ M, HREBÍČKOVÁ I, MACÚCHOVÁ E, NOVÁ E, POMETLOVÁ M and ŠLAMBEROVÁ R: Differences in maternal behavior and development of their pups depend on

the time of methamphetamine exposure during gestation period. *Physiol Res* 63 Suppl 4: S559-72, 2014.

106. MARCONDES FK, BIANCHI FJ and TANNO AP: Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62: 609-14, 2002.

107. MARGOLIS EB, LOCK H, HJELMSTAD GO and FIELDS HL: The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol* 577: 907-24, 2006.

108. MARTIN JC, MARTIN DC, RADOW B and SIGMAN G: Growth, development and activity in rat offspring following maternal drug exposure. *Exp Aging Res* 2: 235-51, 1976.

109. MARWICK C: NIDA seeking data on effect of fetal exposure to methamphetamine. *JAMA* 283: 2225-6, 2000.

110. MAXWELL JC: Emerging research on methamphetamine. *Curr Opin Psychiatry* 18: 235-42, 2005.

111. MCDONNELL-DOWLING K, DONLON M and KELLY JP: Methamphetamine exposure during pregnancy at pharmacological doses produces neurodevelopmental and behavioural effects in rat offspring. *Int J Dev Neurosci.* 35: 42-51, 2014.

112. MELEGA WP, CHO AK, HARVEY D and LACAN G: Methamphetamine blood concentrations in human abusers: application to pharmacokinetic modeling. *Synapse* 61: 216-20, 2007.

113. MEREDITH CW, JAFFE C, ANG-LEE K and SAXON AJ: Implications of chronic methamphetamine use: a literature review. *Harv Rev Psychiatry.* 13: 141-154, 2005.

114. MICZEK KA and TIDEY JW: Amphetamines: aggressive and social behavior. *NIDA Res Monogr* 94: 68-100, 1989.

115. MILESI-HALLE A, HENDRICKSON HP, LAURENZANA EM, GENTRY WB and OWENS SM: Sex- and dose-dependency in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of (+)-methamphetamine and its metabolite (+)-amphetamine in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 209: 203-13, 2005.

116. MORRIS R: Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47-60, 1984.

117. MOSER EI, KROPFF E and MOSER MB: Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu Rev Neurosci* 31: 69-89, 2008.

118. MRAVČÍK V, VOREL F and ZÁBRANSKÝ T: Drugs and fatal traffic accidents in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health* 15: 158-62, 2007.

119. MUELLER D and STEWART J: Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res* 115: 39-47, 2000.

120. NICHOLLS JG, MARTIN AR, WALLACE BG and FUCHS PA: Od neuronu k mozku. 675 s., 2013.

121. NOCJAR C and PANKSEPP J: Chronic intermittent amphetamine pretreatment enhances future appetitive behavior for drug- and natural-reward: interaction with environmental variables. *Behav Brain Res* 128: 189-203, 2002.

122. NORDAHL TE, SALO R and LEAMON M: Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: a review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15: 317-25, 2003.

123. OEI J, ABDEL-LATIF ME, CLARK R, CRAIG F and LUI K: Short-term outcomes of mothers and infants exposed to antenatal amphetamines. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 95: F36-41, 2010.

124. OLSON L and SEIGER A: Early prenatal ontogeny of central monoamine neurons in the rat: fluorescence histochemical observations. *Z Anat Entwicklungsgesch* 137: 301-16, 1972.

125. ORO AS and DIXON SD: Perinatal Cocaine and Methamphetamine Exposure - Maternal and Neonatal Correlates. *Journal of Pediatrics* 111: 571-578, 1987.

126. PAK TR, CHUNG WC, HINDS LR and HANDA RJ: Estrogen receptor-beta mediates dihydrotestosterone-induced stimulation of the

arginine vasopressin promoter in neuronal cells. *Endocrinology* 148: 3371-82, 2007.

127. PÁLENÍČEK T, BALÍKOVÁ M, ROHANOVÁ M, NOVÁK T, HORÁČEK J, FUJÁKOVÁ M, HöSCHL C: Behavioral, hyperthermic nad pharmacokinetic profil of *para*-methoxymethamphetamine (PNMA) in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 98:130-139, 2011.

