

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Biologie
Fyziologie živočichů



Bc. Jana Puskarčíková

Interakce serotoninových 1A receptorů s N-methyl-D-
aspartátovým receptorem: Význam v léčbě a patofyziologii
schizofrenie

Interaction of serotonin-1A receptors with N-methyl-D-aspartate
receptor:
Implication for treatment and pathophysiology of schizophrenia

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:
RNDr. Věra Bubeníková - Valešová, PhD.

Praha 2010/2011

Prohlášení:

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

V Praze, 19. 08. 2011

.....

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala všem, kteří byli nápomocni vzniku této diplomové práci. Především děkuji své školitelce, RNDr. Věře Bubeníkové - Valešové, PhD., za cenné rady, trpělivost a odborné vedení během celé diplomové práce. Dále chci poděkovat laborantce Veronice Hejlové za ochotu pomoci mi v laboratoři.

Abstrakt:

Schizofrenie je závažné psychické onemocnění postihující asi 1% světové populace. Serotoninové-1A (5-HT1A) receptory se nalézají na dendritech, v kterých jsou koncentrované i N-metyl-D-aspartátové (NMDA) receptory. Současná léčba má mnoho nežádoucích účinků. Na základě hypoglutamátergní hypotézy schizofrenie je současnou strategií v hledání nových léků nepřímá aktivace NMDA receptorů. Přímá aktivace NMDA receptoru vede k poškození neuronů. Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda NMDA receptory interagují se 5-HT1A receptory jak na molekulární, tak na behaviorální úrovni. Na molekulární úrovni jsme zjistili, že podání agonistů 5-HT1A receptorů (8-OH-DPAT, tandospiron) vede ke zvýšení/snížení exprese podjednotek (GluN1, 2B) NMDA receptoru ve frontální kůře a hipokampu. Na behaviorální úrovni jsme v testu na senzomotorický gating (Prepulzní inhibice úlekové reakce, PPI) zjistili, že podání 8-OH-DPAT zhoršuje zpracování informací. Tandospiron neměl na PPI vliv. Test měření úzkosti (Ultrazvuková vokalizace) ukázal, že 8-OH-DPAT a tandospiron ve vysokých dávkách zlepšují anxieta. Z testu na rozpoznávací paměť (Novel object recognition test, NORT) vyplývá, že tandospiron, v nižší dávce zlepšuje rozpoznávací paměť. 8-OH-DPAT neměl na úroveň rozpoznávací paměti vliv. Dílčím cílem bylo zjistit, zda podání agonistů 5-HT1A receptoru v kombinaci s antagonistou NMDA receptoru MK-801 (model schizofrenii podobného chování) ovlivňuje podjednotky NMDA receptoru. Tandospiron i 8-OH-DPAT snižovaly/zvyšovaly expresi podjednotek (GluN2A, 2B) NMDA receptoru ve frontální kůře a hipokampu. V testu PPI 8-OH-DPAT v nižší dávce zvyšoval PPI, naproti tomu vyšší dávka 8-OH-DPAT snižovala PPI. Tandospiron vykazoval stejný design účinku jako plný agonista. Je tedy vidět, že NMDA receptory interagují s 5-HT1A receptory, proto nepřímé ovlivnění NMDA receptoru přes 5-HT1A receptory pomocí agonistů těchto receptorů by mohlo mít pozitivní přínos pro pacienty s neuropsychiatrickým onemocněním jako je schizofrenie, epilepsie atd.

Abstract:

Schizophrenia is a serious mental disorder affecting about 1% of the world's population. Serotonin-1A (5-HT_{1A}) receptors are found on dendrites, which are concentrated in and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. Current therapy has many side effects. Based on hypoglutamatergic hypothesis of schizophrenia, the current drug strategy for treatment of schizophrenia is indirect activation of NMDA receptors. Direct activation of NMDA receptors leads to neuronal damage. The aim of this thesis was to determine whether NMDA receptors interact with 5-HT_{1A} receptors on the molecular and the behavioral level. At the molecular level, we found that administration of 5-HT_{1A} agonist receptors (8-OH-DPAT, tandospirone) increased/decreased the expression of subunits (GluN1, 2B) of the NMDA receptor in the frontal cortex and hippocampus. At the behavioral level, we test animals for sensorimotor gating (Prepulse inhibition of startle response, PPI). We found that the administration of 8-OH-DPAT worsed the information processing. Tandospirone had no effect on PPI. We measure anxiety behaviour by ultrasonic vocalization test (UVS) and we found that 8-OH-DPAT as well as tandospirone at high doses improves anxiety. The test for recognition memory (novel object recognition test, NORT) showed that tandospirone at a lower dose, but not 8-OH-DPAT improved recognition memory in NOR task. A sub-objective was to determine whether the administration of 5-HT_{1A} agonist receptor in combination with the NMDA receptor antagonist MK-801 (model of schizophrenia-like behavior) affects the expression of NMDA receptor subunits. Tandospirone and 8-OH-DPAT decreased/increased expression of subunits (GluN2A, 2B) in the frontal cortex and hippocampus. In the PPI test, 8-OH-DPAT at higher dose and tandospirone potentiated the disruption of PPI induced by MK-801. It is clear that NMDA receptors interact with 5-HT_{1A} receptors, thereby indirectly affecting the NMDA receptor via 5-HT_{1A} receptors by agonists of these receptors could have positive benefits for patients with neuropsychiatric disorders such as schizophrenia, epilepsy atd.

Obsah:

1. Úvod	10
1.1. Patofyziologie schizofrenie	10
1.1.1. Příznaky schizofrenního onemocnění	10
1.1.2. Průběh schizofrenního onemocnění	12
1.1.3. Etiologie schizofrenie	13
1.1.4. Genetické faktory schizofrenie	14
1.2. Mechanismus účinku antipsychotik	19
1.2.1. Antipsychotika první generace	20
1.2.2. Antipsychotika druhé generace	21
1.2.3. Atypická antipsychotika a glutamát.....	22
1.3. Animální modely schizofrenie	23
1.3.1. N-methyl-D-aspartátové receptory a jejich význam v modelování schizofrenie	24
1.3.2. Humánní modely schizofrenie	27
1.3.3.1 Neurovývojové modely	29
1.3.3.2 Genetické modely.....	30
1.3.3.3 Farmakologické modely	32
2.4. Serotoninový 1 A receptor v léčbě a patofyziologii schizofrenie	35
2.4.1. 5-HT1A receptor – struktura, funkce, umístění	35
2.4.2. 5-HT1A receptory a schizofrenie	37
2.4.3. 5-HT1A receptor v léčbě schizofrenie	37
2.5. Interakce serotoninových 1A receptorů s NMDA receptory	39
2. Cíle práce	43
3. Metody a materiál	44
3.1. Použité chemikálie a roztoky	44
3.2. Zvířata.....	45
3.3. Aplikace látek.....	45
3.4. Analýza dat	46
3.5. Immunobloting	46
3.6. Prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI)	48
3.7. Novel Object Recognition test/task (NORT)	49
3.8. Ultrazvuková vokalizace (UZV).....	50
4. Výsledky	52
4.1. Účinek agonistů 5-HT1A receptorů na expresi podjednotek NMDA receptoru.....	52

4.2. Účinek agonistů 5-HT1A receptorů na expresi podjednotek NMDA receptoru v kombinaci s MK-801	54
4.3. Účinek agonistů 5-HT1A receptorů na prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI)	57
4.4. Účinek agonistů 5-HT1A receptoru na MK-801 indukovanou prepulzní inhibici (PPI).58	
4.5. Účinek agonistů 5-HT1A receptoru na ultrazvukovou vokalizaci (UZV)	59
4.6. Účinek agonistů 5-HT1A receptoru na Novel Object Recognition Test (NORT)	61
5. Diskuze.....	64
5.1. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na expresi podjednotek NMDA receptoru.....	64
5.2. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI).....	66
5.3. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na ultrazvukovou vokalizaci (UZV)	67
5.4. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na rozpoznávací (recognition) paměť v NORTu	68
5.5. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru v kombinaci s MK-801 na expresi podjednotek NMDA receptoru.....	69
5.6. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na MK-801 indukovanou inhibici PPI	70
6. Závěr	71
7. Literatura	73
8. Seznam příloh:	95

Seznam zkratk:

5-HT	5-hydroxytryptamin (serotonin)
5-HT1A	serotoninový receptor 1A
AMPA	alfa-amino-3-hydroxy-5-metyl-4-izoxazolpropionát
ANOVA	analýza rozptylu
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BLOC-1	the biogenesis of specialized organelles of the endosomal-lysosomal komplex
<i>CAMKII</i>	kalmodulin kináza II
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
COMT	katechol-O-metyltransferáza
CREB	cAMP response element-binding
D 2, 3	dopaminový receptor 2, 3
DAAO	D-aminoacidooxidáza
DISC1, DISC2	gen „poškozený při schizofrenii“ (Disrupted-in Schizophrenia 1 a 2)
DLPK	dorzolaterální nefrontální kůra
DNTBP1	dystrobrevin-binding protein
DOPA	dihydroxyphenylalanin
DSM-IV	Diagnostická a statistická příručka duševních nemocí (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4. Edice)
EPS	extrapyramidální syndrom
fMR	funkční magnetická rezonance
FYZ	fyzilogický roztok
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GRM3	metabotropní glutamátový receptor-3
ICD	Interantional Statistical Classification of Diseases
IGF	insulin-like growth factor
KA	kyselina kainová
MAM	metylazoxymetanolacetát
MAP	protein asociovaný s mikrotubuly (Microtubule-Associated Protein)
MK-801	dizocilpin

MKN	Mezinárodní klasifikace nemocí
mRNA	informační (messenger RNA)
MRS	magnetická rezonanční spektroskopie
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NRG-1	neuregulin-1
NORT	Novel Object recognition test
PCP	fencyklidin
PDS	protein postsynaptické denzity (Postsynaptic Density Protein)
PET	pozitronová emisní tomografie
PFC	prefrontální kůra
PKA, B, C	protein kináza A, B, C
PLC	fosfolipáza C
PPI	prepulzní inhibice úlekové reakce
PRODH	prolinderhydrogenáza
PSD-95	protein postsynaptické denzity 95 (Postsynaptic Density Protein 95)
RGS4	regulátor signalizace G-proteinu 4
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
SSRI	selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (Selective Serotonin reuptake Inhibitor)
USV	ultrasonická vokalizace

1. Úvod

1.1. Patofyziologie schizofrenie

Schizofrenie je závažné, specificky lidské onemocnění, které se projevuje poruchami myšlení, vnímání, jednání, vůle a emocí. Výrazně snižuje kvalitu života. Schizofrenie (skhizein: rozštěp; phren: mysl) byla popsána počátkem 20. století jako onemocnění heterogenní etiologie („skupina schizofrenií“). Toto onemocnění je rozšířeno celosvětově, celoživotní prevalence je 1,4 – 4,6 na 1000 osob (Saha et al., 2005). Tyto hodnoty jsou pouze přibližné, v důsledku například demografických rozdílů mezi jednotlivými populacemi, migrace nebo věkové specifikace mortality. V České republice bylo v roce 2002 v lékařské péči 36 688 osob s diagnostikovanou schizofrenií (uzis.cz/cz/archiv02). V roce 2010 stoupl počet pacientů se schizofrenií na 41 223 (viz. tabulka 1). Incidence schizofrenie se pohybuje od 0,16 – 0,42 na 1000 osob v populaci (Jablensky et al., 1992). Celosvětově je výskyt schizofrenie vyšší u mužů než u žen (McGrath et al., 2004).

Tabulka 1: Počty pacientů se schizofrenií v ČR podle pohlaví a věkových skupin (ÚZIS ČR, Aktuální informace č. 15/2010).

Schizofrenie (F20 – F29)	Celkem 41 223	Z toho v procentech			
		Ženy	0–14 let	15–19 let	20 let a více
		54,1	0,1	2,7	97,2

1.1.1. Příznaky schizofrenního onemocnění

Příznaky schizofrenního onemocnění nejsou jednotné. Existuje mnoho přístupů k jejich dělení. Dělení příznaků na pozitivní vs. negativní vychází z práce anglického neurologa J. Hughlinse-Jacksona, dále pak existují například kategorické (Crow et al., 1981) a dimenzionální modely (Liddle, 1987). Nejpoužívanější je dělení příznaků schizofrenie na pozitivní a negativní (viz. tabulka 2).

Tabulka 2: Dělení příznaků schizofrenie (Andreasen et al., 1995).

Negativní symptomy	Pozitivní symptomy
nedostatky v řeči	halucinace
afektivní oploštěnost	bludy
apatie	bizarní chování
anhedonie – asocialita	porucha platného společenského myšlení
narušená pozornost	katatonie

Pozitivní symptomy, například bludy a halucinace, se manifestují jako projev patologické desinhibice korových funkcí - normální psychika je neobsahuje, jsou tedy „navíc“. Pozitivní symptomy zahrnují nadměrnou aktivitu mesolimbického dopaminového systému. Negativní symptomy nejsou specifické pouze pro schizofrenii, ale jsou přítomny i u některých organických poruch, především po poškození frontálních laloků (Carlson, 2004). Negativní symptomy, plochý afekt, apatie, reprezentují generalizovanou ztrátu funkcí - normální psychika je o ně „ochuzena“. Kognitivní deficit se též řadí mezi symptomy schizofrenního onemocnění, zahrnuje problémy s pracovní pamětí, vizuálním a verbálním vybavováním a orientovanou pozorností. U části pacientů se schizofrenií se kognitivní deficit vyskytuje v celém průběhu onemocnění (Heaton et al., 1994).

Pro potřeby mezinárodní komunikace a klinické praxe se používají deskriptivní klasifikační systémy. Diagnostická kritéria vycházejí ze současných klasifikačních systémů MKN – 10 (ICD – 10) nebo DSM-IV. Schizofrenie se podle současných MKN – 10 i DSM-IV projevuje charakteristickou směsí pozitivních a negativních příznaků, které jsou přítomny v dostatečně zřetelné míře a po určitou dobu (viz. tabulka 3).

Tabulka 3: Obecná kritéria MKN-10 pro schizofrenii (Smolík, 1996)

<p>Je přítomen alespoň jeden ze syndromů, symptomů a znaků popsaných níže (1) nebo alespoň dva ze symptomů a znaků uvedených pod (2), a to po většinu psychotického období, které trvá alespoň jeden měsíc (nebo někdy po většinu dnů).</p>
<p>1. Musí být přítomna alespoň jedna z následujících charakteristik:</p>
<p>a) ozvučování myšlenek, vkládání nebo odnímání myšlenek, vysílání myšlenek</p>
<p>b) bludy kontrolování, ovlivňování nebo ovládnutí, zřetelně se projevující pohyby těla nebo končetin, nebo zvláštní myšlenky, činnosti nebo pocity, bludné vnímání</p>
<p>c) halucinace hlasů, které komentují pacientovo chování nebo které mezi sebou hovoří, nebo jiné typy hlasů, přicházejících z některých částí těla</p>
<p>d) neustálé bludy jiných typů, které nemohou být podmíněny příslušnou kulturou a jsou zcela nepatřičné, jako náboženská nebo politická identita, nadlidská moc nebo schopnost (schopnost kontrolovat počasí nebo být ve spojení s cizinci z jiného světa)</p>
<p>2. Nebo alespoň dvě z následujících charakteristik:</p>
<p>a) neustálé halucinace jakéhokoli typu, pokud se vyskytují denně po dobu nejméně 1 měsíce a jsou spojeny s bludy (buď s občasnými nebo jen částečně formovanými) bez jasného emotivního obsahu nebo jsou doprovázeny trvale zvýšeným sebehodnocením</p>
<p>b) neologismy, přerušování nebo zárazy myšlení, jejichž důsledkem jsou inkoherence nebo zmatený slovní projev</p>
<p>c) katatonní chování, jako je vzrušení, nástavy nebo vosková ohebnost, mutismus a stupor</p>
<p>d) zřetelná apatie, ochuzení řeči a ploché nebo nepřiměřené odpovědi (musí být jisté, že se nejedná o příznak deprese nebo následek neuroleptické léčby)</p>

1.1.2. Průběh schizofrenního onemocnění

Průběh onemocnění schizofrenií je též nejednotný. Poprvé se schizofrenie manifestuje v pozdní adolescenci nebo časně dospělosti. Většinou začíná nespecifickými symptomy jako je neklid a náladovost, proto určit počátek tohoto onemocnění je obtížné. Schizofrenie může probíhat chronicky bez předchozího zlepšení, v atakách s narůstajícím nebo stabilním defektem nebo v atakách s částečnou nebo úplnou remisí. Model chronické schizofrenie zformuloval Breier v roce 1991. Časná stádium nemoci se vyznačuje deteriorací, střední stádium je

charakterizováno relativní stabilitou a konečné stádium je typické postupným zlepšením stavu pacienta (Breier et al., 1991).

U schizofrenie je vysoké riziko suicidia. O sebevraždu se pokusí 25-50 % pacientů, 4-13 % ji dokoná (Meltzer, 2001). Riziko sebevraždy je vysoké hlavně u mladých pacientů, během prvního roku po stanovení diagnózy (Osby et al., 2000).

1.1.3. Etiologie schizofrenie

Etiologie schizofrenie není přesně známa. Předpokládají se multifaktoriální příčiny a mnohočetné patofyziologické vlivy. Při rozvoji schizofrenie se uplatňují jak genetické vlivy, tak vlivy zevního prostředí (viz. tabulka 4). Genetické a epidemiologické studie odhalily řadu rizikových faktorů. Obecný rámec tvoří teorie zátěže a dispozice: Dědičná nebo získaná vloha disponuje k selhání adaptivních funkcí duševního života, což vede k nepřizpůsobivému chování při zátěži. To prohlubuje snížení odolnosti jedince a nakonec vyústí do klinické manifestace onemocnění. Zátěž tvoří souhrn psychologických a sociálních faktorů (Höschl et al., 2004).