128. PATISAUL HB, SCORDALAKES EM, YOUNG LJ and RISSMAN EF: Oxytocin, but not oxytocin receptor, is rRegulated by oestrogen receptor beta in the female mouse hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 15: 787-93, 2003.

129. PLESSINGER MA: Prenatal exposure to amphetamines - Risks and adverse outcomes in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 25: 119-+, 1998.

130. RAKIC P and NOWAKOWSKI RS: The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 196: 99-128, 1981.

131. RAMBOUSEK L, KAČER P, SYSLOVÁ K, BUMBA J, BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ V and ŠLAMBEROVÁ R: Sex differences in methamphetamine pharmacokinetics in adult rats and its transfer to pups through the placental membrane and breast milk. *Drug and Alcohol Dependence* 139: 138-144, 2014.

132. RICAURTE GA, SEIDEN LS and SCHUSTER CR: Further Evidence That Amphetamines Produce Long-Lasting Dopamine Neurochemical Deficits by Destroying Dopamine Nerve-Fibers. *Brain Research* 303: 359-364, 1984.

133. RICE D and BARONE S, JR.: Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3: 511-33, 2000a.

134. RICE D and BARONE S, JR.: Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108: 511-33, 2000b.

135. RIDDLE EL, FLECKENSTEIN AE and HANSON GR: Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *AAPS J* 8: E413-8, 2006.

136. ROBINSON TE and BECKER JB: 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, 1986.

137. ROBINSON TE and KOLB B: Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47: 33-46, 2004.

138. ROCHA BA, MEAD AN and KOSOFSKY BE: Increased vulnerability to self-administer cocaine in mice prenatally exposed to cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 163: 221-9, 2002.

139. ROTH ME and CARROLL ME: Sex differences in the acquisition of IV methamphetamine self-administration and subsequent maintenance under a progressive ratio schedule in rats. *Psychopharmacology* 172: 443-449, 2004.

140. ROTHMAN RB, BAUMANN MH, DERSCH CM, ROMERO DV, RICE KC, CARROLL FI and PARTILLA JS: Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* 39: 32-41, 2001.

141. SADLER TW: Langmanova lékařská embryologie. 432, 2011.

142. SANCHEZ CJ, BAILIE TM, WU WR, LI N and SORG BA: Manipulation of dopamine d1-like receptor activation in the rat medial prefrontal cortex alters stress- and cocaine-induced reinstatement of conditioned place preference behavior. *Neuroscience* 119: 497-505, 2003.

143. SATO M and FUJIWARA Y: Behavioral and neurochemical changes in pups prenatally exposed to methamphetamine. *Brain Dev* 8: 390-6, 1986.

144. SCOTT JP: *Science* 138: 949-951, 1962.

145. SEIDEN LS, WOOLVERTON WL, LORENS SA, WILLIAMS JE, CORWIN RL, HATA N and OLIMSKI M: 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, 1993.

146. SEKINE Y, OUCHI Y, TAKEI N, YOSHIKAWA E, NAKAMURA K, FUTATSUBASHI M, OKADA H, MINABE Y, SUZUKI K, IWATA Y, TSUCHIYA KJ, TSUKADA H, IYO M and MORI N: Brain serotonin transporter density and aggression in abstinent methamphetamine abusers. *Arch Gen Psychiatry* 63**:** 90-100, 2006.

147. SEMPLE BD, BLOMGREN K, GIMLIN K, FERRIERO DM and NOBLE-HAEUSSLEIN LJ: Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 106-107: 1-16, 2013.

148. SHANSKY RM and WOOLLEY CS: Considering Sex as a Biological Variable Will Be Valuable for Neuroscience Research. *J Neurosci* 36: 11817-11822, 2016.

149. SHIMOSATO K and OHKUMA S: Simultaneous monitoring of conditioned place preference and locomotor sensitization following repeated administration of cocaine and methamphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* **66:** 285-92, 2000.

150. SHOBLOCK JR, SULLIVAN EB, MAISONNEUVE IM and GLICK SD: Neurochemical and behavioral differences between d-methamphetamine and d-amphetamine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 165: 359-69, 2003.

151. SCHAEFER TL, SKELTON MR, HERRING NR, GUDELSKY GA, VORHEES CV and WILLIAMS MT: Short- and long-term effects of (+)-methamphetamine and (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine on monoamine and corticosterone levels in the neonatal rat following multiple days of treatment. *J Neurochem.* 104: 1674-85, 2008.