Tabulka 4: Rizikové faktory pro schizofrenii

GENETICKÉ
<ul style="list-style-type: none">• Změny v jednom či více genech podílejících se na kontrole časného vývoje mozku
NEGENETICKÉ
<ul style="list-style-type: none">• Komplikace při těhotenství a porodu• Menší fyzické odchylky zahrnující jemné změny ve vývoji různých orgánů• Datum a místo narození• Sezónní vlivy• Infekce• Nutriční faktory• Návykové látky• Migrace• Rodinné vztahy a komunikace v rodině• Sociální fungování v dětství a adolescenci

1.1.4. Genetické faktory schizofrenie

Za geneticky podmíněné onemocnění je považováno to, kde konkordance u jednovaječných dvojčat je statisticky významně vyšší než u dvouvaječných dvojčat (Beckmann a Franzek, 2000). Míra výskytu schizofrenie se podle dostupných studií u jednovaječných dvojčat uvádí mezi 43-65 %, u dvouvaječných dvojčat je to 4-27 %. Míra shodného výskytu schizofrenního onemocnění je tedy několikanásobně vyšší u jednovaječných než u dvouvaječných dvojčat. To znamená, že o genetickém podkladu schizofrenie nemůže být pochyb (Owen et al., 2002). V současnosti je schizofrenie považována za polygenní onemocnění (Preston a Weinberger, 2005). Na genetickou složku onemocnění poukazují studie s dvojčaty a studie sledující výskyt schizofrenie v rodinách (viz tabulka 5, studie: Tsuang, 2000). Ty vypovídají o tom, že riziko onemocnění pro příbuzné pacientů se schizofrenií zhruba odpovídá množství společně sdílených genů (Tsuang, 2000). A adopční studie, které ukazují, že riziko, které je spojené s nemocí rodiče, nezaniká výchovou v adoptivní rodině (Gotessman a Shields, 1982).

Tabulka 5: Riziko vzniku schizofrenie podle příbuznosti (podle Tsuang, 2000)

Stupeň příbuznosti	Riziko
jednovaječná dvojčata	48 %
děti se dvěma rodiči se schizofrenií	46 %
sourozenci se dvěma nemocnými rodiči	46 %
sourozenci s jedním nemocným rodičem	17 %
děti	13 %
rodiče	6 %
sourozenci	9 %
dvouvaječná dvojčata	17 %
nevlastní sourozenci	6 %
neteře/synovci	4 %
vnoučata	5 %
tety/strýci	4 %
vzdálení bratřenci	2 %

Z dalších studií se používají studie asociační, které se stále vyšší přesností poukazují na některé konkrétní geny, jejichž polymorfizmy jsou pokládány za významné pro rozvoj či léčbu schizofrenie. Jedná se především o geny spojené s N-methyl-D-aspartátovým (NMDA) receptorem a metabolismem glutamátu. Jedna z nejvíce konzistentních strukturálních abnormalit nalezených u schizofrenie je

objemové snížení mediálního temporálního lobu (hipokampální formace, subiculum, parahipokampální gyrus) a neokortexu (Ross et al., 2006), k dalším abnormalitám u pacientů se schizofrenií patří snížení komplexity dendritického větvení, celkové délky a hustoty dendritů pyramidálních neuronů v prefrontální kůře (PFC), (Garey et al., 1998; Rajkowska et al., 1998; Kalus et al., 2000). Narušení morfologie dendritů a změny v kortikální a/nebo talamické integritě u schizofrenie, mutace v genech spojené s NMDA receptorem, mohou být neurobiologickým substrátem základní kognitivní a senzorické dysfunkce u pacientů (Lewis a Gonzalez-Burgos, 2008).

Genem významným v etiopatogenezi schizofrenie je například gen pro neuregulin (NRG 1). Nachází se na krátkém raménku osmého chromozomu (8p), (Stefansson et al., 2002; Harrison et Owen, 2003). Neuregulin se podílí na buněčné diferenciaci, migraci neuronů, vývoji mozkové tkáně, podporuje vývoj oligodendrocytů a moduluje jejich interakci s neurony, ovlivňuje synaptogenezi, reguluje expresi genů pro podjednotky glutamátergních NMDA receptorů. Protein neuregulin 1 reguluje expresi podjednotek NMDA receptoru a přímo aktivuje receptor spojený s tyrozinkinázou ErbB4 (viz. obrázek 1). Receptor ErbB4 je kolokalizovaný s NMDA receptory na postsynaptické membráně. Aktivací receptorů ErbB4, ErbB2 a ErbB3 dochází k fosforylaci GluN2 podjednotek NMDA receptoru. Po navázání agonisty je pak NMDA receptor otevřen více než bez působení neuregulinu (Moghaddam, 2003).

Důležitým se také ukazuje gen pro dysbindin (dystrobrevin-binding protein – DTNBT1), (Harrison a Weinberger, 2005). Gen je na krátkém raménku šestého chromozomu (6p). Dysbindin je součástí tzv. the biogenesis of specialized organelles of the endosomal-lysosomal complex (BLOC-1). O významných asociacích různých polymorfizmů genu pro dysbindin a schizofrenie se pojednává v několika studiích (Straub et al., 2002; Tang et al., 2003; Williams et al., 2004). Stabilizace glutamátových ionotropních receptorů je zajištěna právě dysbindinem, který vytváří glykoproteinové komplexy s dystrobreviny (Harrison a Owen, 2003). U pacientů se schizofrenií dochází ke snížení exprese mRNA nebo bílkovin dysbindinu v hipokampu (Talbot et al., 2004; Weickert et al., 2008) a prefrontální kůře (Weickert et al., 2004). V této lokalizaci může prostřednictvím snížené exocytózy glutamátu ovlivňovat přenos informací a následně může mít negativní vliv na kognitivní funkce a závažnost negativních symptomů. Předpokládá se, že postsynapticky hraje roli v ovlivnění dlouhodobé potenciace a synaptické plasticitě neuronů cestou cAMP-systému. Prostřednictvím PI3K/PDK1/Akt signální cesty, i když ne zcela jasným

mechanismem, vykazuje antiapoptotický efekt. Zvýšení exprese dysbindinu vede ke zvýšenému uvolňování glutamátu do synaptické štěrby, snížení exprese proti tomu exocytózu glutamátu snižuje (Numakawa et al., 2004). V případě dopaminu způsobuje snížení exprese dysbindinu naopak jeho zvýšené uvolňování (Kumamoto et al., 2006; Murotani et al., 2007).

Dalším kandidátním genem v etiologii schizofrenie je gen s názvem DISC-1 (viz. obrázek 1), (zabírá přibližně 415 kB genomické DNA a sestává z 13 exonů). Ve velké skotské rodině Millar se spolupracovníky prokázali vyváženou translokaci (1, 11); (q 42.1, q 14.3), která se v této rodině segreguje s příznaky schizofrenního onemocnění. Autoři testovali možnost, že tato translokace je příčinou onemocnění a narušuje expresi genů chromosomu 1, nikoli chromosomu 11 (Millar et al., 2000). Translokace totiž narušuje v chromosomu 1 hned dva geny, které byly pojmenovány Disrupted-in-Schizophrenia-1/2 (DISC1 a 2). Prvně byla tato translokace zkoumána v širším kontextu v souvislosti s psychiatrickými onemocněními včetně schizofrenie, bipolární poruchy a deprese (St Clair et al., 1990). DISC1 a 2 mají vliv na zvýšení prevalence u schizofrenie. První nezávislý důkaz pro zapojení DISC1 v psychiatrických onemocněních přišel ze dvou finských asociačních studií. Tyto studie prokázaly, že oblasti 1q 32.2 - q 41 chromozomu 1, genu DISC (konkrétně v intronu 9) mají souvislost se zvýšeným rizikem schizofrenie a schizoafektivní poruchy (Detera-Wadleigh et al., 1999; Hovatta et al., 1999; Ekelund et al., 2000, 2001, 2004; Hamshere et al., 2005; Chubb et al., 2008). Ukázalo se, že gen DISC 1 souvisí i s redukcí šedé hmoty především v hipokampální a prefrontální oblasti (Callicott et al., 2005; Thomson et al., 2005; Hashimoto et al., 2006).

Zajímavý gen zapojeným do etiologie schizofrenie je gen Akt (viz. obrázek 1). Akt je serin/threonin kináza, velká cca 60kDa. U lidí i u hlodavců se vyskytuje ve třech izoformách Akt1/PKB, Akt2/PKB a Akt3/PKB, které mají vysokou míru sekvenční homologie (Murthy et al., 2000). Akt vykazuje vysokou podobnost s protein kinázou A (PKA) a protein kinázou C (PKC), proto byl původně nazývaný protein kináza B (PKB). Akt je aktivována P-13 kinázou a podílí se regulaci metabolismu glukózy – glykolýzy, syntézy glykogenu a příjmu glukózy do buněk. V jádře a cytoplasmě se účastní intracelulární signalizace (P13/PDK1/Akt signální cesta a fosforylace CREBu – cAMP response element-binding) s výsledným antiapoptotickým účinkem. P13 kináza je aktivovaná růstovými faktory jako jsou „brain derived neurotrophic factor“ (BDNF), „nerve growth factor“ (NGF) a „insulin-like

growth factor“ (IGF). Vykazuje protektivní účinek zvýšením odolnosti neuronů vůči buněčnému stresu, ale neovlivňuje jejich viabilitu (Brunet et al., 2001; Numakawa et al., 2004). S Akt je spojen dysbindin. Dysbindin by mohl mít vliv na antiapoptotický efekt Akt. Zvýšená exprese dysbindinu relativně zvyšuje množství fosforylovaného Akt proteinu prostřednictvím P-13 kinázy. Celkové množství enzymu se však nemění (Numakawa et al., 2004). První důkazy o spojení mezi Akt a schizofrenií se objevily v roce 2004 (Emamian et al., 2004) a byly potvrzeny v mnoha studiích: Ikeda et al., 2004; Schwab et al., 2005; Xu et al., 2007; Tan et al., 2008; Thiselton et al., 2008.

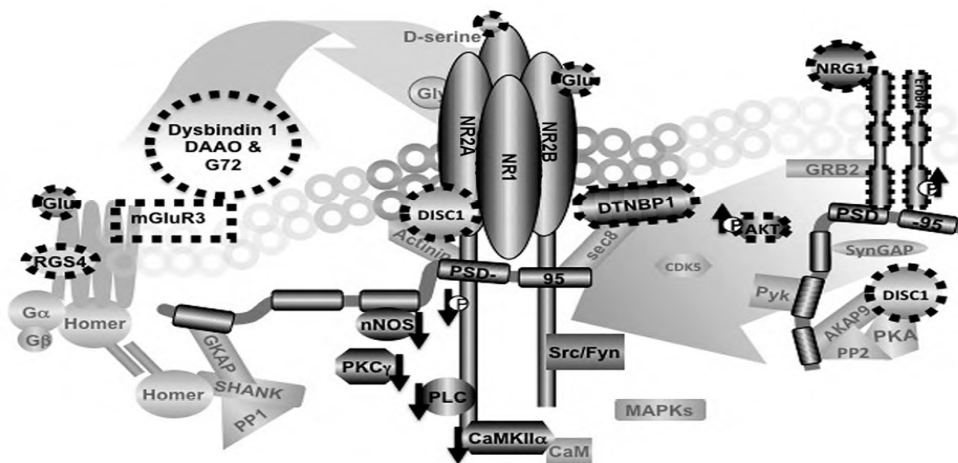
Dalšími důležitými geny jsou geny kódující G72, ležící na dlouhém raménku třináctého chromozomu (13q) a D-aminoacidooxidázu (DAAO) – dlouhé raménko dvanáctého chromozomu (12q), (viz. obrázek 1). Tento enzym poprvé popsal Krebs v roce 1935 (Krebs, 1935). DAAO se podílí na metabolizaci D-serinu, jenž je endogenním modulátorem tohoto receptoru. G72 je pravděpodobně aktivátorem DAAO (Harrison a Owen, 2003).

Regulátor signalizace G-proteinu 4 (RGS4) se nachází na dlouhém raménku prvního chromozomu (1q), (viz. obrázek 1). RGS4 negativně reguluje G proteinovou aktivaci, kdy urychluje hydrolýzu guanosin trifosfátu z podjednotky α trimerního G proteinu. Tato reakce zkrátí trvání signálů mnoha neurotransmiterů, včetně těch, které jsou spojeny se schizofrenií, jako jsou dopamin, glutamát, serotonin a kyselina gama-aminomáselná (GABA), (De Vries et al., 2000). Ačkoli je známo, že se RGS4 účastní neuronálního přenosu signálu, přesný mechanismus, kterým RGS4 zvyšuje riziko schizofrenie je nejasné. Na význam tohoto genu ve spojitosti se schizofrenií upozornila v roce 2000 například práce Brzustowicze a kolektivu. Tento nálezn byl potvrzen v roce 2002 Chowdharim a následně také studii dalšími autory: Williams et al., 2004; Talkowski et al., 2006, Chowdari et al., 2007.

O asociaci schizofrenie a genu pro metabotropní glutamátový receptor-3 (GRM3), který se nachází na dlouhém raménku 7 chromozomu, bylo referováno v mnoha studiích (Fujii et al., 2003; Egan et al., 2004). Ty zjistily, že variace struktury genu GRM3 mohou souviset s poruchou epizodické paměti, pozornosti a abnormální prefrontální a hipokampální glutamátergí neurotransmise.

Během posledních deseti let se ukazuje, že klíčovou může být úloha nerovnováhy kinázové/fosfatázové regulace NMDA receptoru u schizofrenního onemocnění, které je právě charakterizované hyper nebo hypofunkcí těchto receptorů (viz. obrázek 1). Dysregulace fosforylace NMDA receptoru tak může

příspěvek k etiologii schizofrenie. Jako příklad lze uvést fosforylaci tyrosinu v podjednotkách NMDA receptoru prostřednictvím kináz rodiny Src (Ali et al., 2001). Modulace aktivity NRG1 pomocí fosforylace právě přes kinázy Src/Fyn může způsobovat kognitivní deficit u schizofrenie jako důsledek hyperfunkce NRG 1 ErbB4 signalizace, což vede k potlačení NMDA receptorové dependentní synaptické plasticity.

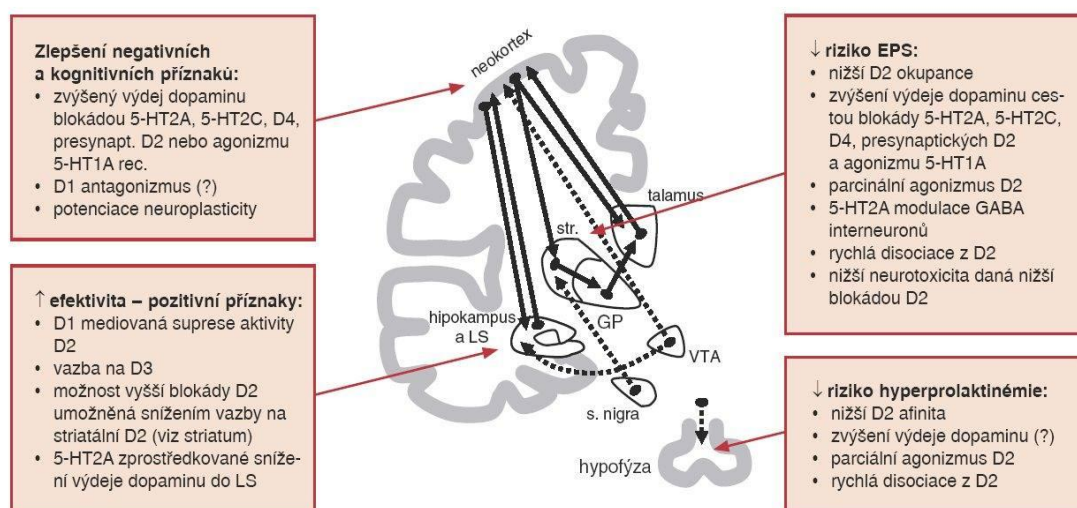


Obrázek 1: Interakce proteinů významných v patofyziologii schizofrenie s NMDA receptorovým (NMDAR) komplexem. *Dysbindin 1 moduluje uvolňování glutamátu, DAAO a G72 regulují D-serin a tím mění aktivaci NMDA receptoru. Tyto poruchy regulace pocházejí z ligandem zprostředkovaných procesů a vedou ke změnám mezi NMDA receptorem a jeho signálními partnery, kterými jsou PLC, PKC, nNOS a další. U mozků pacientů se schizofrenií, post mortem, bylo zjištěno snížení asociací mezi NMDAR1 a PLC, nNOS a CAMKII (viz šipky dolů). ErbB4, DISC1 a dysbindin 1 mohou mít také přímý vliv na asociaci proteinů spojených s NMDA receptorem; ErbB4 přes PSD-95, DISC1 přes AKAP9 nebo aktinin a dysbindin 1 přes sec8. Geny náchylné mutovat, potažmo jejich signální dráhy, zprostředkované ligandem nebo post-receptorovými mechanismy, mohou posílit asociace bílkovin v rámci NMDA receptorových komplexů. Je jasné, že existuje řada možných protein-proteinových interakcí spojených s NMDA receptorovými komplexy, které mohou být spojeny s různými psychiatrickými onemocněními (Fernández, et al., 2009). Tento diagram představuje permutace z mnoha možných uspořádání.*

Vysvětlivky: DISC1... Disrupted-in-Schizophrenia-1; DAAO... D-aminoacidooxidáza; RGS4... regulátor signalizace G-proteinu 4; NRG1...neuregulin; DTNB1...dysbindin 1; PLC...fosfolipáza C; PKC...proteinkináza C; mGluR3...metabotropní glutamátový receptor 3; CAMKII...kalmolulin kináza II; Glu...glutamát.

1.2. Mechanismus účinku antipsychotik

Schizofrenie je léčitelné onemocnění. Většina pacientů je však odkázána na dlouhodobou terapii. Terapie schizofrenie je komplexní, je to vždy farmakoterapie, doplněná o psychosociální intervence. Antipsychotika jsou léky určené k odstranění akutních psychotických příznaků a k dlouhodobé prevenci relapsu. Příznivě ovlivňují integrace psychických funkcí (Švestka, 2002). Od objevu chlorpromazinu (phenothiazinový derivát původně vyvíjený jako anestetikum) a jeho prvního podání psychiatrickému pacientovi panu Bertrandovi P., uplynulo více než půl století (Delay et al., 1952; Hamon et al., 1952). V současnosti všechna registrovaná antipsychotika primárně ovlivňují dopaminový systém (Horáček et al., 2006). Antipsychotika lze rozdělit na antipsychotika I. a II. generace (viz. obrázek 2).



Obrázek 2: Zjednodušené schéma mechanismu účinku antipsychotik. Plné šipky znázorňují hlavní neuronální okruhy zahrnuté do patofyziologie schizofrenie. Jedná se o reciproční spoje z kortexu do hipokampu, resp. šířeji do mediotemporálního kortexu a limbického systému (LS). Druhý okruh zahrnuje spojení kortex - striatum (str.) - globus pallidus (GP) – talamus - kortex. Přerušovanou čarou jsou znázorněny dopaminergní projekce z ventrálního tegmenta (VTA) do neokortexu a hipokampu (a dalších limbických oblastí). Nigrostriatální projekce probíhá od s. nigra do GABA interneuronů striata (adaptováno podle Konradi a Heckers, 2001).

1.2.1. Antipsychotika první generace

Hlavním mechanismem účinku antipsychotik první generace je blokáda D2/D3 receptorů mezokortikální, mezolimbické, nigrostriatální a tuberoinfundibulární oblasti, současná blokáda presynaptických dopaminových D2/D3 zakončení a po přibližně 12 týdnech depolarizační blokáda dopaminového systému (Švestka, 2002). Blokáda receptorů v mezolimbické a mezokortikální oblasti je odpovědná za odstranění pozitivních schizofrenních symptomů. To je ovšem provázeno řadou nežádoucích účinků jako jsou extrapyramidové syndromy (blokáda nigrostriatálního systému). K projevům patří: parkinsonismus, akutní dystonie, tardivní dyskineze a akatizie, hyperprolaktinémie (blokáda tuberoinfundibulárního systému), nadměrná sedace (blokáda histaminových H1 receptorů), posturální hypotenze, pokles libida, poruchy erekce, hypobulie, apatie (blokáda adrenergických α 1 receptorů), zvýšená hmotnost (blokáda H1 receptorů), suchost sliznic, poruchy akomodace, poruchy paměti a sinusová tachykardie, fotosenzitivita, alergie, snížení záchvatové prahu s rizikem výskytu epileptických záchvatů a neuroleptický maligní syndrom.

Antipsychotika první generace nejsou dostatečně účinná v terapii negativních a kognitivních schizofrenních symptomů a mohou onemocnění dokonce zhoršovat (Lewander, 1994). 30-50 % pacientů s pozitivními schizofrenními symptomy se po podání těchto antipsychotik téměř nezlepší (Kane et al., 1993). Příkladem antipsychotik první generace jsou chlorpromazin a haloperidol.

V dostupných modelech schizofrenii podobnému chování haloperidol (zástupce antipsychotik 1. generace) potlačuje zvýšenou lokomoci, která je na základě aktivace mesolimbického dopaminergního systému považována za model pozitivních příznaků (Van den Buuse, 2010). Nízké dávky (0.1 mg/kg) haloperidolu snižují lokomoci, a to jak samostatně, tak v kombinaci s nízkou dávkou parciálního agonisty 5-HT_{1A} receptorů tandospironu. 5-HT_{1A} agonisté zlepšují haloperidolem způsobenou katalepsií (Ohno et al., 2008, 2009). Vysoké dávky tandospironu působí proti haloperidolem indukované hypolokomoci (Bubenikova-Valesova et al., 2010).

Naopak v modelech kognitivního deficitu a negativních symptomů je haloperidol i ve vysokých dávkách neúčinný. Haloperidol nemá vliv na poškození prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI) indukované 5-HT_{1A} agonisty (Van den Buuse a Gogos 2007). Hlavním vedlejším účinkem je EPS až katatonie (Egan et al., 1996).

1.2.2. Antipsychotika druhé generace

Antipsychotika druhé generace, jako například amisulprid, klozapin, olanzapin, quetiapin, risperidon, sertindol, sulpirid, se navzájem liší farmakodynamickými parametry a spektrem nežádoucích účinků. Antipsychotika druhé generace mají několik výhod oproti antipsychotikům generace první, a to především schopnost působit i u farmakorezistentních pacientů, jsou účinnější v léčbě negativních symptomů a kognitivního deficitu a také v prevenci relapsu (Leucht et al., 2003). Nižší je také riziko rozvoje tarditivních dyskinez a extrapyramidového syndromu. Jejich podání obvykle nevede ke klinicky významnému zvýšení prolaktinu. Antipsychotika druhé generace mají ale také bohužel několik vedlejších účinků jako je nárůst hmotnosti (Wetterling et al., 1999) a také diabetes mellitus 2. typu (Zimmermann et al., 2003). Atypická antipsychotika jsou z klinického hlediska definována parametry efektivity, průběhem léčby a mírou bezpečnosti (Remington 2003).

I léčba antipsychotiky 2. generace je spojena s některými nežádoucími účinky, jako je například nárůst hmotnosti (Newcomer, 2007). Sledování nárůstu hmotnosti po podání olanzapinu a klozapinu bylo potvrzeno i ve zvířecích studiích. Akutní injekce olanzapinu způsobuje u samců potkanů hyperfágii. Ziprasidon hyperfágii nezpůsobil. Chronická perorální léčba olanzapinem, nikoli ziprasidinem, zvyšuje tělesnou hmotnost a příjem potravy u samců potkanů. I z klinických meta-analýz vyplývá, že olanzapin má nejvyšší a ziprasidon má nejnižší odpovědnost za zvyšování tělesné hmotnosti (Allison, et al., 1999; Leucht et al., 2009). Antipsychotika 2. generace také snižují typický kroužící pohyb chakragati myší (Torres et al., 2004; Dawe et al., 2010); (viz kapitola Genetické modely).

Olanzapin narušuje prostorovou orientaci a paměť u naivních myší, kdežto u sertidolu a klozapinu poškození prokázáno nebylo (Mutlu et al., 2011). MK-801 indukované poškození učení a paměti se zlepšilo po podání olanzapinu, sertidolu a klozapinu, což znamená, že tyto léky mají kladný účinek i na kognitivní příznaky schizofrenie (Mutlu et al., 2011). Haloperidol a risperidon v dávkách určených k léčbě psychózy poškozují kognitivní funkce, kdežto u klozapinu žádné poškození kognitivních funkcí zaznamenáno nebylo (Skarsfeldt, 1996; Arnt a Skarsfeldt, 1998; Didriksen et al., 2006). Haloperidol také narušuje výkon potkanů ve vodním bludišti (Skarsfeldt, 1996). Většina studií ukazuje, že atypická antipsychotika zlepšují

kognitivní funkce (Stip et al., 2003), ale existují i studie, které toto nepotvrzují (Mortimer, 1997).

Z výše uvedeného vyplývá opodstatněná snaha hledání nových léčiv na schizofrenní onemocnění, která by měla lepší účinnost na pozitivní a negativní příznaky tohoto onemocnění a zároveň způsobovala méně vedlejších účinků. Výsledkem toho by byla i nižší finanční náročnost léčby schizofrenních pacientů.

1.2.3. Atypická antipsychotika a glutamát

V současné době je pro antipsychotický účinek léků důležitá vazba především k dopaminovým a serotoninovým receptorům (Horáček, 2004). Účinek antipsychotik na glutamátergní systém v klinicky používaných dávkách prokázalo několik studií (Heresco-Levy, 2003; Konradi a Heckers, 2003). Antipsychotika první i druhé generace působí na glutamátergní systém přímo jako parciální agonisté glycinového místa NMDA receptoru (Heresco-Levy, 2003). Byl prokázán také nepřímý vliv látek na glutamátergní systém a především na NMDA receptory. Inhibice dopaminových D2 receptorů aktivuje proteinkinázu A, která vede k fosforylaci GluN1 podjednotky NMDA receptoru. Fosforylace GluN1 podjednotky výrazně zvyšuje aktivitu NMDA receptoru (Salter a Kalia, 2004). Antipsychotika také inhibují glutamátový transportér a tím zvyšují extracelulární hladinu glutamátu *in vivo* a právě zvýšená hladina glutamátu po podání haloperidolu ve striatální oblasti může způsobovat rozvoj EPS (Marchese et al., 2002).

Změny exprese podjednotek NMDA receptoru byly měřeny u schizofrenních pacientů *post mortem*, ty ale mohou být způsobeny dlouhodobým užíváním antipsychotik (Kristansen et al., 2007). Laboratoř Pilowskeho v roce 2006 provedla studii pomocí zobrazovacích metod na pacientech se schizofrenií, kteří ještě nebyli medikováni. Studie ukázala, že pacienti měli sníženou denzitu NMDA receptorů v levém hippokampu (Pilowsky et al., 2006).

Předpokládá se, že NMDA receptor je spojen s 5-HT_{1A} receptorem, což by znamenalo, že látky, které ovlivňují tento receptor, budou měnit expresi a vlastnosti NMDA receptoru a budou tedy mít vliv i na kognitivní funkce. Nízká aktivace 5-HT_{1A} receptorů zlepšuje u potkanů kognitivní deficit navozený inhibicí NMDA receptorů. A naopak větší dávky agonistů 5-HT_{1A} receptorů zhoršují schizofrenii podobné chování (Bubeníková-Valešová et al., 2007). Tyto rozdílné účinky nízké a vysoké dávky agonisty 5-HT_{1A} receptorů se dají vysvětlit odlišnými vlastnostmi 5-HT_{1A}

autoreceptorů a postsynaptických receptorů. Předpokládá se, že vysoká dávka agonisty 5-HT_{1A} receptorů aktivuje oba typy receptorů, převáží aktivace postsynaptických 5-HT_{1A} receptorů, které inhibují glutamatergní neurony, což má stejný efekt jako blokáce NMDA receptorů – navození schizofrenii podobného chování - proto dochází ke zhoršení psychózy. Podobných výsledků bylo dosaženo i opakovaným podáváním tandospironu. V našich pokusech jsme prokázali, že podávání parciálních agonistů opravdu ovlivňuje expresi podjednotek NMDA receptoru a tudíž by toto mohlo být podkladem pro vývoj nového typu antipsychotika.

1.3. Animální modely schizofrenie

Schizofrenie je klinicky velmi závažné onemocnění, proto snaha o lepší porozumění její neurobiologické podstatě patří k základním úkolům současné psychiatrie. Ve výzkumu schizofrenie a léčebných možností hrají velmi důležitou roli modely této nemoci. Využívají se především animální modely, humánní modely jsou rozvíjeny v posledních dvou desetiletích na zdravých dobrovolnících. Vytvořit funkční animální model schizofrenie je velmi obtížné. U laboratorních zvířat můžeme sledovat některé symptomy lidské psychopatologie pouze pomocí registrace motorického, sociálního projevu nebo se dají sledovat elektrofyziologické aktivity mozku. Podle konstrukce mohou být modely děleny na neurovývojové, genetické a farmakologické. Hodnotí se validita (zda model skutečně modeluje to co má), a to ve třech doménách (Lipska a Weinberger, 2000) - konstrukční, fenomenologické a predikční.

To jaká je schopnost modelu reprodukovat předpokládanou etiopatogenezi nemoci, ukazuje konstrukční validita. Fenomenologická validita vyjadřuje schopnost modelu reprodukovat příznaky onemocnění. U animálních modelů schizofrenie lze hodnotit pouze ty příznaky, které jsou mezidruhové, jako například snížení sociální interakce, stereotypie, atd., (viz. tabulka 6). Predikční validita je dána tím, zda lze modelované příznaky léčit podobnými postupy, jako je tomu u nemoci samé. U schizofrenie tedy hodnotíme odpověď na podávání antipsychotik a model by tedy měl vykazovat shodu mezi výsledkem experimentu a známou klinickou účinností. Pro potřeby této diplomové práce zmíníme podrobně modely, které jsou spojeny s NMDA receptory.

Tabulka 6: Srovnání klinických symptomů schizofrenie a schizofrenii podobného chování indukovaného NMDA antagonistou MK-801 (převzato a pozměněno z Lipska a Weinberger, 2000).

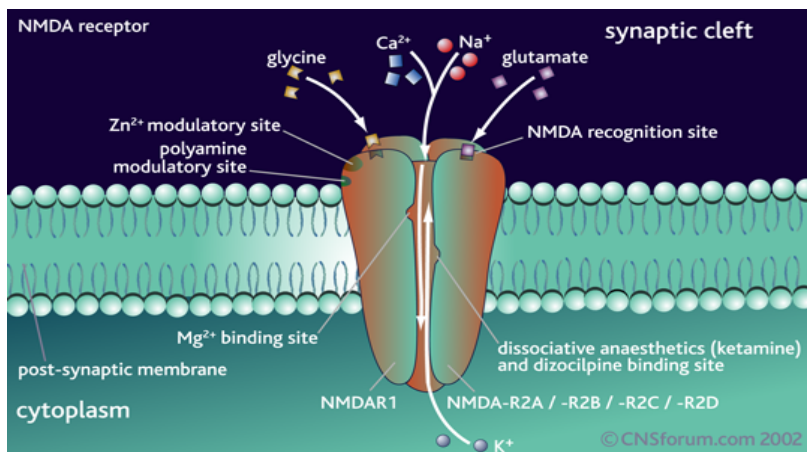
Klinické symptomy schizofrenie	Behaviorální změny v animálních modelech schizofrenie
Psychotické symptomy	Zvýšená pohybová aktivita
Stereotypní chování	Opakování určitého chování-čichání, čištění, kývání hlavou
Zhoršené zvládnání stresu	Změny v lokomoční aktivitě nebo chování navozené stresem
Deficit ve zpracování informací	Deficit v prepulzní inhibici úlekové reakce
Kognitivní deficit	Zhoršení prostorové paměti
Deficit v pozornosti	Deficit v latentní inhibici
Sociální oploštění	Redukce sociálních kontaktů

1.3.1. N-methyl-D-aspartátové receptory a jejich význam v modelování schizofrenie

NMDA receptory jsou difuzně rozloženy v celém mozku a řadí se mezi ionotropní glutamátové receptory spolu s AMPA (Q) receptory (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazol-4-propionová kyselina) a KA receptory (kainátové receptory, kyselina kainová). Druhou velkou rodinou glutamátových receptorů jsou metabotropní receptory – membránové receptory spřažené s G-proteinem. Ionotropní glutamátové receptory (iGluR) jsou pentamery, složené z různých podjednotek, výčet je uveden v tabulce 7. Uvnitř každé receptorové rodiny panuje až 80 % homologie, mezi jednotlivými rodinami pak homologie zhruba 50 %. Schématické znázornění topologie podjednotky iGluR je na obrázku 3.

Tabulka 7: Přehled ionotropních glutamátových receptorů a jejich podjednotek

Receptorová rodina	Podjednotky	Gen
AMPA	GluR1 GluR3	GRIA1 GRIA3
	GluR2 GluR4	GRIA2 GRIA4
Kainátové	GluR5 GluR6	GRIK1 GRIK2
	GluR7 KA-1	GRIK3 GRIK4
	KA-2	GRIK5
NMDA	GluN1	GRIN1
	GluN2A GluN2B	GRIN2A GRIN2B
	GluN2C GluN2D	GRIN2C GRIN2D
	GluN3A GluN3B	GRIN3A GRIN3B



Obrázek 3: Struktura NMDA receptoru, molekulární struktura NMDA receptoru, (CNSforum.com 2002).

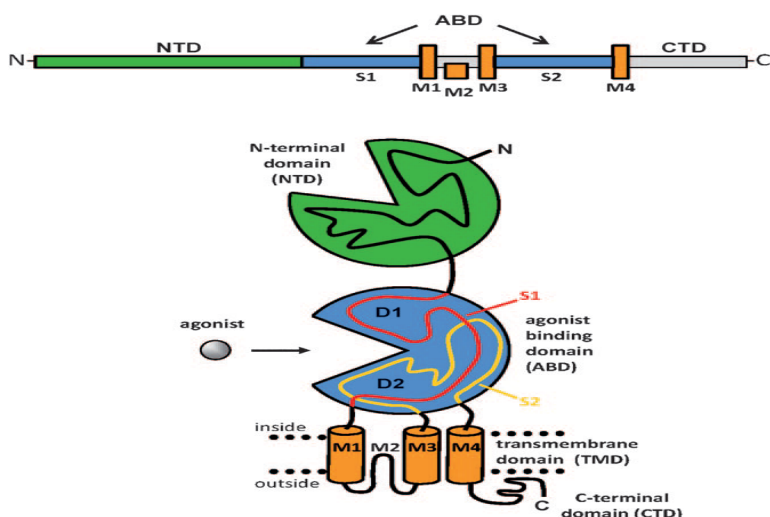
Ionotropní NMDA receptory jsou transmembránové ligandem řízené iontové kanály, které pro své otevření vyžadují, aby se dva agonisté glycin (Gly) a glutamát (Glu) navázaly na extracelulární doménu receptoru (Johnson et al., 1987; Kleckner et al., 1988), (viz. obrázek 4). Vtok iontů je zahájen, jen pokud jsou všechna vazebná místa obsazena agonisty. Samotný Gly ani samotný Glu kanál NMDA receptoru neotevře. Význam tohoto jevu není úplně znám, neboť normální fyziologické koncentrace glycinu by měly být saturační. Nicméně hladina glycinu může být regulována inhibitory. Cykloserin (původně užívaný jako antituberkulotikum) je slabý parciální agonista glycinového vazebného místa, může zesilovat účinek antipsychotických farmak u pacientů se schizofrenií (Goff et al., 1995).

Jiným farmakologickým cílem je vazebné místo pro Mg^{2+} nebo jeho těsné sousedství. Sem se váží látky jako fencyklidin (PCP) a příbuzná farmaka jako MK801 nebo ketamin (cyklohexylaminová anestetika). Ve vyšších dávkách působí jako disociativní anestetika. Mnohé z nich se používají jen veterinárně, i když třeba ketamin je oblíben pediatry – děti nejsou tolik náchylné k vedlejším efektům psychotického typu. V nízkých koncentracích působí psychotomimeticky a navozují kognitivní poruchy (halucinace, iluze) podobné některých symptomům schizofrenie, proto se také pro modelování schizofrenie používají. Působí jako nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů, váží se pouze na otevřené kanály (Anis et al., 1983). Afinita jednotlivých látek k NMDA receptoru je uvedena v tabulce 8.

Tabulka 8: Afinita vybraných antipsychotik k NMDA receptoru, provedeno na experimentu terčíkového zámku za využití [³H](+)-MK-801, na neuronálních kulturách in vitro, (Parsons et al., 1995)

Látka	Binding K _i (μM)
Memantin	0.70 ± 0,11
MK-801	0,0026 ± 0,0002
Ketamin	0,2 ± 0,02
PCP	0.5 ± 0,10

Byly identifikovány dvě hlavní rodiny NMDA receptorových podjednotek (GluN1 a GluN2) a jedna malá rodina modulačních podjednotek označovaných jako GluN3 (A-B) podjednotky. Většina funkčních NMDA receptorů v dospělém savčím mozku je tvořena 4 podjednotkami, které v drtivé většině pravděpodobně existují jako GluN1-GluN2 (A-D) heterotetramery. GluN3 podjednotky jsou exprimovány zejména ve vyvíjejícím se CNS (Ozawa et al., 1998; Stephenson, 2001). V prefrontálním kortexu a hipokampu je v NMDA receptoru zastoupena hlavně podjednotka GluN2A nebo GluN2B (Sheng et al., 1994; Law et al., 2003). Při hodnotě membránového potenciálu nižší než cca -50 mV je koncentrace iontů hořčíku (Mg²⁺) dostatečně vysoká na to, aby dokázala i v přítomnosti glutamátu nebo aspartátu potlačit tok iontů NMDA receptorem. Při vstupu Mg²⁺ do póru kanálu ztrácí ion pomalu svůj hydratační obal a jeho další postup je omezen. Mg²⁺ se rychle pohybuje z/do otevřeného kanálu a způsobuje rychlé krátké inhibice toků proudů. Pro nutnost depolarizace (ideálně alespoň o 30 mV) bývají NMDA receptory někdy označovány také jako hybridní kanály (nestačí jim jen ligand). Aktivace NMDA receptorů vede k nespecifickým tokům Na⁺ a K⁺, oproti AMPA a KA receptorům je však NMDA receptor vysoce propustný pro Ca²⁺. Permeabilita NMDA receptorů pro Ca²⁺ je asi 10× vyšší než pro Na⁺. Příliv Ca²⁺ přes NMDA receptor spouští kaskádu intracelulárních dějů, které regulují mnoho typů neuroplasticity (Greer a Greenberg, 2008; Wayman et al., 2008) včetně synaptické plasticity, množství a uspořádání dendritů a zpracování synaptogeneze.