152. SCHANBERG SM and FIELD TM: Sensory deprivation stress and supplemental stimulation in the rat pup and preterm human neonate. *Child Dev* 58: 1431-47, 1987.

153. SCHINDLER CW, BROSS JG and THORNDIKE EB: Gender differences in the behavioral effects of methamphetamine. *Eur J Pharmacol* 442: 231-5, 2002.

154. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, POMETLOVÁ M, DEYKUN K and ŠLAMBEROVÁ R: Impact of methamphetamine administered prenatally and in adulthood on cognitive functions of male rats tested in Morris water maze. *Prague Med Rep* 109: 62-70, 2008.

155. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, POMETLOVÁ M, ROKYTA R and ŠLAMBEROVÁ R: Responsiveness to methamphetamine in adulthood is altered by prenatal exposure in rats. *Physiol Behav* 99: 381-7, 2010.

156. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, POMETLOVÁ M and ŠLAMBEROVÁ R: Impact of prenatal and acute methamphetamine exposure on behaviour of adult male rats. *Prague Med Rep* 110: 67-78, 2009.

157. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, ROKYTA R and ŠLAMBEROVÁ R: Gender differences in behavioral changes elicited by prenatal methamphetamine exposure and application of the same drug in adulthood. *Dev Psychobiol* 55: 232-42, 2013.

158. SIMOES PF, SILVA AP, PEREIRA FC, MARQUES E, GRADE S, MILHAZES N, BORGES F, RIBEIRO CF and MACEDO TR: Methamphetamine induces alterations on hippocampal NMDA and AMPA receptor subunit levels and impairs spatial working memory. *Neuroscience* 150: 433-41, 2007.

159. SIMPSON J, RYAN C, CURLEY A, MULCAIRE J and KELLY JP: Sex differences in baseline and drug-induced behavioural responses in classical behavioural tests. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 37: 227-36, 2012.

160. SMITH LM, CHANG L, YONEKURA ML, GROB C, OSBORN D and ERNST T: Brain proton magnetic resonance spectroscopy in children exposed to methamphetamine in utero. *Neurology* 57: 255-60, 2001.

161. SOKOLOV BP, SCHINDLER CW and CADET JL: Chronic methamphetamine increases fighting in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 319-26, 2004.

162. STACK A, CARRIER N, DIETZ D, HOLLIS F, SORENSON J and KABBAJ M: Sex differences in social interaction in rats: role of the immediate-early gene zif268. *Neuropsychopharmacology* 35: 570-80, 2010.

163. STEINER E, VILLEN T, HALLBERG M and RANE A: Amphetamine secretion in breast milk. *Eur J Clin Pharmacol* 27: 123-4, 1984.

164. STOCKARD CR: *Amer. J. Anat.* 28: 115-266, 1920-1921.

165. STUCHLÍK A: Prostor a prostorová orientace. *Československá fyziologie* 52: 22-33, 2003.

166. SULZER D, SONDERS MS, POULSEN NW and GALLI A: Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol* 75: 406-33, 2005.

167. SUNDSTROM E, KOLARE S, SOUVERBIE F, SAMUELSSON EB, PSCHERA H, LUNELL NO and SEIGER A: Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Res Dev Brain Res* 75: 1-12, 1993.

168. ŠEVČÍKOVÁ M, HREBÍČKOVÁ I, MACÚCHOVÁ E and ŠLAMBEROVÁ R: The influence of methamphetamine on maternal behavior and development of the pups during the neonatal period. *Int J Dev Neurosci* 59: 37-46, 2017.

169. ŠLAMBEROVÁ R, BERNÁŠKOVÁ K, MATĚJOVSKÁ I and SCHUTOVÁ B: Does prenatal methamphetamine exposure affect seizure susceptibility in adult rats with acute administration of the same drug? *Epilepsy Research* 78: 33-39, 2008.

170. ŠLAMBEROVÁ R and CHAROUSOVÁ P: Metamfetamin - droga těhotných závislých žen. *Československá fyziologie* 57: 15-23, 2008.

171. ŠLAMBEROVÁ R, CHAROUSOVÁ P and POMETLOVÁ M: Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during

pre-mating, gestation and lactation. *Reproductive Toxicology* 20: 103-110, 2005a.