Obrázek 4: Lineární zobrazení aminokyselinové sekvence podjednotky ionotropního glutamátového receptoru (iGluR); (nahore), a schématické znázornění topologie podjednotky iGluR (dole). Všechny podjednotky iGluR se skládají ze dvou velkých extracelulárních domén - N-terminální doména (NTD, zelená) a agonistu vázající domény (ABD, modrá). Každá podjednotka v tetramerickém iGluR zasahuje do centrálního póru iontového kanálu přes transmembránovou doménu (TMD, oranžová), ta obsahuje tři helixy (M1, M3, M4) a smyčku M2, která spojuje helix M1 s helixem M3. C-terminální doména (CTD) se nachází na intracelulární straně membrány. Agonistu vázající doména je složena ze dvou segmentů aminokyselin (S1 a S2). Agonisté se navazují do mezery vytvořené mezi dvěma laloky (D1 a D2) agonistu vázající domény. Agonista indukuje uzavření mezery v agonistu vázající doméně, což je počáteční konformační změna, která vede spuštění aktivace receptoru a otevření centrálního iontového kanálu, (převzato z Risgaard et al., 2010).

1.3.2. Humánní modely schizofrenie

V současnosti se používá akutní nebo chronické podávání ketaminu (nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů). Tento model je založen na glutamátergní hypotéze schizofrenie (Javitt a Zukin, 1991; Carlsson et al., 2001). Tato hypotéza předpokládá, že inhibice NMDA receptorů sekundární aktivací mesolimbického dopaminergního systému, vede k psychóze.

Nejvlivnější humánní model schizofrenie je podání subanestetické dávky ketaminu (i.v. 0,5mg/kg, během 20-30 min), který je jako jediná z těchto látek registrovaná jako léčivo pro člověka. Ketamin byl syntetizován v roce 1962, na trh byl

uveden jako anestetikum v roce 1970 (White et al., 1982). Účinek ketaminu je zprostředkován nekompetitivním antagonismem glutamátového NMDA receptoru (Anis et al., 1983; Craven, 2007). Ketamin se váže dovnitř kanálu tohoto receptoru, na tzv. vazebné místo pro PCP a touto blokadou zvyšuje hladinu glutamátu v synaptické štěrbině. NMDA receptory se nacházejí na GABAergních inhibičních interneuronech. Blokadou těchto interneuronů ketaminem v předním talamu dochází k excitaci postsynaptických glutamatergních projekčních neuronů, což vede ke zvýšenému uvolňování glutamátu (Moghaddam et al., 1997; Stone, 2009). V poslední době se účinek také přisuzuje stimulaci dopaminových D2 a serotoninových 5-HT2 receptorů (Seeman et al., 2005).

Model, založený na podávání ketaminu vycházející z předpokládané poruchy v glutamatergním systému, která je jednou z nevlivnějších teorií patofyziologie a etiologie schizofrenie (Bubeníková-Valešová et al., 2008). Pro toto svědčí řada nálezů od molekulárních interakcí přes strukturní a klinické nálezy – změny v expresi GluN1 a GluN2 podjednotek NMDA receptorů (Konradi a Heckers, 2003), snížení hladin glutamátu v cerebrospinálním moku, hipokampu a prefrontální kůře a vyšší výskyt polymorfizmů genů, které souvisejí s glutamatergním systémem u nemocných schizofrenií. Tento model splňuje také fenomenologickou validitu, u dobrovolníků vede podání ketaminu ke krátkodobé indukci pozitivní (převážně vizuální halucinace), negativní (oploštění afektivity, zpomalené psychomotorické tempo, obtížnosti v soustředění a interpersonální komunikaci) a kognitivní symptomatiky (deficit v deklarativní, verbální, nonverbální pracovní paměti a prostorové paměti (Krystal et al., 1994; Adler et al., 1999; Krystal et al., 1999; Parwani, 2005; Stefanovic et al., 2009). U schizofrenních pacientů pak ketamin exacerbuje psychotické symptomy, které pacienti přirovnali k vlastní akutní psychóze (Lahti et al., 1995; 2001). Zobrazovací studie s ketaminem ukazují, že podání ketaminu vede k metabolické hyperaktivitě ve frontální oblasti mozku, cingulu a talamu (Vollenweider et al., 1997; Langsjo et al., 2003).

Modelování schizofrenie ketaminem vykazuje vysokou konstrukční, fenomenologickou a částečně také predikční validitu.

1.3.3. Animální modely schizofrenie

Zvířecí modely schizofrenie můžeme rozdělit na neurovývojové, genetické a farmakologické.

1.3.3.1 Neurovývojové modely

Jsou modely založené na experimentálním narušení vývoje mozku, které vede ke změně funkce mozku i chování subjektu. Schizofrenie obvykle nastupuje kolem 20. roku života, neurovývojově modelované změny v chování by se tedy měly projevit až v časně dospělosti zvířete (Lipska a Weinberger, 2000). Nálezy z *post mortem* studií - variace v korové buněčné architektuře pravděpodobně vývojové povahy (Akbarian et al., 1993; Kirkpatrick et al., 1999; Lodge a Grace, 2009) – inspirovaly vznik zvířecích modelů s porušenou neurogenezí například Vohs et al., 2009. Tyto modely vycházejí z představy, že specifické prenatální poruchy buněčné maturace vedou k relevantním biologickým změnám a ke změnám chování v době, kdy zvíře dosáhne zralosti.

Neurovývojový model schizofrenie založený na inhibici NMDA receptoru má základ v práci Ikonomidou a kolektivu z roku 1999. Uvádí, že podání antagonistů NMDA receptorů dizocilpinu (MK-801) a fencyklidinu (PCP) plodu v pozdní fázi prenatálního vývoje nebo v časném postnatálním období potkana zvýší neuronální smrt apoptózou (Ikonomidou et al., 1999). Naopak, podáním těchto látek potkanům v dospělém věku, se zvýší poškození neuronální tkáně způsobené nekrózou s následnou gliózou (Olney et al., 1991). Zvýšená apoptóza neuronů po systémovém akutním a chronickém podávání PCP, ketaminu nebo MK-801 v časném postnatálním období (mezi 7 a 11 dnem života), bylo potvrzeno ve všech studiích, které byly provedeny na zvířatech (Ikonomidou et al., 1999; Harris et al., 2003; Fredriksson et al., 2004; Stefani a Moghaddam, 2005).

V souladu s neurovývojovou hypotézou podávání antagonistů NMDA receptorů v časném postnatálním období mění chování potkanů v dospělosti. Behaviorální projevy u potkanů, které jsou spojeny s příznaky a neurobiologickými ukazateli schizofrenie, zahrnují čtyři hlavní oblasti: hyperlokomoci, stereotypie, deficit ve zpracování informací, zhoršení kognitivních funkcí - pracovní paměť a pozornost (Honey et al., 2008), a zhoršenou sociální interakci (Lipska a Weinberger, 2000; Morgan et al., 2010). Zhoršení kognitivních funkcí je v současnosti považováno za

primární a přetrvávající projev u pacientů se schizofrenií (Andreasen et al., 1999). Inhibice NMDA receptoru v časném postnatálním období vede k poruše pracovní a referenční paměti v Morrisově vodním bludišti u dospělých potkanů (Gorter a de Bruin, 1992; Sircar a Rudy, 1998; Sircar, 2003; Stefani a Moghaddam, 2005). Některé studie ukázaly změny v prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI) u dospělých potkanů (Takahashi et al., 2007). Jiné studie ovšem tuto změnu v PPI neprokázaly (Stefani a Moghaddam, 2005; Rasmussen et al., 2007). Na základě hyperdopaminergního stavu mesolimbického systému, může být hyperlokomoce u potkanů v korelaci s pozitivními symptomy schizofrenie (McCullough a Salamone, 1992; Lipska a Weinberger, 2000). Některé z dalších studií (Stefani a Moghaddam, 2005) hyperlokomoci po podání antagonistů NMDA receptorů neprokázaly.

Platnost neurovývojového modelu je podpořena epidemiologickými studiiemi o prenatálních, časných vývojových a behaviorálních faktorech spjatých s nemocí, dále pak studiiemi dětské schizofrenie (Nicolson et al., 2000) a nálezy molekulárních markerů abnormálního korového vývoje ve tkáních schizofrenních mozků, (Lewis a Levitt, 2002) či nálezy abnormit na molekulární úrovni, modelované v animálních studiích.

1.3.3.2 Genetické modely

Genetické modely jsou založené na použití transgenních zvířat (s cíleně odejmutým nebo nefunkčním genem), eventuálně na selekci kmenů s určitým chováním. U transgenních modelů se používají mutace genů s předpokládanou rolí v patologii schizofrenie – dopaminové receptory, dopaminový transportér (s úplně vyřazeným - DAT-KO myši (Giros et al., 1996), nebo s omezenou funkčností - DAT-KD myši (Zhuang et al., 2001), serotoninový transportér SERT-KO (Sora et al., 2001), různé části glutamatergního systému atd. Vzhledem k významné úloze NMDA receptoru v etiopatogenezi schizofrenie jsme se zaměřili na genetické modely založené na vyřazení určitých podjednotek NMDA receptoru.

U schizofrenie byl prokázán změněný přenos glutamátu, což podporuje roli NMDA receptorů jako zprostředkovatele neurotransmise. To vedlo k formulaci obecné glutamátové hypofunkční hypotézy této nemoci (Lindsley et al., 2006). Byly provedeny studie, kde byla snížena exprese GluN1 podjednotky NMDA receptoru u myši na 5-10 % původní úrovně. Takto modifikované myši vykazovaly chování

obdobné u schizofrenie: zvýšenou pohybovou aktivitu, sníženou metabolickou aktivitu (autoradiografické měření příjmu ^{14}C -2 deoxyglukosy) v oblasti mediální prefrontální kůry, anteriálního cingula a hippocampu (Duncan et al., 2002), snížení sociální interakce (Mohn et al., 1999; Duncan et al., 2004) a snížení PPI (Duncan et al., 2004, 2006; Powell et al., 2009). Porucha funkce NMDA receptoru vyřazením funkčně nezbytné GluN1 podjednotky, v kortikálních interneuronech během časného vývojového období, vyplývající z epigenetické nebo genetické změny NMDA receptoru nebo ovlivněním navazující signální kaskády, vede k abnormálnímu kortikálnímu zrání a zvýšení náchylnosti k psychiatrickému onemocnění v dospívání (Belforte et al., 2010). Myši s úplným vypuštěním genu pro GluN1 podjednotku uhynou hned po narození (Forrest et al., 1994). Dále jsou to modely, kdy je vyřazena GluN2A nebo GluN2B podjednotka NMDA receptoru. Právě abnormality v regulaci GluN2B podjednotky NMDA receptoru významně ovlivňují učení a paměť u schizofrenie (Loftis a Janowsky, 2003). GluN2B asociuje s mikrotubulárním komplexem, který se skládá z APBA1/Mint1/X11, CASK/Lin2 a Lin7 (A-C) / Veli (1-3) proteinů a s mikrotubuly asociující ATPáza, KIF17 (Setou et al., 2000). Tento komplex je nezbytný pro transport GluN2B podjednotky do NMDA receptoru (Guillaud et al., 2003; Yuen et al., 2005; Guillaud et al., 2008). Důležitost GluN2B podjednotky NMDA receptoru, ve spojitosti s regulací vyšších kognitivních funkcí podporuje studie Wonga a spolupracovníků z roku 2002, dokazuje, že zvýšená exprese KIF17 u transgenních myší je spojena se zvýšenou expresí GluN2B, což vede ke zlepšení prostorové a pracovní paměti (Wong et al., 2002).

Dále se používají modely, které testují zapojení genů do etiopatogeneze schizofrenie. Stejně jako u schizofrenie, byly vyvinuty myší modely s posílenou vazbou NRG1-ErbB4, tyto myši mají stejný fenotyp jako nemocní schizofrenií - narušení PPI, hyperaktivitu strukturální abnormality mozku - rozšíření postranní komory (Jaaro-Peled et al., 2010). Akt1 KO myši potvrzují zapojení této kinázy do etiologie schizofrenie (Balu et al., 2010; Balu a Coyle, 2011). Myši, kterým chybí Akt1 vykazují chování a neuronální abnormality podobné schizofrenii, jako jsou změna v PPI, poškození pracovní paměti, snížení synaptické plasticity a dendritické hustoty (Desbonnet et al., 2009).

„Chakragati (CKR)“ myš je geneticky modifikované zvíře pro modelování schizofrenie. Ukazuje se, že může sloužit ke zkoumání aplikace antipsychotik pro pacienty se schizofrenií (Dawe a Ratty, 2007). CKR myš je výsledek transgenní

inzerční mutace, v homozygotním stavu takto upravená myš vykazuje abnormální krouživý fenotyp („tančící myši“), (Ratty et al., 1990). Tento fenotyp je spojen se zvýšenou krouživou motorickou aktivitou, která je obdobná u myši po podání antagonistů NMDA receptoru, což způsobuje chování připomínající pozitivní příznaky schizofrenie (Torres et al, 2004). CKR myš také kopíruje další aspekty, které jsou podobné příznakům schizofrenního onemocnění jako například sociální stažení (Torres et al., 2005), změny v PPI (Verma et al., 2008), striální dysfunkce (Braff a Geyer, 1990) a další. Tyto myši tudíž mohou být použity pro modelování některých aspektů schizofrenie (Dawe a Ratty, 2007; Torres et al., 2004, 2005).

Genetické modely hypofunkce NMDA receptorů ukazují konstruktivní platnost modelu a některé z nich také fenomenologickou platnosti. Především pak na významnou roli GluN1 a GluN2B podjednotky v patofyziologii schizofrenie.

1.3.3.3 Farmakologické modely

Dalším přístupem ke studiu schizofrenie jsou farmakologické modely, které vycházejí ze současných znalostí o roli jednotlivých neurotransmiterových systémů. Stejně jako u animálních modelů se používá akutního nebo chronického podávání nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů. Jako nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů se u zvířat užívá PCP, MK-801 a ketamin. Fencyklidin (PCP) je látka původně sloužící jako disociativní anestetikum, jeho použití je však spojeno s řadou nežádoucích účinků a mimo jiné může vyvolat závislost (Baldridge a Bessen, 1990). Podobně jako PCP je dizocilpin (MK-801, syntetizován v roce 1982) původně vyvinut jako neuroprotektivní a antikonvulzivní látka (Olney et al., 1989; Kochhar et al., 1991). Poslední kandidát pro modelování schizofrenie v animálních modelech je stejně jako u lidských modelů ketamin. Tato látka se liší ve svém farmakodynamickém profilu, viz tabulka 7. U hlodavců a opic subanestetická dávka těchto látek působí hyperlokomoci, stereotypní chování, poruchu PPI a zhoršuje sociální chování (Bubeníková-Valešová et al., 2008). Ukazuje se, že opakované podání nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů vede ke specifickým změnám v chování, biochemických a morfologických parametrech v centrální nervové soustavě, které jsou v mnoha ohledech schizofrenii podobné.

Akutní podání NMDA antagonistů způsobuje zvýšení extracelulárních hladin dopaminu i glutamátu v prefrontální kůře a mění aktivitu dopaminergních buněk

v nucleus accumbens (Adams a Moghaddam, 2001). U potkanů vedlo podání subanestetických dávek ketaminu ke zvýšení metabolismu v prefrontální, orbitální a cingulární kůře, hipokampu, talamu a amygdale (Duncan et al., 1998). Lokální aplikace PCP do mediální prefrontální oblasti u potkanů způsobila snížení extracelulární hladiny GABA (Yonezawa et al., 1998), ve striatu měla místní aplikace látky opačný efekt (Lillrank et al., 1994). Po akutním podání antagonistů NMDA receptorů se v subkortikální oblasti zvýšila produkce dopaminu a zvýšil se i poměr DOPAC/dopamin v nucleus accumbens (Hatip-AI-Khatib et al., 2001; Jentsch et al., 1997).

U nemedikovaných pacientů se schizofrenií míra metabolismu glukózy klesla v talamu, frontálním a temporálním laloku (Lehrer et al., 2005). V jiné studii byl u pacientů se schizofrenií, kteří měli pozitivní příznaky prokázán hypermetabolismus ve frontální kůře a talamu, stejně jako ve striatu a temporální kůře (Soyka et al., 2005). Bylo prokázáno, že změny v metabolismu po akutním podání antagonistů NMDA receptorů jsou podobné těm, které se vyskytují u pacientů s akutním psychotickým stavem.

Přílišné změny v neurotransmitterových systémech, které následují po akutní podání antagonistů NMDA receptoru mají za následek změny v chování laboratorních zvířat (myši, potkanů a opice). Studie, které se zabývají problematikou podání antagonistů NMDA receptorů prokázaly zhoršení pracovní paměti, snížila se úroveň PPI, narušena byla sociální interakce, byla zvýšená hyperlokomoce a zvýšila se i stereotypie (Jentsch a Roth, 1999; Zajackowski et al., 2003; Linn et al., 2007). V pokusech na opicích (*Maccaca mulatta*) akutní dávka ketamin zhoršila exekutivní funkce (Stoet a Snyder, 2006), tyto výsledky jsou velmi podobné výsledkům získaných ve studiích s pacienty se schizofrenií (Kravariti et al., 2005).

Chronické podávání antagonistů NMDA receptorů způsobuje pokles extracelulárního glutamátu ve frontální oblasti mozku myši (Zuo et al., 2006). Oproti akutnímu podání antagonistů NMDA receptorů chronické podávání snižuje produkci (poměr DOPAC/dopaminu) a utilizaci (poměr HVA/dopaminu) dopaminu v prefrontální dorzolaterální kůře a prelimbické kůře u potkanů a opic (Jentsch et al. 1997). Podobné změny v glutamatergním a dopaminergním systému byly nalezeny u pacientů se schizofrenií (Kim et al., 1980; Tsai et al., 1995; Breier et al., 1997). Chronická přerušovaná expozice PCP vyvolává snížení využití glukózy ve prefrontální kůře, talamu a auditorním systémem, studie potvrzují podobné změny u

schizofrenie (Lehrer et al., 2005). Několik dalších studií potvrzují zvýšenou hladinu glutaminu v prefrontální kůře, předním cingulu a talamu u pacientů v průběhu první schizofrenní epizody (Bartha et al., 1997; Theberge et al., 2002). Podobné změny v metabolismu glutamátu byly nalezeny ve frontální oblasti potkanů po opakovaném podání MK-801 (Kondziella et al., 2006).

Chronické podávání antagonisty NMDA receptoru snižuje expresi proteinu RGS4 (Gu et al., 2007). Nižší exprese RGS4 byla prokázána ve frontální oblasti pacientů se schizofrenií (Mirnics et al., 2001). Chronické podávání MK-801 zvyšuje expresi mRNA podjednotky GluN2B a GluN1 NMDA receptoru v hipokampu u potkanů (Rujescu et al., 2006) a snižuje expresi GluN2A podjednotky (Oh et al., 2001; Rujescu et al., 2006). U potkanů nebyly sledovány žádné významné změny v úrovni exprese podjednotek NMDA receptoru (GluN1, GluN2A nebo GluN2B) po různě dlouhé aplikaci PCP (Gu et al., 2007).

Výše uvedené změny neurotransmitterových systémů po dlouhodobém podávání antagonistů NMDA receptorů jsou spojené se změnami v chování. Snížení kognitivních funkcí a zpracování informací po chronickém podání antagonistů NMDA receptorů byly prokázány v několika studiích u různých druhů zvířat (Schulz et al., 2001; Stefani a Moghaddam, 2005; Vales et al., 2006).

V animálních studiích ketamin v subanestických dávkách vykazoval podobnou afinitu jak k NMDA receptorům, tak k vysoko-afinitnímu stavu dopaminových D2 (D2 high) a serotoninových 5-HT2 (5-HT2 high) receptorů (Kapur et al., 2002). Vazba ketaminu na dopaminové D2 high receptory je přibližně stejná jako jeho schopnost blokovat NMDA receptory (Seeman et al., 2008). Kromě přímého vlivu na receptory, subanestetický ketamin akutně zvyšuje vyplavování dopaminu a serotoninu v různých oblastech mozku potkanů, především v prefrontálním kortexu (Verma a Moghaddam, 1996; Lindefors et al., 1997). Mechanismus účinku subanestických dávek ketaminu se vysvětluje jeho inhibičním působením na inhibiční dopaminergní a serotoninergní dráhy, které vedou zejména ze striata. Tím se ruší inhibiční vliv na talamus. Talamus, jako regulátor sensorických a kognitivních informací, je zahlcen vstupem těchto serotoninergních a dopaminergních drah, což následně vede k neschopnosti tyto informace filtrovat. Tento mechanismus se přirovnává k možnému mechanismu vzniku psychózy (Vollenweider a Geyer, 2001).

V animálních modelech agonisté dopaminových a serotoninových receptorů vyvolávají příznaky podobné pozitivním symptomům schizofrenie. Naproti tomu

subanestetické dávky ketaminu napodobují kromě pozitivních i negativní a kognitivní symptomy (Becker a Grecksch, 2004). Negativní a kognitivní příznaky jsou nejspíše způsobené přímým ovlivněním (blokádu) NMDA receptorů. V animálních modelech se projevují např. sníženou sociální interakcí (Becker et al., 2004) a deficitem kognitivních funkcí v různých parametrech (prostorové učení, ukládání a kódování nových informací, konsolidace paměťové stopy), (Alessandri et al., 1989; Stuchlík a valeš, 2005; Bubeníková-Valešová et al., 2008; Pitsikas et al., 2008). V animálních modelech ketaminem indukované zvýšení extracelulárních hladin glutamátu ve striatu (Bustos et al., 1992) a v mediální prefrontální kůře (Moghaddam et al., 1997) taktéž odpovídá glutamátergní hypotéze schizofrenie.

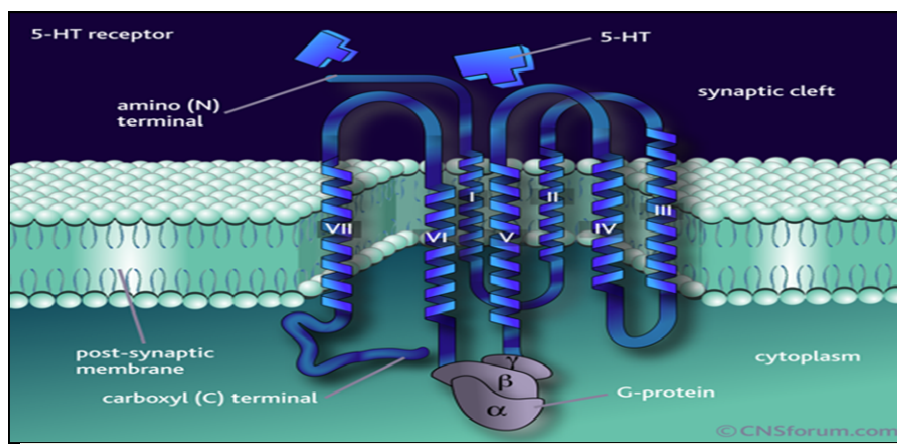
Vzhledem ke své časové nenáročnosti je tento model často používán pro testování účinnosti látek s potenciálním antipsychotickým účinkem (Bubeníková et al., 2005; Large, 2007). Animální modely schizofrenie založené na dlouhodobém podávání antagonistů NMDA receptorů vykazují konstruktivní a fenomenologickou validitu. Změny v neurotransmitterových systémech vykazují podobné symptomy, které se vyskytují u pacientů se schizofrenií. Antagonisté NMDA receptorů způsobují kognitivní dysfunkce, a to zejména v pracovní paměti a pozornosti, i to podporuje platnost tohoto modelu jako vhodného k výzkumu schizofrenie. Tyto modely mají velmi dobrou predikční validitu a lze je úspěšně využít pro testování nových antipsychotik (Bubeníková et al., 2005).

2.4. Serotoninový 1 A receptor v léčbě a patofyziologii schizofrenie

2.4.1. 5-HT_{1A} receptor – struktura, funkce, umístění

Serotonin (5-hydroxytryptamin; 5-HT) byl objeven před 50 lety. V dnešní době je tento neurotransmitter spojován s řadou psychiatrických onemocnění, jako je úzkost, migréna, deprese, schizofrenie a demence. Serotonin se syntetizuje z aminokyseliny tryptofan. Serotonergní neurony se nacházejí v rafeálních jádrech, axony těchto neuronů jsou projektovány do dalších oblastí mozku jako je mozková kůra, limbická oblast, bazální ganglia, diencefalon a mícha. V centrální nervové soustavě existuje sedm rodin (5-HT₁ až 5-HT₇) serotoninových neuronů zahrnujících 14 typů receptorů (5-HT_{1A/1B/1D/1E/1F}, 5-HT_{2A/2B/2C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A/5B}, 5-HT₆, a 5-HT₇), mimo 5-HT₃ receptory jsou ostatní G-proteiny řízené receptory (Roth, 1994). 5-HT_{1A}, 5HT_{1B} a 5-HT_{1D} jsou současně i autoreceptory umístěny

somatodendriticky (Hoyer et al., 2002). Molekulární struktura 5-HT_{1A} receptoru je vidět na obrázku 5.



Obrázek 5: Struktura 5-HT_{1A} receptoru, molekulární struktura 5-HT_{1A} receptoru (CNSforum.com).

5-HT_{1A} receptory jsou převážně exprimovány v limbické oblasti (hipokampus, amygdala, a laterální septum) a rafeálních jádrech (Pucadyil et al., 2005). Na střední až nízké úrovni jsou 5-HT_{1A} receptory exprimovány i v talamu, hypotalamu a striatu (Pucadyil et al., 2005). 5-HT_{1A} receptory fungují jako presynaptické autoreceptory a jako postsynaptické receptory. 5-HT_{1A} receptor je většinou spojen s G_i proteinem (viz.obrázek 6) a snižuje aktivitu adenylcyklázy. Tyto receptory se postsynapticky vyskytují v limbickém systému, kůře a jsou umístěny jak na korových pyramidových neuronech, tak na pyramidových a granulárních neuronech hipokampu (Barnes a Sharp, 1999; Palchadhuri a Flugge, 2005). Aktivace těchto receptorů vede přes G-proteiny k inhibici produkce cAMP a tím snižuje aktivitu pyramidových buněk a výdej glutamátu (Araneda a Andrade, 1991). Naopak, 5-HT_{1A} receptory v rafeálních jádrech jsou umístěny somatodendriticky, kde fungují jako autoreceptory, které negativně regulují svou vlastní činnost a tím udávají celkový charakter serotonergní neurotransmise (Blier a Ward, 2003). Pravděpodobně nejsou spojeny s adenylátcyklázou, ale s K⁺ kanálem přes G-protein (Aghajanian a Lakoski, 1984). Aktivace těchto receptorů vede k hyperpolarizaci, ke snížení frekvence akčních potenciálů a uvolňování serotoninu v projekčních oblastech (Adell et al., 2002).

Předpokládá se, že behaviorální projevy zprostředkované 5-HT_{1A} receptory se liší podle toho, jestli jsou aktivované autoreceptory nebo postsynaptické receptory. Aktivace postsynaptických 5-HT_{1A} receptorů způsobuje serotoninový syndrom (Tricklebank et al., 1985). Naopak chronická aktivace autoreceptorů parciálními

agonisty (buspiron, tandospiron atd.) má anxiolytické účinky (Den Boer et al., 2000). Navíc, aktivace 5-HT_{1A} receptorů snižuje aktivitu glutamátových ionotropních NMDA receptorů, pravděpodobně přes regulační protein G-proteinové signalizace RGS4. Jak RGS4, tak NMDA receptor a s ním spojené proteiny hrají důležitou roli v patofyziologii schizofrenie.

2.4.2. 5-HT_{1A} receptory a schizofrenie

Serotoninergní systém hraje významnou roli v regulaci různých fyziologických funkcí, včetně psychoemocionálních, autonomních, sensorických a motorických funkcí (Roth, 1994). U pacientů se schizofrenií byla, *post mortem*, zjištěna zvýšená hustota 5-HT_{1A} receptorů v mozku (Hashimoto a Goromaru, 1991; Joyce et al., 1993; Burnet et al., 1997; Meltzer et al., 2003). Další studie, která využila pozitronovou emisní tomografii, též potvrdila zvýšenou denzitu 5-HT_{1A} receptorů u pacientů se schizofrenií (Tauscher et al., 2002). Ovšem, existují i studie, které toto zvýšení nepotvrdily, (Dean et al., 1999; Dean, 2003; Cruz et al., 2004). Tyto nesrovnalosti mohou být částečně způsobeny heterogenitou v kohortách schizofrenní pacientů, změnami metodiky nebo rozdíly ve velikosti vzorků. Konkrétně byla identifikována vysoko afinitní [3H] 8-OH-DPAT vazebná místa, která odpovídají 5-HT_{1A} receptoru spojeného s G-proteiny v prefrontální kůře u pacientů se schizofrenií. U pacientů se schizofrenií bylo nalezeno 80 % zvýšení vysoko afinitního vazebného místa (Sumiyoshi et al., 1996). Výše uvedené výsledky nebyly ovlivněny léčbou antipsychotiky (Hashimoto et al., 1991; Tauscher et al., 2002). Zvýšení hustoty 5-HT_{1A} receptorů může představovat sekundární regulační mechanismus, který snižuje stimulaci 5-HT_{1A} receptorů (Hashimoto et al., 1991; Sumiyoshi et al., 1996).

2.4.3. 5-HT_{1A} receptor v léčbě schizofrenie

Předpokládá se, že léčba založená na ovlivnění 5-HT_{1A} receptorů bude přínosem pro pacienty se schizofrenií, především v oblasti zlepšení EPS (Neal-Beliveau et al., 1993; Prinssen et al., 2002; Ohno et al., 2008), úzkosti a deprese (Blier a Ward, 2003; Akimova et al., 2009) a kognitivních funkcí (Sumiyoshi et al., 2001, 2007; Meltzer a Sumiyoshi, 2008; Ogren et al., 2008). Dosavadní antipsychotika používaná v praxi jsou antagonisté D₂ receptorů (Horacek et al.,

2006), což má za následek některé vedlejší nežádoucí účinky jako jsou extrapyramidové syndromy (EPS), které výrazně narušují kvalitu života pacientů.

Rozsáhlé důkazy na hlodavčích modelech naznačují, že aktivace serotoninových 5-HT_{1A} receptorů brání rozvoji EPS, což podporuje dopaminergní neurotransmisi ve frontální kůře, má pozitivní vliv na náladu, zlepšuje kognitivní deficit a sociální interakci (Depoortere et al., 2007). V současnosti jsou na trhu i atypická antipsychotika, která jsou antagonisté 5-HT_{2A} a D₂ receptorů (např. klozapin, risperidon, ziprasidon, perospiron, olanzapin a kvetiapin) a parciální agonisté D₂ receptorů jako je aripiprazol (Ohno et al., 1997; Meltzer et al., 2003). Klozapin, ziprasidon, perospiron a aripiprazol mají také částečné agonistické účinky na 5-HT_{1A} receptory (Meltzer et al., 2003). Tato atypická antipsychotika, na rozdíl od typických, zmírňují pozitivní i negativní příznaky a způsobují i nižší EPS, pravděpodobně tím, že stimulují postsynaptické 5-HT_{1A} receptory, protože inaktivace 5-HT neuronů neovlivnilo snížení EPS prostřednictvím 5-HT_{1A} agonistů (8-OH-DPAT a buspironu), (Mignon a Wolf, 2002; Zazpe et al., 2006; Ohno et al., 2008).

Řada studií ukázala, že selektivní agonisté 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, buspiron a tandospiron) v kombinaci například s haloperidolem zmírňují antipsychotické příznaky (Neal-Beliveau et al., 1993; Ohno et al., 2008), a to pravděpodobně i bez přerušení terapeutického podání antipsychotik (Ohno et al., 2008, 2009). Účinek 5-HT_{1A} agonistů se nezdá být závislý na aktivitě dopaminergních neuronů, protože nebyly pozorovány žádné změny v účinku agonistů 5-HT_{1A} receptorů v oblastech, kde byli dopaminové neurony denervovány (Mignon a Wolf, 2002; Dupre et al., 2008). Toto je podpořeno i výsledkem studie, ve které byly potkanům podávány mikroinjekce 8-OH-DPAT do mozkové kůry nebo do striata a výrazně zmírnily haloperidolem způsobené EPS (Shimizu et al., 2010). I když nelze vyloučit systémové interakce, například farmakokinetické, mezi 5-HT_{1A} receptorovými agonisty a antipsychotiky, je jisté, že 5-HT_{1A} agonisté mohou zmírňovat EPS aktivací postsynaptických 5-HT_{1A} receptorů ve striatu a mozkové kůře, pravděpodobně prostřednictvím non-dopaminergních mechanismů. Ačkoli aktivace 5-HT_{1A} receptorů neovlivnila uvolnění dopaminu ve striatu (Bantick et al., 2005). Několik studií ukázalo, že 5-HT_{1A} agonisté, například osemozotan, zvýšily uvolňování dopaminu v mozkové kůře a hipokampu, což může do jisté míry zlepšovat negativních příznaků schizofrenie (Ago a Matsuda, 2003).

Další důležitou úlohou 5-HT_{1A} receptorů v léčbě schizofrenie je zlepšení kognitivního deficitu (Sumiyoshi et al., 2001, 2007; King et al., 2008). Kognitivní poruchy jsou jedním z hlavních příznaků schizofrenie, u kterých většina ze současných antipsychotik selhává. Nedávné klinické studie prokázaly, že částeční 5-HT_{1A} agonisté jako je tandospiron, významně zlepšují kognitivní deficit u pacientů se schizofrenií (Sumiyoshi et al., 2001, 2007). Plní agonisté 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT) vykazují bifázický účinek na kognitivní funkce, zlepšují je při nízkých dávkách a zhoršují při vysokých dávkách, což je pravděpodobně zprostředkováno stimulací presynaptických a postsynaptických 5-HT_{1A} receptorů (Luttgen et al., 2005; King et al., 2008).

Nová antipsychotika jako je lurasidon, s 5-HT_{1A} antagonistickým (částečné agonistickým) účinkem (Ishibashi et al., 2010), zlepšují učení a paměť poškozenou MK-801 (Ishiyama et al., 2007) a také mají pozitivní vliv na kognitivní funkce u schizofrenních pacientů (Nakamura et al., 2009). Kognitivní zlepšení prostřednictvím 5-HT_{1A} antagonistů (např. WAY-100635) je zprostředkováno postsynaptickými 5-HT_{1A} receptory umístěnými v mediálním septu, kde 5-HT_{1A} receptory tonicky inhibují neuronální aktivitu acetylcholinergních a/nebo glutamatergních neuronů (Jeltsch et al., 2004). Prostřednictvím této disinhibiční negativní regulace, 5-HT_{1A} antagonisté mohou zlepšit činnost septo-hipokampálních/kortikálních acetylcholinergních a/nebo glutamatergních neuronů a tím zlepšují kognitivní funkce. Naopak plní agonisté 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT) zhoršují kognici tím, že inhibují uvolňování glutamátu a acetylcholinu v různých oblastech mozku včetně mozkové kůry (Ogren et al., 2008).

2.5. Interakce serotoninových 1A receptorů s NMDA receptory

Hlavní náplní této diplomové práce bylo ověření interakce mezi 5-HT_{1A} receptory a NMDA receptory a to, jak přes 5-HT_{1A} receptory lze modulovat NMDA receptory. Postsynaptické 5-HT_{1A} receptory se nalézají na dendritech a asociují s dendritickými trny (Kia et al. 1996), v kterých jsou koncentrované glutamátové receptory. To podporuje teorii, že glutamatergní signalizace může být ovlivněna prostřednictvím 5-HT_{1A} receptorů.

Aktivace postsynaptických 5-HT_{1A} receptorů snižuje amplitudu NMDA proudů (Yuen et al., 2005; Gu et al., 2007). Systémové podání nonkompetitivních

antagonistů NMDA receptorů nebo vyřazení NMDA receptorů vyvolává schizofrenii podobné chování (Jentsch a Roth, 1999; Mohn et al., 1999), proto dysfunkce NMDA receptorů je silně svázána s patofyziologií duševních poruch (Tsai a Coyle, 2002; Lindsley et al., 2006). To znamená, že jedním z důležitých cílů by mohly být 5-HT_{1A} receptory, jejichž prostřednictvím je ovlivněna dysregulace NMDA receptorů, glutamátergní přenos a neuronální plasticita.