172. ŠLAMBEROVÁ R, CHAROUSOVÁ P and POMETLOVÁ M: Methamphetamine administration during gestation impairs maternal behavior. *Dev Psychobiol* 46: 57-65, 2005b.

173. ŠLAMBEROVÁ R, MACÚCHOVÁ E, NOHEJLOVÁ-DEYKUN K, SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L and ROKYTA R: Gender differences in the effect of prenatal methamphetamine exposure and challenge dose of other drugs on behavior of adult rats. *Physiol Res* 62 Suppl 1: S99-S108, 2013.

174. ŠLAMBEROVÁ R, MIKULECKÁ A, MACÚCHOVÁ E, HREBÍČKOVÁ I, ŠEVČÍKOVÁ M, NOHEJLOVÁ K and POMETLOVÁ M: Effects of psychostimulants on social interaction in adult male rats. *Behav Pharmacol* 26: 776-85, 2015.

175. ŠLAMBEROVÁ R, MIKULECKÁ A, POMETLOVÁ M, SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L and DEYKUN K: The effect of methamphetamine on social interaction of adult male rats. *Behav Brain Res* 214: 423-7, 2010.

176. ŠLAMBEROVÁ R, MIKULECKÁ A, POMETLOVÁ M, SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L and DEYKUN K: Sex differences in social interaction of methamphetamine-treated rats. *Behav Pharmacol* 22: 617-23, 2011a.

177. ŠLAMBEROVÁ R, POMETLOVÁ M and CHAROUSOVÁ P: Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 82-8, 2006.

178. ŠLAMBEROVÁ R, POMETLOVÁ M, SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, MACÚCHOVÁ E, NOVÁ E and ROKYTA R: Do prenatally methamphetamine-exposed adult male rats display general predisposition to drug abuse in the conditioned place preference test? *Physiol Res* 61 Suppl 2: S129-38, 2012.

179. ŠLAMBEROVÁ R, RILEY MA and VATHY I: Cross-generational effect of prenatal morphine exposure on neurobehavioral development of rat pups. *Physiol Res* 54: 655-60, 2005c.

180. ŠLAMBEROVÁ R, SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L and POMETLOVÁ M: Does prenatal methamphetamine exposure affect the drug-seeking behavior of adult male rats? *Behav Brain Res* 224: 80-86, 2011b.

181. ŠLAMBEROVÁ R, VRAJOVÁ M, SCHUTOVÁ B, MERTLOVÁ M, MACÚCHOVÁ E, NOHEJLOVÁ K, HRUBÁ L, PUSKARČÍKOVÁ J, BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ V and YAMAMOTOVÁ A: Prenatal Methamphetamine Exposure Induces Long-Lasting Alterations in Memory and Development of NMDA Receptors in the Hippocampus. *Physsiol. Res.* 63: S547-S558, 2014.

182. TAU GZ and PETERSON BS: Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology* 35: 147-68, 2010.

183. THOMPSON BL, LEVITT P and STANWOOD GD: Prenatal exposure to drugs: effects on brain development and implications for policy and education. *Nat Rev Neurosci* 10: 303-12, 2009.

184. TRONICK EZ and BEEGHLY M: Prenatal cocaine exposure, child development, and the compromising effects of cumulative risk. *Clinics in Perinatology* 26: 151-+, 1999.

185. UNODC (2008). World drug report. Vienna.

186. VAVŘÍNKOVÁ B, BINDER T and ŽIVNÝ J: Characteristics of a population of drug dependent pregnant women in the Czech Republic. *Česká gynekologie* 66: 285-291, 2001.

187. VEARRIER D, GREENBERG MI, MILLER SN, OKANEKU JT and HAGGERTY DA: Methamphetamine: history, pathophysiology, adverse health effects, current trends, and hazards associated with the clandestine manufacture of methamphetamine. *Dis Mon* 58: 38-89, 2012.

188. VOLKOW ND, WANG GJ, FOWLER JS and THANOS P: Role of dopamine in drug abuse and addiction in human subjects: results from imaging studies. *Molecular Psychiatry* 6: S3-S4, 2001.