Serotoninem aktivované 5-HT_{1A} receptory v prefrontálních pyramidálních neuronech tlumí NMDA receptorové iontové proudy pomocí motorových proteinů spojených s transportem NMDA receptorů podél mikrotubulů v dendritech. Inhibice CaMKII (vápník/calmodulin dependentní kináza II) nebo ERKs (extracelulární signál-regulující kináza), které regulují dynamiku mikrotubulů, zabraňují serotoninergní regulaci NMDA receptorů. Vzhledem k rozhodující úloze NMDA signalizace při kontrole synaptické plasticity a neuronální aktivity, by toto mohl být potenciální molekulární a buněčný mechanismus pro 5-HT_{1A} regulaci emocí a kognice v prefrontální kůře.

Aktivace 5-HT_{1A} receptorů snižuje NMDA receptorem zprostředkované iontové a synaptické proudy v pyramidových neuronech prefrontální kůry, cíleně NMDA receptory, obsahující GluN2B podjednotky (Yuen et al., 2005). Aplikace 8-OH-DPAT, agonisty 5-HT_{1A} receptorů, způsobila významné snížení amplitudy NMDA receptorových iontových proudů v akutně izolovaných pyramidových neuronech prefrontální kůry. Aplikace WAY-100635, vysoce selektivního antagonisty 5-HT_{1A} receptorů, zablokovala 5-HT snížením NMDA receptorových proudů (Yuen et al., 2005). NMDA receptory komunikují prostřednictvím přímých specifických interakcí nebo signalizačních kaskád s proteiny postsynaptické denzity (PSD); (Tu et al., 1999; Beresewicz, 2007; Cuthbert et al., 2007). Existují studie naznačující, že rozdíly v interakcích jednotlivých podjednotek s PSD mohou být zapojeny do často protichůdných regulací některých funkcí NMDA receptorů (Iwamoto et al., 2004; Cousins et al., 2008). NMDA receptory nejsou pouze statické struktury v plazmatické membráně, ale podléhají regulovanému transportu na a z povrchu buňky a laterální difúzi (Wenthold et al., 2003; Collingridge et al., 2004). Mechanismem jejich stabilizace by mohla být interakce GluN2B podjednotky a proteinu postsynaptické denzity PSD-95, který je regulován fosforylací (Roche et al., 2001; Chung et al., 2004; Lin et al., 2004). Kromě toho bylo zjištěno, že GluN2A a GluN2B podjednotky

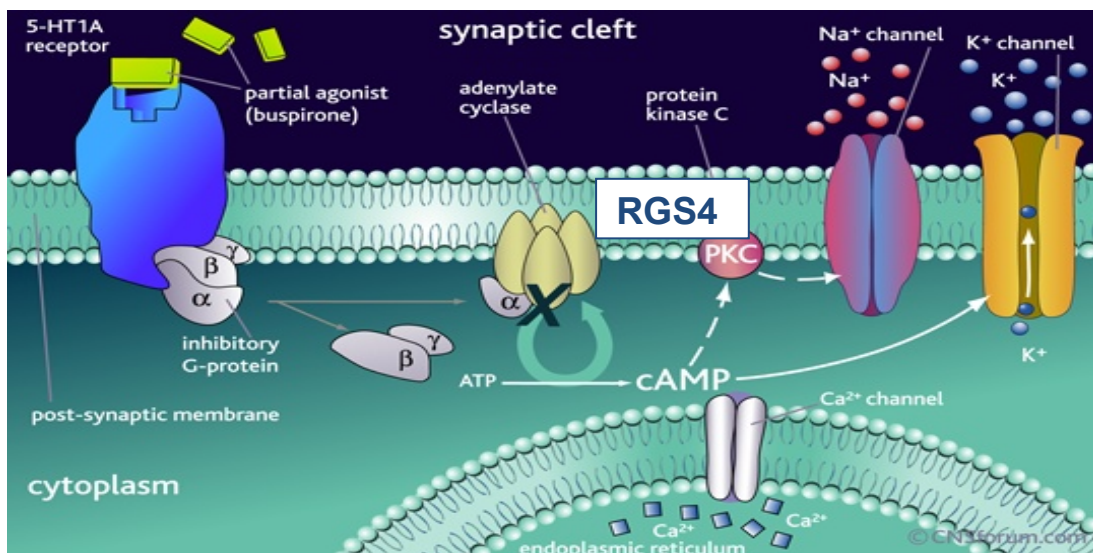
mají odlišné motivy a endocytotické třídění, GluN2B podjednotka prochází více robustní endocytózou než GluN2A podjednotka (Lavezzari et al., 2004).

Transport NMDA receptorů je zprostředkován kinesinovým motorovým proteinem KIF17. Vyřazení KIF17 eliminuje 5-HT_{1A} efekt na NMDA receptorové proudy. 5-HT_{1A} receptory ovlivňují především NMDA receptory obsahující GluN2B podjednotku. KIF17 obsahuje přibližně 30 % GluN2B podjednotek v dendritech (Guillaud et al., 2003). Modulace NMDA receptorů pomocí 5-HT_{1A} receptorů je závislá na integritě mikrotubulární sítě a zahrnuje transport GluN2B podjednotek podél mikrotubulů, které obsahují protein KIF17.

Dalším z možných mechanismů ovlivnění transportu NMDA receptorů prostřednictvím 5-HT_{1A} receptorů je přes Map 2 protein (Map proteiny modulují polymerizaci a stabilizaci mikrotubulů). Aktivace 5-HT_{1A} receptorů mění asociaci Map 2 proteinu s mikrotubuly (Kowalski a Williams, 1993; Dhamodharan a Wadsworth, 1995), což v dendritech vede k inhibici transportu váček podél mikrotubulů. Vzhledem k tomu, Map 2 nabízí možnou souvislost v ovlivnění mezi 5-HT_{1A} receptorem a NMDA receptorem pomocí mikrotubulárního transportu, je fosforylace Map 2, která ovlivňuje schopnost Map 2 vázat a stabilizovat mikrotubuly důležitým mechanismem (Brugg a Matus 1991; Itoh et al., 1997). Map 2 proteiny jsou vysoce fosforylovány in vivo a in vitro několika protein kinázami, včetně CaMKII, ERKs, PKA, PKC (Sanchez et al., 2000). Výsledky studie ukazují, že 5-HT_{1A} modulace iontových proudů NMDA receptorů byla blokována použitím CaMKII inhibitorů. Klasická cesta ovlivnění NMDA receptorů prostřednictvím 5-HT_{1A} receptorů je pomocí Gi/Go proteinů jejichž aktivací dojde k inhibici k adenylátcyklázi a snížení hladiny cAMP (Raymond et al., 1999). Účinek 5-HT_{1A} receptorů na iontové proudy NMDA receptorů byl blokována stimulací PKA. Inhibice PKA by mohla vést k inhibici autofosforylace a autonomní činnosti CaMKII (Ingebritsen a Cohen, 1983; Miller a Kennedy, 1986).

Dalším pravděpodobným mechanismem ovlivnění NMDA receptorů prostřednictvím 5-HT_{1A} receptorů by mohl být protein RGS4 (Regulátor G proteinové signalizace 4); (viz. obrázek 6). RGS4 je jedním z domnělých genů spojených s patofyziologií schizofrenie (viz kapitola 1.1.4). Studie zjistily, že exprese genu RGS4 je trvale snížena v korových oblastech u pacientů se schizofrenií (Mirnics et al., 2001). RGS proteiny fungují jako GTPase-aktivované proteiny negativně regulující G proteinovou signalizační dráhu (Berman et al., 1996; De Vries et al.,

2000). RGS4 moduluje Gi/o a Gq zprostředkovanou signalizaci v transfekovaných buněčných liniích (Ghavami et al., 2004). Negativní působení agonistů 5-HT1A receptorů se vysvětluje interakcí 5-HT1A receptorů s NMDA receptory přes proteiny postsynaptické denzity, včetně regulačního proteinu G-proteinové signalizace RGS4. U neuronů získaných z frontální oblasti potkanů, kterým byl chronicky podáván NMDA antagonista, aktivace 5-HT1A agonistů potenciovala účinek NMDA antagonisty pouze ve skupině neuronů, které měli sníženou expresi proteinu RGS4 (Gu et al., 2007). Protein RGS4 specificky interaguje s α podjednotkou G proteinu a zvyšuje hydrolýzu této podjednotky (Tesmer et al., 1997). Vzhledem k používání antagonistů NMDA receptorů k modelování schizofrenii podobnému chování, mohou mít nálezy týkající se vlivu agonistů 5-HT1A receptorů význam při studiu patofyziologie schizofrenie a při hledání nových látek v léčbě tohoto onemocnění.



Obrázek 6: Interakce 5-HT1A receptoru a NMDA receptoru přes protein RGS4 (CNSforum.com).

2. Cíle práce

1. Cílem diplomové práce byl zjistit, zda glutamátové NMDA receptory interagují se serotoninovými-1A (5-HT1A) receptory jak na molekulární, tak na behaviorální úrovni.

Dílčí cíle:

1. Podání agonistů 5-HT1A receptorů (8-OH-DPAT, tandospiron) vede ke změně exprese podjednotek (GluN1, 2A, 2B) ve frontální kůře a hipokampu (imunoblotting).

2. Podání agonistů 5-HT1A receptorů vede ke změně zpracování informací (Prepulzní inhibice úlekové reakce), paměti (Novel Object Recognition Test) a anxiety (ultrasonická vokalizace).

2. Podání antagonisty NMDA receptoru je používaným modelem schizofrenii-podobného chování s vysokou prediktivní validitou. K ověření teorie, že agonisté 5-HT1A receptoru vykazují antipsychotický profil, jsme sledovali změnu exprese podjednotek (GluN1, 2A, 2B) NMDA receptorů a chování (Prepulzní inhibice úlekové reakce) po souběžné aplikaci antagonisty NMDA receptoru (MK-801) a agonistů 5-HT1A receptoru (8-OH-DPAT, tandospiron).

3. Metody a materiál

3.1. Použité chemikálie a roztoky

Blotovací pufr v 1l: 14,4 g glycin (Bio-Rad, USA)

3 g TRIS (Bio-Rad, USA)

100 ml metanol Chromasolv (Sigma-Aldrich)

Fosfátový pufr 1x v 1l: 100 ml PBS 10x: 80 g NaCl (Penta)

2 g KCl (Lachema, Česká republika)

14,4 g NaHPO₄ (Lachner, Česká republika)

2,4 g K₂HPO₄ (Lachema, Česká republika)

900ml redestilované vody

pH 7,4, měřeno na přístroji Chromservis, Cyberscan

Sodium dodecyl sulfát (SDS) - 1l: 2x BupH TRIS-Glycine SDS Buffer Packs: (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) Thermo Scientific, Genetica,

1000ml redestilované vody

Homogenizační pufr: 121,1 mg Tris (10 mM)

34,8 mg fenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF) 0,2 mM

6,9 µl 2-merkaptoetanol 1mM (MERCK)

5,8 mg kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) 2 mM

10,9 g sacharoza 320 mM

50 µl inhibitory proteáz (Sigma-Aldrich, Česká republika)

pH 7,4 do 100 ml, přístroj Chromservis, Cyberscan

Pufr pro ředění vzorků: 10 % glycerol

2 % sodium dodecyl sulfát (SDS), (Sigma)

5 % 2-merkaptoetanol (MERCK)

63 mM Tris-HCl (pH 6,8)

0,01 % bromfenolová modř (Lachema)

Příprava gelů: 7,5% gel: 2,6 ml 30 % acryl amid

2,6 ml 1,5 M TRIS, pH 8,8

104 μ l 10 % SDS (Sigma)

104 μ l 10 % tetramethyl-ethylen diamin (TEMED), (SERVA)

4,94 ml redestilovaná voda

52 μ l 10 % APS

10,4 ml celkem (2 celá sklíčka)

3.2. Zvířata

Naše experimenty byly prováděny na samcích potkanů kmene Wistar (Velaz, Koleč, Česká republika) o hmotnosti 200–250 g. Potkani byli ustájeni po párech v plastových akváriích ve zvěřinci s regulovanou teplotou (20–22 °C) s pravidelným 12 hodinovým cyklem světlo/tma (rozsvítí v 7:00). Potkani měli neomezený přístup k potravě a vodě. Každý potkan byl testován pouze jednou. Experimenty byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. LF UK a byly provedeny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

3.3. Aplikace látek

Použité dávkování MK-801 vychází z předchozích výzkumů (Bubeníková-Valešová et al., 2007). Antagonista NMDA receptoru MK-801 (Sigma-Aldrich, ČR; Dizocilpine maleate; [5R,10S]-[+]-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine), v dávce 0.1 mg/kg, byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku a byl potkanům injikován intraperitoneálně (i.p.) v objemu 2 ml/kg. Parciální agonista 5-HT_{1A} receptorů tandospiron (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd., Japonsko) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku v objemu 2 ml/kg. Potkanům byl aplikován subkutánně (s.c.) v dávkách 0,05 nebo 5 mg/kg. Plný agonista 5-HT_{1A} receptorů 8-OH-DPAT (Sigma-Aldrich, ČR) byl rozpuštěn ve fyziologickém roztoku. Potkanům byl aplikován s.c. v dávce 0,025 mg/kg nebo 1 mg/kg. Látky pro imunoblotting byly potkanům podávány subchronicky po dobu 4 dnů, poslední dávka byla potkanům podána 1,5h před dekapitací. Pro PPI a UZV byly látky podávány akutně, u PPI 15 minut před pokusem a u vokalizace 30 minut před pokusem. U NORTu byly látky podávány subchronicky po dobu 4 dnů, poslední látka byla potkanům aplikována 4h

před pokusem. Všem potkanům byl aplikován stejný objem látky na 1kg hmotnosti. Kontrolám byl podáván fyziologický roztok (Bieffe Medital, Itálie).

3.4. Analýza dat

Data jsou uvedena jako průměry \pm SEM. Data pro imunoblotting a PPI byla hodnocena pomocí jednocestné analýzy rozptylu (One-way ANOVA) s Newman-Keulsovým post hoc testem. Data pro UZV a NORT byla hodnocena pomocí Kruskal-Wallisova testu a Dunnsova post hoc testu. Pro statistické hodnocení jsme použili software GraphPad 4, USA. Statistická významnost byla přijata na $p < 0,05$ ve všech případech. Každé zvíře bylo testováno pouze jednou.

3.5. Imunoblotting

Po odebrání příslušné tkáně z mozku potkana (v tomto případě to byly oba hipokampy a frontální kůra) jsme tkáň homogenizovali (MANEKO, ČR) v ledovém roztoku homogenizačního pufru. Dalším krokem byla centrifugace (MANEKO, ČR) nejprve na 1200 otáček po dobu 20 minut ve vychlazené centrifuze na 4°C, supernatant jsme následně stočili na 12000 otáček při 4°C po dobu 20 minut a dále použili pelet. Pelet jsme resuspendovali v 300 μ l redestilované vody. Dále jsme stanovili koncentraci proteinu ve vzorku pomocí Bradfordova činidla (Sigma-Aldrich, ČR); (Bradford 1976). Podle naměřených výsledků na spektrometru (SHIMADZU) při 595 nm jsme vzorky naředily na stejnou koncentraci (1 mg/ml) se vzorkovým pufrem a denaturovali (BIOTECH, ČR) po dobu 5 minut při teplotě 95°C.

Rozdělení proteinů jsme provedli na 7,5 % polyakrylamidovém gelu za použití Criterion Cell (Bio-Rad, USA) při 45 mA. Proteiny jsme následně přenesli na nitrocelulózovou membránu pomocí Criterion Blotter (Bio-Rad, USA) a blotovali 80 minut při 100 V.

Po 5 minutovém promytí v redestilované vodě jsme membrány rozřízli na dvě části obsahující proteiny našeho zájmu (130 kDa GluN1, 180 kDa pro GluN2A a 180 kDa pro GluN2B a kontrolní protein 50 kDa α -tubulin). Membrány jsme následně inkubovali ve fosfátovém pufru společně s 0,1 % Tween (Sigma) a 3 % odtučněným sušeným mlékem po dobu 30 minut. Následovaly inkubace s primárními protilátkami viz. tabulka 9.

Tabulka 9: Primární protilátka

Proteiny našeho zájmu	GluN1 130 kDa	GluN2A 180 kDa	GluN2B 180 kDa	α -tubulin 50 kDa
Primární Protilátka	anti-NMDAGluN1 monoklonální protilátka	anti-NMDAGluN1 polyklonální protilátka	anti-NMDAGluN2B polyklonální protilátka	anti- α -tubulin monoklonální protilátka
Výrobce	Millipore, USA	Millipore, USA	Millipore, USA	Exbio, ČR
Inkubace a ředění	přes noc, v lednici, 1:500	2h při pokojové teplotě, 1:500	2h při pokojové teplotě, 1:500	1h při pokojové teplotě, 1:1500

Po trojím opláchnutí ve fosfátovém pufru (3 x 5 minut) jsme přidali sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou, viz. tabulka 10.

Tabulka 10: Sekundární protilátka

Proteiny našeho zájmu	GluN1 130 kDa	GluN2A 180 kDa	GluN2B 180 kDa	α -tubulin 50 kDa
sekundární protilátka	polyklonální protilátka goat anti-mouse	polyklonální protilátka goat anti-rabbit	polyklonální protilátka goat anti-rabbit	polyklonální protilátka goat anti-mouse
Výrobce	Dako, Dánsko	Dako, Dánsko	Dako, Dánsko	Dako, Dánsko
inkubace a ředění	1h při pokojové teplotě, 1:3000	1h při pokojové teplotě, 1:3000	1h při pokojové teplotě, 1:3000	1h při pokojové teplotě, 1:5000

Po dalším propláchnutí 3 x 5 minut (α -tubulin 3 x 10 minut) ve fosfátovém pufru jsme membrány inkubovali s roztokem SuperSignal (Pierce, USA). Po přiložení na film bylo možné vizualizovat imunopozitivní bendy (KODAK), ty jsme následně zhodnotili pomocí Gel Doc Analysis System (Bio-Rad, USA). A výsledky jsme zobrazili jako poměr denzit pro GluN1/GluN2A/GluN2B podjednotku a α -tubulin a vyjádřili v % vůči kontrole.

3.6. Prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI)

Experimentální provedení:

Prepulzní inhibice úlekové reakce byla měřena na přístroji SR – LAB, San Diego Instrument, USA, (viz. obrázek 7). Použitá intenzita šumu pozadí byla 70 dB, následovalo pět akustických podnětů (pulzů) o síle 125 dB. Dále experiment pokračoval aplikací čtyř různých typů sekvencí. Dva dny před experimentem byli potkani krátce testováni

(5 min aklimatizace plus 5 samostatných podnětů o 120 dB).

1. úlekový podnět **p120**; 125 dB o trvání 40 ms
2. Předpodnět (prepulz) + úlekový podnět **pp113**; 13 dB nad šum (83 dB o trvání 20 ms), prepulz byl aplikován 100 ms před aplikací úlekového podnětu (125 dB)
3. Samotný předpodnět **p13**; 13 dB nad šum (83 dB o trvání 20 ms)
4. Žádný podnět; 70dB o trvání 20 ms

Celkem během jednoho experimentu bylo aplikováno 20 sekvencí podnětu, časová prodleva mezi nimi byla 30 s. Prepulzní inhibice úlekové reakce (PPI) byla vyjádřena jako procentuální rozdíl podle vzorce: $[100 - (\text{průměrná odpověď na předpodnět} + \text{podnět} / \text{průměrná odpověď na úlekový podnět})] \times 100$.

Zvířata, která vykazovala průměrnou úlekovou amplitudy menší než 10 mV byla odstraněny z výpočtu PPI a označeny jako nonrespondéři (asi 3 % z celkového počtu). Počet odebraných zvířat se mezi skupinami nelišil.



Obrázek 7: Přístroj SR-LAB (PPI)

3.7. Novel Object Recognition test/task (NORT)

Aparatura

Pro pokus jsme použili otevřenou arénu s neprůhlednými stěnami o rozměrech 68 × 68 × 30 cm. Arénu jsme umístili ve zvukotěsné místnosti a byla zaznamenávána automatickým sledovacím systémem (Noldus, Nizozemsko, EthoVision Barevná Pro-verze 3.1). Dále jsme použili dva identické předměty a jeden odlišný, všechny měly podobné rozměry, povrch byl buď z plastu nebo z keramiky. Předměty byly omyvatelné a vždy se umísťovaly 10 cm od zadní stěny arény. Na očištění předmětů i arény jsme používali 70% alkohol. Pokus sestával ze tří částí: habituace, trénování, testování.

Habituace

Zvířata se habituovala po dobu 3 dnů před pokusem (každý potkan byl v aréně 20 minut). Aréna byla umístěna v uzavřené místnosti bez pozorovatele a snímána kamerou.

Trénování

Ve fázi tréninku jsme do arény vložili dva stejné předměty (viz. obrázek 8), potkan se do arény vypustil zády k předmětům. Fáze trénování trvala 5 minut. Pak byl potkan vrácen do chovu. Aréna a předměty byly očištěny etanolem.



Obrázek 8: fáze testování – 2 stejné předměty

Testování

V testovací fázi jsme do arény umístili jeden starý a jeden nový předmět (viz. obrázek 9). Mezi fází trénování a testování byla prodleva 5 minut. Samotná fáze testování trvala vždy 5 minut (alternace pozice nového předmětu). Aréna a předměty byly očištěny etanolem.



Obrázek 9: testovací fáze – 1 starý a 1 nový předmět

Vyhodnocení

Pokus jsme vyhodnocovali Online, hodnotil se přímý kontakt potkana s předmětem (nehodnotí se: lezení na objekt za účelem dostat se ven z arény, dívání se vzhůru za současného dotýkání se předmětu). Hodnocení kontaktu je do jisté míry subjektivní.

3.8. Ultrazvuková vokalizace (UZV)

Aparatura

Pro měření UZV byl použit bat detektor (viz. obrázek 10): mikrofón nastavený na 22 kHz, bílá krabička: CH 1 (kanál 1) nastavený na 6, černá krabička: nastavení proudu 0-1 mA, output current 6 (šoky se dávají manuálně). Nastavení filtru byl následující: on time: 300 ms, 600 ms, 2000 ms

off time: 0 ms

automatic start: disabled

duration: 00:15:00

Experimentální provedení:

Celková doba pokusu byla dva dny, první den byl každý potkan umístěn na 7 minut do šokovacího boxu a každou minutu z prvních šesti dostal 10 s trvajícím šok. Druhý den jsme každého potkana opět umístili do šokovacího boxu na 1 minutu a dále mu 10 s trvajícím šok, následně jsme potkana vyndali z boxu a aplikovali mu látku a čekali předem stanovený interval (dle kinetiky látky). Potkana jsme opět umístili do boxu a 15 minut měřili UZV. Během měření potkan šoky nedostává. Ultrazvuky byly snímány pomocí bat detectoru a zaznamenávány na PC.



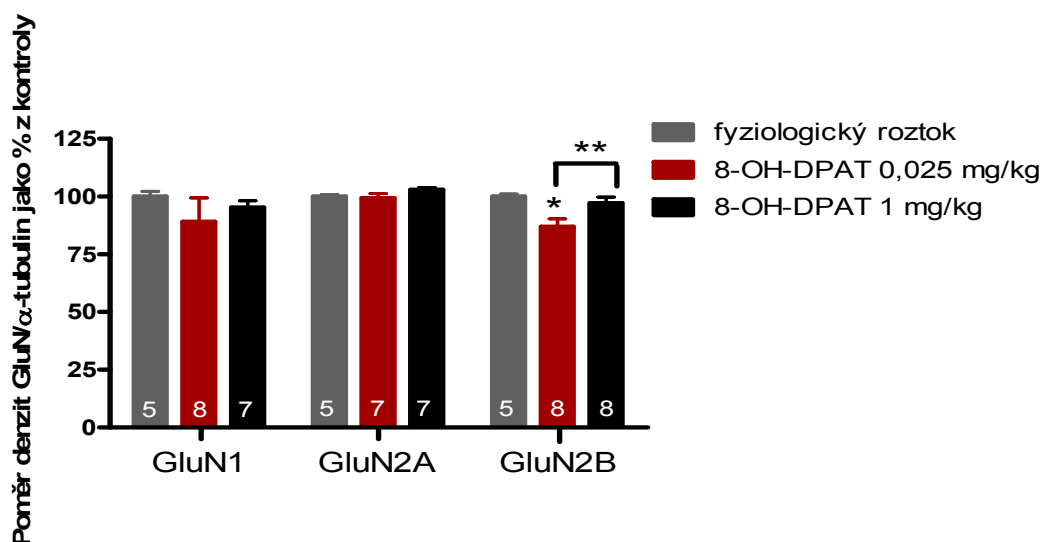
Obrázek 10: BAT DETECTOR

4. Výsledky

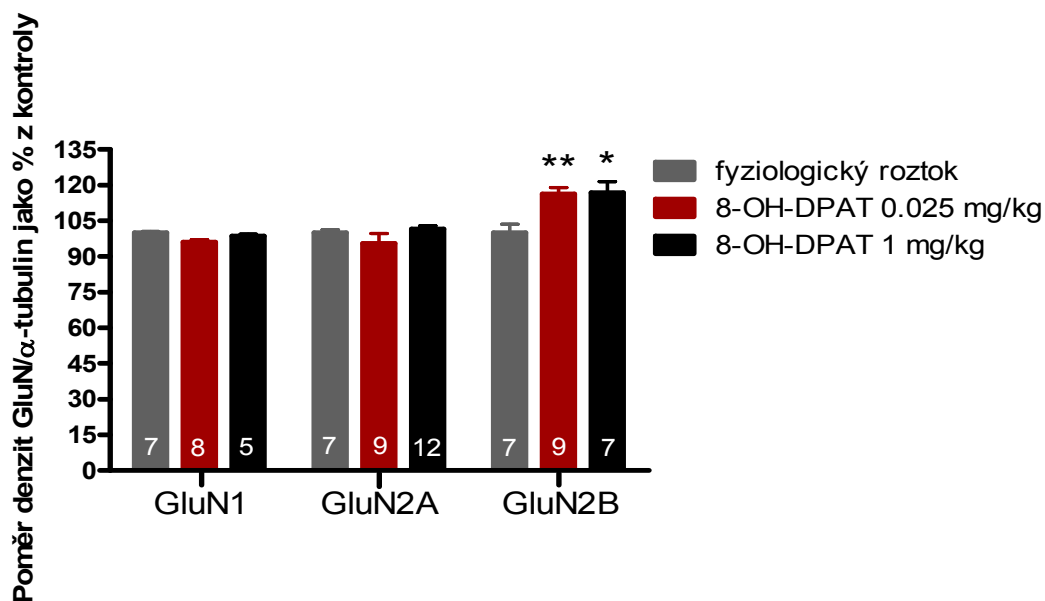
4.1. Účinek agonistů 5-HT_{1A} receptorů na expresi podjednotek NMDA receptoru

One-way ANOVA prokázala signifikantní změnu exprese po podání 8-OH-DPAT u GluN2B podjednotky NMDA receptoru. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že 8-OH-DPAT, v obou dávkách, snížil expresi GluN2B podjednotky NMDA receptoru vůči kontrole ve frontální kůře. Dávka 0,025 mg/kg snížila expresi výrazně signifikantněji než dávka 1 mg/kg (viz. obrázek 11). V hipokampu 8-OH-DPAT, v obou dávkách, naopak zvyšoval expresi GluN2B podjednotky NMDA receptoru vůči kontrole, (viz. obrázek 12).

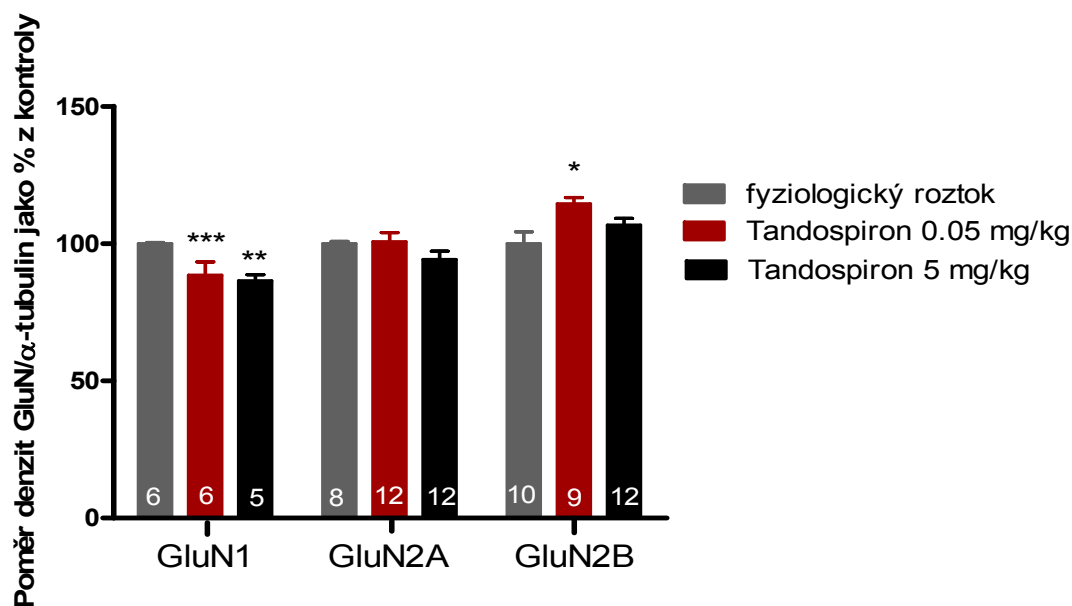
One-way ANOVA prokázala signifikantní změnu exprese po podání tandospironu u GluN1 a GluN2B podjednotky NMDA receptoru. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že tandospiron, obě dávky, snižovaly expresi GluN1 podjednotky a dávka 0,05 mg/kg zvyšovala expresi GluN2B podjednotky NMDA receptoru vůči kontrole ve frontální kůře (viz. obrázek 13). Zároveň bylo prokázáno, že tandospiron 5mg/kg snižoval expresi GluN2B podjednotky v hipokampu potkana, (viz. obrázek 14). Hladina významnosti byla ve všech případech přijata na $p < 0,05$.



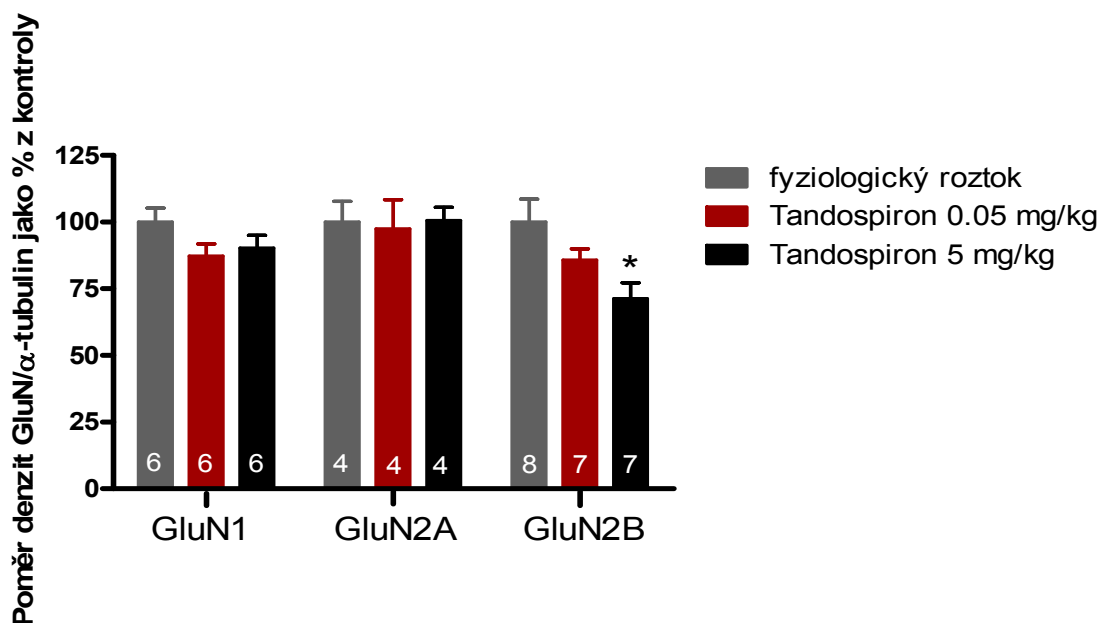
Obrázek 11: Vliv 8-OH-DPAT na expresi podjednotek NMDA receptoru ve frontální kůře. 8-OH-DPAT snižoval expresi GluN2B podjednotky v obou dávkách. $p < 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.



Obrázek 12: Vliv 8-OH-DPAT na expresi podjednotek NMDA receptoru v hipokampu. 8-OH-DPAT zvyšoval expresi GluN2B podjednotky v obou dávkách vůči kontrole. $p < 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.



Obrázek 13: Vliv tandospironu na expresi podjednotek NMDA receptoru ve frontální kůře. Tandospiron snižoval expresi GluN1 podjednotky v obou dávkách a v dávce 0.05 mg/kg zvyšoval expresi GluN2B podjednotky. $p < 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.

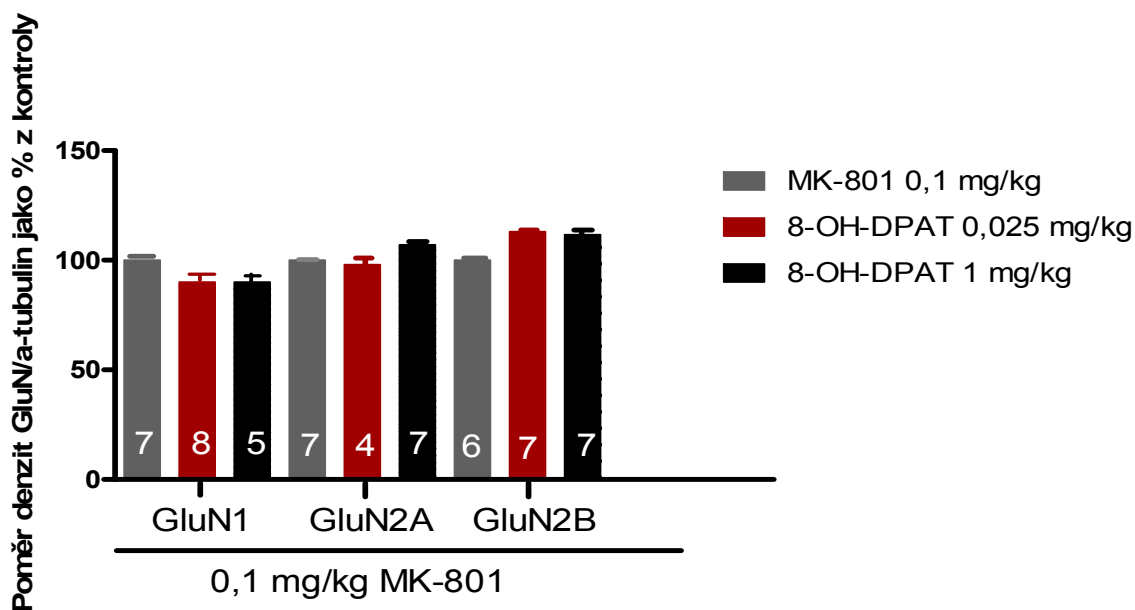


Obrázek 14: Vliv tandospironu na expresi podjednotek NMDA receptoru v hipokampu. Tandospiron snižoval expresi GluN2B podjednotky v dávce 5 mg/kg, $p < 0,05$; * $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.

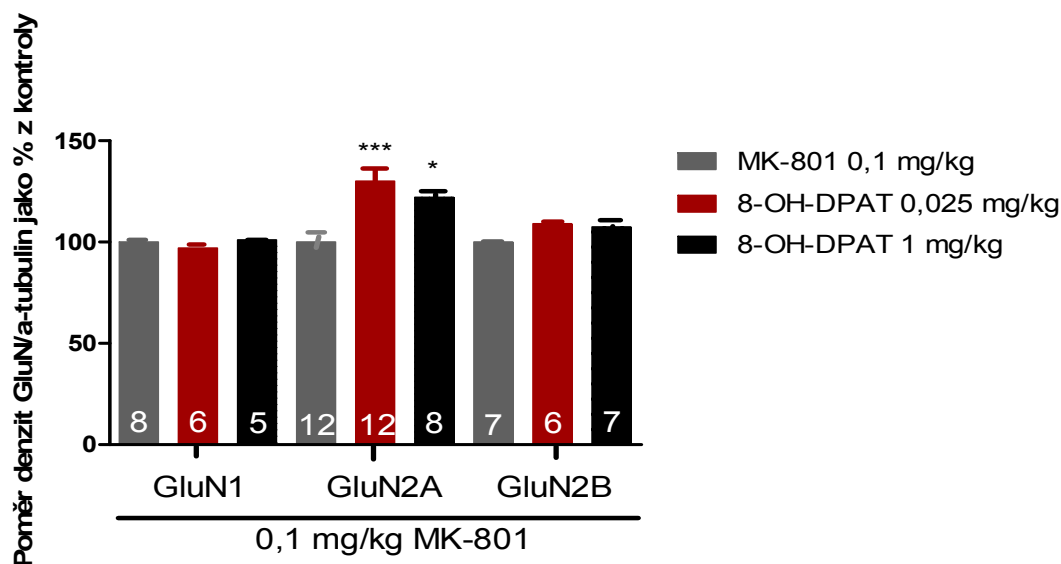
4.2. Účinek agonistů 5-HT_{1A} receptorů na expresi podjednotek NMDA receptoru v kombinaci s MK-801

One-way ANOVA prokázala signifikantní změnu exprese po podání 8-OH-DPAT v kombinaci s MK-801 u GluN2A podjednotky NMDA receptoru. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že 8-OH-DPAT v obou dávkách zvýšil expresi GluN2A podjednotky v hipokampu vůči MK-801 (0,1 mg/kg), (viz. obrázek 16), ale neměl vliv na expresi NMDA podjednotek ve frontální kůře, (viz. obrázek 15).