189. VORHEES CV: Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem Toxicol* 20: 387-99, 1997.

190. VORHEES CV, AHRENS KG, ACUFF-SMITH KD, SCHILLING MA and FISHER JE: Methamphetamine exposure during early postnatal development in rats: I. Acoustic startle augmentation and spatial learning deficits. *Psychopharmacology (Berl)* 114: 392-401, 1994a.

191. VORHEES CV, AHRENS KG, ACUFF-SMITH KD, SCHILLING MA and FISHER JE: Methamphetamine exposure during early postnatal development in rats: II. Hypoactivity and altered responses to pharmacological challenge. *Psychopharmacology (Berl)* 114: 402-8, 1994b.

192. VORHEES CV and PU C: Ontogeny of methamphetamine-induced neurotoxicity in the rat model. *NIDA Res Monogr* 158: 149-71, 1995.

193. VORHEES CV, REED TM, MORFORD LL, FUKUMURA M, WOOD SL, BROWN CA, SKELTON MR, MCCREA AE, ROCK SL and WILLIAMS MT: Periadolescent rats (P41-50) exhibit increased susceptibility to D-methamphetamine-induced long-term spatial and sequential learning deficits compared to juvenile (P21-30 or P31-40) or adult rats (P51-60). *Neurotoxicol Teratol* 27: 117-34, 2005.

194. VORHEES CV, REED TM, SKELTON MR and WILLIAMS MT: Exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on postnatal days 11-20 induces reference but not working memory deficits in the Morris water maze in rats: implications of prior learning. *Int J Dev Neurosci* 22: 247-59, 2004.

195. VORHEES CV, SKELTON MR, GRACE CE, SCHAEFER TL, GRAHAM DL, BRAUN AA and WILLIAMS MT: Effects of (+)-methamphetamine on path integration and spatial learning, but not locomotor activity or acoustic startle, align with the stress hyporesponsive period in rats. *Int J Dev Neurosci* 27: 289-98, 2009.

196. WAGNER GC, RICAURTE GA, SEIDEN LS, SCHUSTER CR, MILLER RJ and WESTLEY J: Long-Lasting Depletions of Striatal

Dopamine and Loss of Dopamine Uptake Sites Following Repeated Administration of Methamphetamine. *Brain Research* 181: 151-160, 1980.

197. WEISSMAN AD and CALDECOTT-HAZARD S: Developmental neurotoxicity to methamphetamines. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22: 372-4, 1995.

198. WHITAKER-AZMITIA PM: Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 553-61, 1991.

199. WHITE S, LAURENZANA E, HENDRICKSON H, GENTRY WB and OWENS SM: Gestation time-dependent pharmacokinetics of intravenous (+)-methamphetamine in rats. *Drug Metab Dispos* 39: 1718-26, 2011.

200. WHITE SJ, LAURENZANA EM, GENTRY WB, HENDRICKSON HP, WILLIAMS DK, WARD KW and OWENS SM: Vulnerability to (+)-methamphetamine effects and the relationship to drug disposition in pregnant rats during chronic infusion. *Toxicol Sci* 111: 27-36, 2009.

201. WHITE TL, JUSTICE AJH and DE WIT H: Differential subjective effects of D-amphetamine by gender, hormone levels and menstrual cycle phase. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 73: 729-741, 2002.

202. WILCOX RA, ROBINSON TE and BECKER JB: 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, 1986.

203. WILLIAMS MT, BLANKENMEYER TL, SCHAEFER TL, BROWN CA, GUDELSKY GA and VORHEES CV: 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, 2003a.

204. WILLIAMS MT, MORAN MS and VORHEES CV: Refining the critical period for methamphetamine-induced spatial deficits in the Morris water maze. *Psychopharmacology (Berl)* 168: 329-38, 2003b.

205. WILLIAMS MT, MORAN MS and VORHEES CV: Behavioral and growth effects induced by low dose methamphetamine administration during the neonatal period in rats. *Int J Dev Neurosci* 22: 273-83, 2004.

206. WILLIAMS MT, MORFORD LL, WOOD SL, WALLACE TL, FUKUMURA M, BROENING HW and VORHEES CV: 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, 2003c.

207. WORKMAN AD, CHARVET CJ, CLANCY B, DARLINGTON RB and FINLAY BL: Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci* 33: 7368-83, 2013.

208. WOULDES TA, ROBERTS AB, PRYOR JE, BAGNALL C and GUNN TR: The effect of methadone treatment on the quantity and quality of human fetal movement. *Neurotoxicology and Teratology* 26: 23-34, 2004.

209. YAMAMOTOVÁ A, HRUBÁ L, SCHUTOVÁ B, ROKYTA R and ŠLAMBEROVÁ R: Perinatal effect of methamphetamine on nociception in adult Wistar rats. *Int J Dev Neurosci* 29: 85-92, 2011.

210. YU Q, LARSON DF and WATSON RR: Heart disease, methamphetamine and AIDS. *Life Sci* 73: 129-40, 2003.

211. ZHENG D and PURVES D: Effects of increased neural activity on brain growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1802-6, 1995.

Internetové zdroje

https://www.unodc.org/wdr2017/field/Booklet_4_ATSNPS.pdf

10 PUBLIKACE A PREZENTACE AUTORA

10.1 PUBLIKACE IN EXTENSO

1. **Hrebíčková 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., **Hrebíčková 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. Šlamberová R., Mikulecká A., Macúchová E., **Hrebíčková I.**, Ševčíková M., Nohejlová K., Pometlová M.: Effects of psychostimulants on social interaction of adult male rats. Behav Pharmacol, 2015, IF 2,218.
4. **Hrebíčková 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**.
5. Macúchová E., Ševčíková M., **Hrebíčková 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**.
6. **Hrebíčková 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**.
7. Ševčíková M., **Hrebíčková 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. Macúchová E., Nohejlová K., Ševčíková M., **Hrebíčková 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**.
9. Holubová A., Ševčíková M., Macúchová E., **Hrebíčková 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**.

10.2 PREZENTACE A ABSTRAKTA

1. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Sex-specific effect of prenatal and adult methamphetamine exposure on rat behavior tested in Laboras. FENS Featured Regional Meeting, 11. -14.9. 2013, Praha.
2. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Sex dimorphic effect of adult methamphetamine exposure on behavior of adult rats exposed to the same drug throughout the first half of their prenatal period. Neuroscience, 9. -13.11. 2013, San Diego, USA.
3. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Závisí účinok metamfetamínu na učenie a pamäť od doby aplikácie počas prenatálneho obdobia vývoja potkana? Výjezdní zasedání PRVOUK P34, 21. -22.11. 2013, Poděbrady.
4. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Závisí účinok metamfetamínu na učenie a pamäť od doby aplikácie počas prenatálneho obdobia vývoja potkana? 23. Neuroontogenetický diskusní den, 10.12.2013, Praha.
5. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Účinok chronickej aplikácie metamfetamínu na kognitívne funkcie potkana laboratórneho v závislosti od prenatálnej expozície tou istou drogou. 56. Česko-slovenská psychofarmakologická konference, 8. -12.1.2014, Lázně Jeseník.

6. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Účinok chronickej aplikácie metamfetamínu na kognitívne funkcie potkana laboratórneho v závislosti od prenatálnej expozície tou istou drogou. 90. Fyziologické dny, 4. -6.2.2014, Bratislava, Slovensko.
7. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Účinok chronickej aplikácie metamfetamínu na kognitívne funkcie potkana laboratórneho v závislosti od prenatálnej expozície tou istou drogou. Studentská vědecká konference, 3. lélařská fakulta, Univerzita Karlova, 27.5.2014, Praha.
8. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Effect of methamphetamine on cognition function of adult male rats exposed to the same drug in different prenatal period. 9th FENS Forum of Neuroscience, 5. -9.6.2014, Miláno, Itálie.
9. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Pohlavné rozdiely v účinku prenatálneho, neonatálneho a akútneho metamfetamínu na správanie dospelého potkana. Výjezdní zasedání PRVOUK P34, 7. -8. 11. 2014, Brandýs nad Labem.
10. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Gender differences in behavioral changes caused by early methamphetamine exposure and application of the same drug in adult rats. Society for Neuroscience, 15. -19.11.2014, Washington D.C., USA.
11. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Pohlavné rozdiely v účinku prenatálneho, neonatálneho a akútneho metamfetamínu na správanie dospelého potkana. 24. Neuroontogenetický diskusní den, 10.12.2014, Praha.
12. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Pohlavné rozdiely v účinku prenatálneho, neonatálneho a akútneho metamfetamínu na správanie dospelého potkana. 57. česko-slovenská psychofarmakologická konference, 7. –11.1. 2015, Lázně Jeseník.
13. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Pohlavné rozdiely v účinku prenatálneho, neonatálneho a akútneho metamfetamínu na správanie dospelého potkana. 91. Fyziologické dny, 3. –5.2.2015, Brno.

14. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Pohlavné rozdiely v účinku prenatálneho, neonatálneho a akútneho metamfetamínu na správanie dospelého potkana. Studentská vědecká konference, 3. lélařská fakulta, Univerzita Karlova, 19.5.2015, Praha.
15. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Pohlavné rozdiely v účinku prenatálneho, neonatálneho a akútneho metamfetamínu na správanie dospelého potkana. 20. Konference patologické a klinické fyziologie, 22. –24.9.2015, Plzeň.
16. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Sex dimorphic effect of acute methamphetamine treatment on behavior of adult rats exposed to the same drug throughout gestation or early neonatal period. Society for Neuroscience, 16. – 24.10.2015, Chicago, USA.
17. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Pohlavní rozdíly v účinku prenatálního, neonatálního a akutního metamfetaminu na chování dospělého potkana. Výjezdní zasedání PRVOUK P 34, 7. -8.11.2015, Brandýs nad Labem.
18. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Závisí účinek metamfetaminu na učení a paměť dospělého potkana od periody aplikace během jeho vývoje? 92. Fyziologické dny, 4. -6.2.2016, České Budějovice.
19. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Závisí účinok metamfetamínu na kognitívne funkcie potkana od periódy aplikácie počas jeho neuroontogenetického vývinu? Studentská vědecká konference, 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, 10.5.2015, Praha.
20. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Critical developmental period for the effect of methamphetamine on social behaviour of rats. International Behavioral Neuroscience Society 2016, 6. –13.6. 2016, Budapešť, Maďarsko.
21. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Critical developmental period for the effect of methamphetamine on cognition of

male rats. 10th Federation of European Neuroscience Societies, 1. –7.7.2016, Kodaň, Dánsko.

22. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Nohejlová K., Šlamberová R.: Závisí vliv metamfetaminu na sociální chování dospělého potkana na době aplikace během jeho neuro-ontogenetického vývoje? Výroční zasedání PRVOUK P 34, 11. -12.11.2016, Brandýs nad Labem.
23. Hrebíčková I., Ševčíková M., Macúchová E., Šlamberová R.: Kritické vývojové periódy pre účinky metamfetamínu na sociálne správanie dospelého potkana. 59. Česko-slovenská psychofarmakologická konference, 4.–7.1.2017, Lázně Jeseník.
24. Hrebíčková I., Ševčíková M., Šlamberová R.: Podmieňuje expozícia metamfetamínu v rôznych neuroontogenetických štádiách potkana jeho aktívne vyhľadávanie drogy v dospelosti? 93. Fyziologické dny, 2.– 4.2. 2017, Košice, Slovensko.
25. Hrebíčková I., Ševčíková M., Šlamberová R.: Critical neurodevelopmental period for the effects of methamphetamine on creating predisposition to drug addiction in adulthood. Behavior 2017, 30.7. -4.8.2017, Estoril, Portugalsko.
26. Hrebíčková I., Ševčíková M., Šlamberová R.: Critical neurodevelopmental period for the effects of methamphetamine on creating predisposition to drug addiction in adulthood. European Behavioural Pharmacology Society, 31.8. -3.9.2017, Heraklion, Kréta, Řecko.
27. Hrebíčková I., Ševčíková M., Šlamberová R.: Vliv neonatálneho metamfetaminu na prostorové učení a paměť. Výroční zasedání Progres Q 35, 24. -25.11.2017, Brandýs nad Labem.
28. Hrebíčková I., Ševčíková M., Šlamberová R.: The impact of neonatal methamphetamine on spatial learning and memory of females in adulthood. 11th Czech Neuroscience, 28. -29.11.2017, Praha.
29. Hrebíčková I., Ševčíková M., Šlamberová R.: The impact of neonatal methamphetamine on spatial learning and memory of females in adulthood. 94. Fyziologické dny, 6. -8.2.2018, Plzeň.