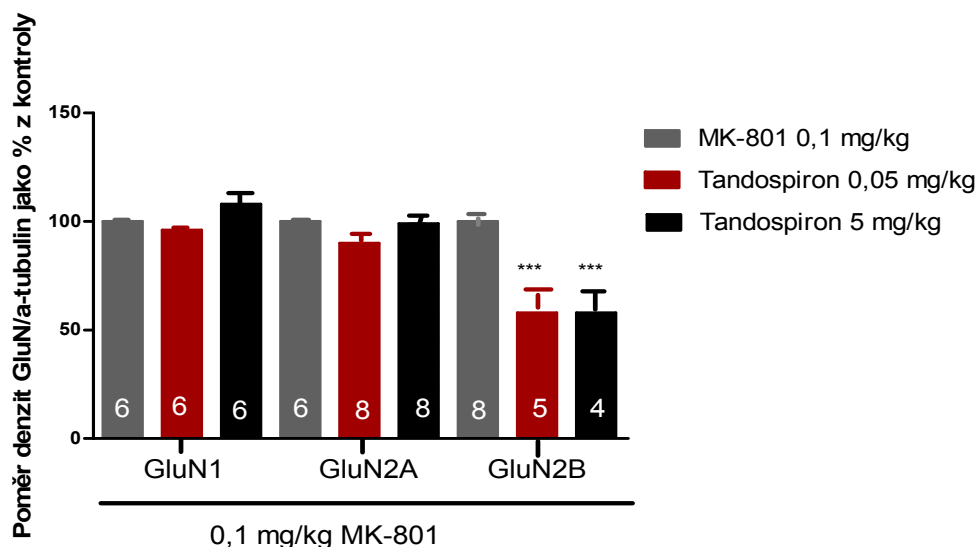
One-way ANOVA prokázala signifikantní změnu exprese po podání tandospironu v kombinaci s MK-801 u GluN2B podjednotky NMDA receptoru. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že tandospiron, obě dávky, snižovaly expresi GluN2B podjednotky ve frontální kůře, (viz. obrázek 17). Zároveň bylo prokázáno, že tandospiron v dávce 5 mg/kg zvýšil expresi GluN2B podjednotky v hipokampu vůči MK-801 (0,1 mg/kg), (viz. obrázek 18). Hladina významnosti byla ve všech případech přijata na $p < 0,05$.



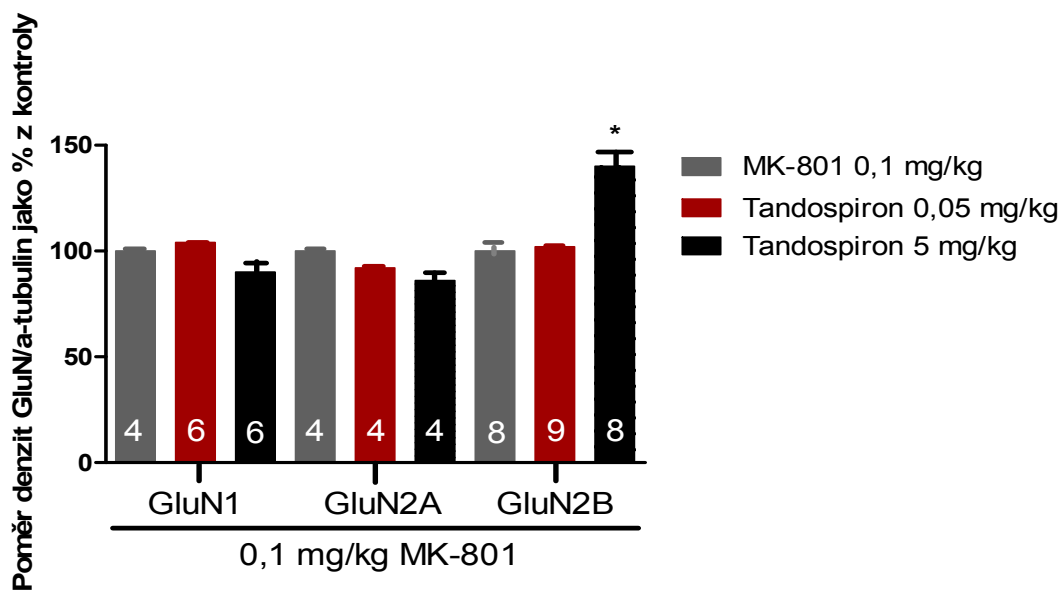
Obrázek 15: Vliv 8-OH-DPAT na expresi podjednotek NMDA receptoru v kombinaci s MK-801 ve frontální kůře. 8-OH-DPAT v kombinaci s MK-801 (0,1 mg/kg) ani v jedné dávce neměl vliv na expresi podjednotek NMDA receptoru. $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.



Obrázek 16: Vliv 8-OH-DPAT na expresi podjednotek NMDA receptoru v kombinaci s MK-801 v hipokampu. 8-OH-DPAT v kombinaci s MK-801 (0,1 mg/kg) zvyšoval expresi GluN2A podjednotky v obou dávkách vůči MK-801. $p < 0,05$; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.



Obrázek 17: Vliv tandospironu na expresi podjednotek NMDA receptoru v kombinaci s MK-801 ve frontální kůře. Tandospiron snižoval expresi GluN2B podjednotky v obou dávkách vůči MK-801 (0,1 mg/kg). $p < 0,05$; $***p < 0,001$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.



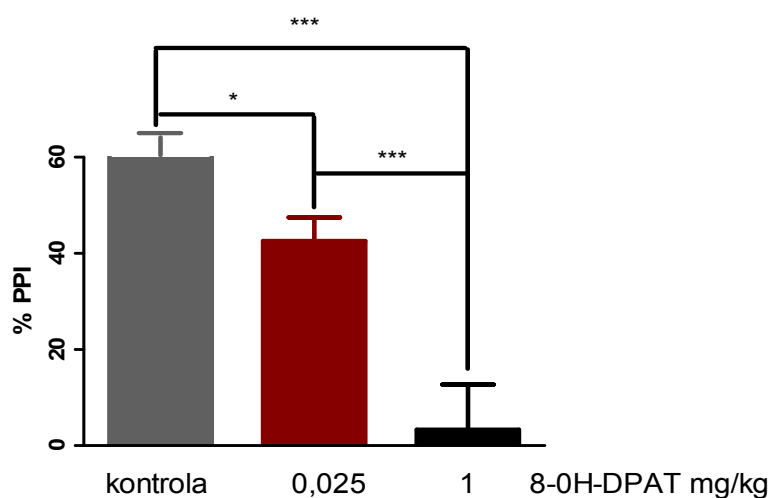
Obrázek 18: Vliv tandospironu na expresi podjednotek NMDA receptoru v kombinaci s MK-801 v hipokampu. Tandospiron v dávce 5 mg/kg v kombinaci s MK-801 zvyšoval expresi GluN2B podjednotky vůči MK-801 (0,1 mg/kg). $p < 0,05$; * $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM.

4.3. Účinek agonistů 5-HT_{1A} receptorů na prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI)

One-way ANOVA prokázala signifikantní změnu v PPI po podání 8-OH-DPAT (F (2, 29) = 22,23). Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že 8-OH-DPAT, obě dávky, snižují PPI vůči kontrole, (viz. obrázek 19).

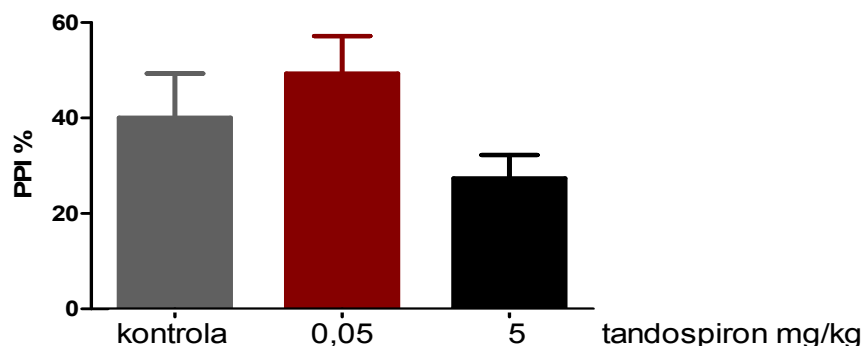
One-way ANOVA neprokázala signifikantní změnu v PPI po podání tandospironu (F (2, 29) = 2,11), (viz. obrázek 20).

Hladina významnosti byla ve všech případech přijata na $p < 0,05$.



Obrázek 19: Vliv 8-OH-DPAT na PPI

One-way ANOVA $F(2, 29) = 22,23$, $p < 0,05$, prokázala významný rozdíl mezi skupinami. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že 8-OH-DPAT obě dávky snižují PPI, dávka 1 mg/kg snižuje PPI významněji než dávka 0,025 mg/kg. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. V každé skupině bylo 10 zvířat.



Obrázek 20: Vliv tandospironu na PPI

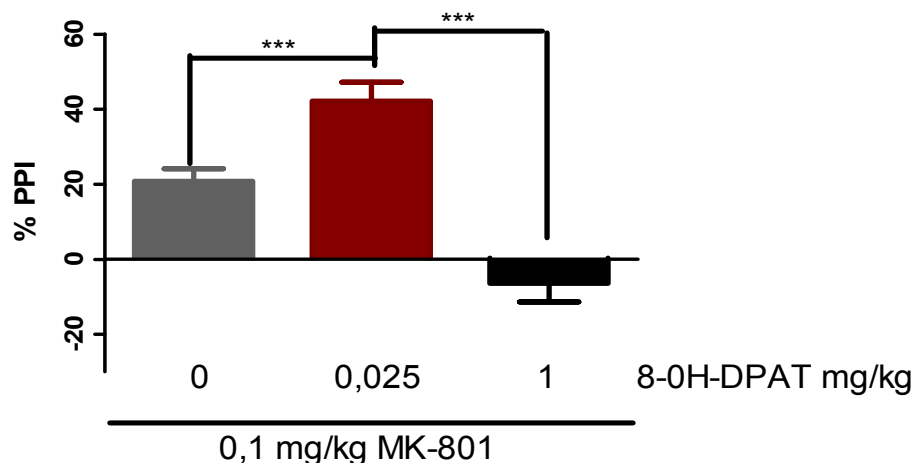
One-way ANOVA $F(2, 29) = 2,11$; $p < 0,05$, neprokázala rozdíl mezi skupinami. V každé skupině bylo 10 zvířat.

4.4. Účinek agonistů 5-HT_{1A} receptoru na MK-801 indukovanou prepulzní inhibici (PPI)

One-way ANOVA prokázala signifikantní změnu v PPI po podání 8-OH-DPAT (F (2, 29) = 27,28) v kombinaci s MK-801. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že 8-OH-DPAT v dávce 0,025 mg/kg zvyšuje PPI vůči MK-801 (0,1mg/kg) a v dávce 1 mg/kg snižuje PPI vůči MK-801 (0,1mg/kg), (viz obrázek 21).

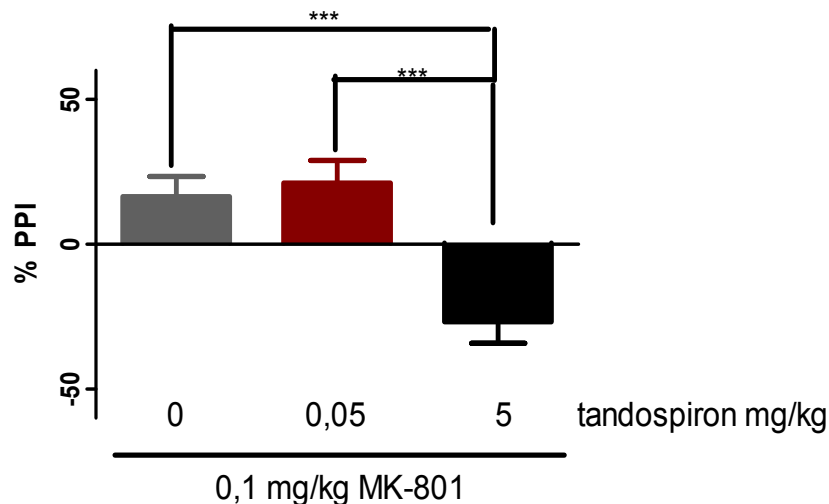
One-way ANOVA prokázala signifikantní změnu v PPI po podání tandospironu (F (2, 29) = 12,86) v kombinaci s MK-801. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že tandospiron v dávce 0,05 mg/kg zvyšuje PPI vůči MK-801 (0,1mg/kg) a v dávce 5 mg/kg snižuje PPI vůči MK-801 (0,1 mg/kg), (viz. obrázek 22).

Hladina významnosti byla ve všech případech přijata na $p < 0,05$.



Obrázek 21: Vliv 8-OH-DPAT na MK-801 indukované narušení PPI

*One-Way ANOVA F (2, 29) = 27,28, $p < 0,05$, prokázala významný rozdíl mezi skupinami. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, dávka 0,025 mg/kg v kombinaci s MK-801 zvyšuje PPI vůči MK-801 a dávka 1 mg/kg v kombinaci s MK-801 snižuje PPI vůči MK-801 *** $p < 0,001$. V každé skupině bylo 10 zvířat.*



Obrázek 22: Vliv tandospironu na MK-801 indukované narušení PPI

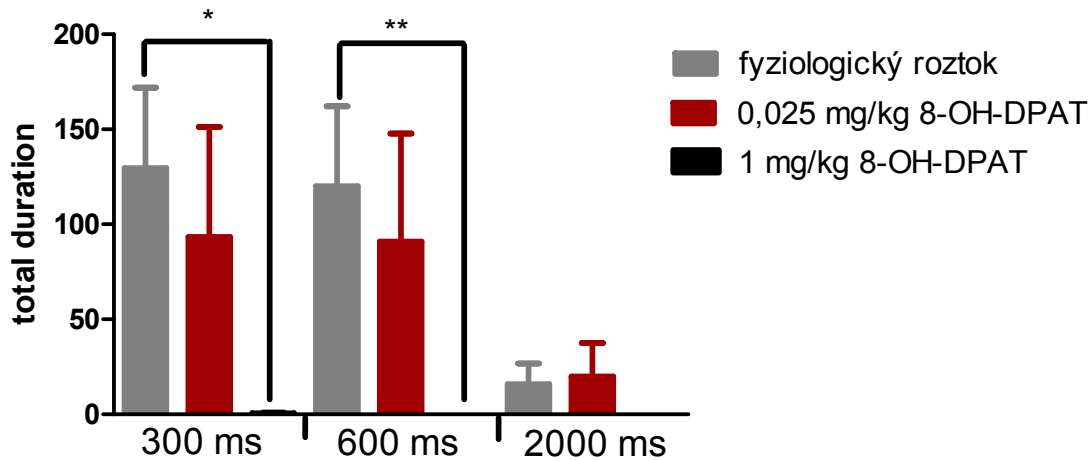
*One-Way ANOVA $F(2, 29) = 12,86, p < 0,05$, prokázala významný rozdíl mezi skupinami. Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že tandospiron v kombinaci s MK-801 snižuje PPI vůči MK-801. Dávka 5 mg/kg v kombinaci s MK-801 snižuje PPI významněji než dávka 0,05 mg/kg. $***p < 0,001$. V každé skupině bylo 10 zvířat.*

4.5. Účinek agonistů 5-HT_{1A} receptoru na ultrazvukovou vokalizaci (UZV)

Kruskal-Wallisův test prokázal signifikantní změnu v UZV po podání 8-OH-DPAT. Post-hoc Dunnstův test ukázal, že 8-OH-DPAT v dávce 1 mg/kg signifikantně snižuje UZV (300 a 600 ms) vůči kontrole (viz. obrázek 23).

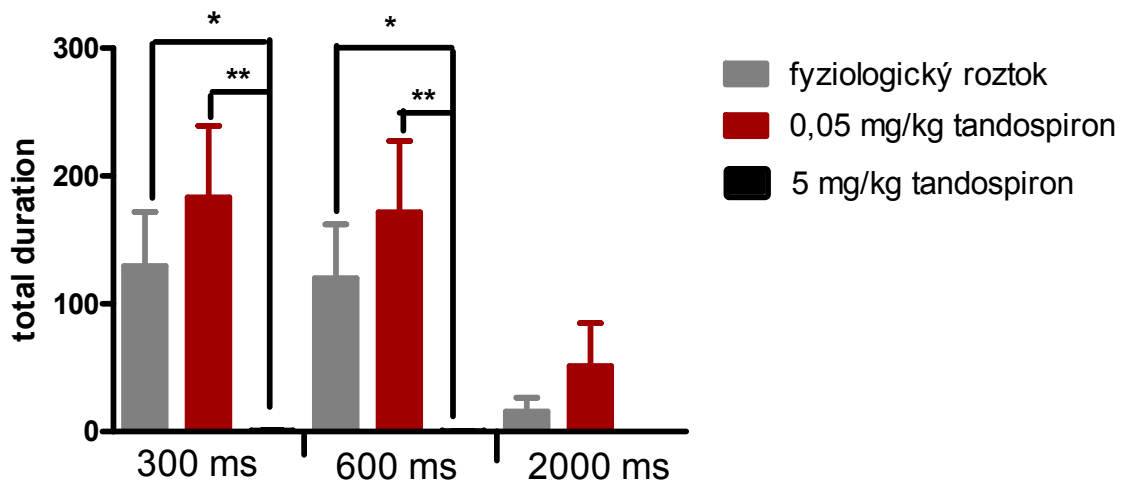
Kruskal-Wallisův test prokázal signifikantní změnu v UZV po podání tandospironu. Post-hoc Dunnstův test ukázal, že tandospiron v dávce 5 mg/kg výrazně snižuje UZV (300 a 600 ms), (viz. obrázek 24).

Hladina významnosti byla ve všech případech přijata na $p < 0,05$. V každé skupině bylo testováno deset zvířat.



Obrázek 23: Vliv 8-OH-DPAT na ultrazvukovou vokalizaci

Kruskal-Wallisův test prokázal signifikantní změnu po podání 8-OH-DPAT v UZV. Dunnstův post hoc test ukázal, že vyšší dávka 8-OH-DPAT významně snižuje UZV v délce 300 a 600 ms, $p < 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. V každé skupině bylo 10 zvířat. Total duration: průměrná doba pískání potkana za celkovou dobu měření.



Obrázek 24: Vliv tandospironu na ultrazvukovou vokalizaci

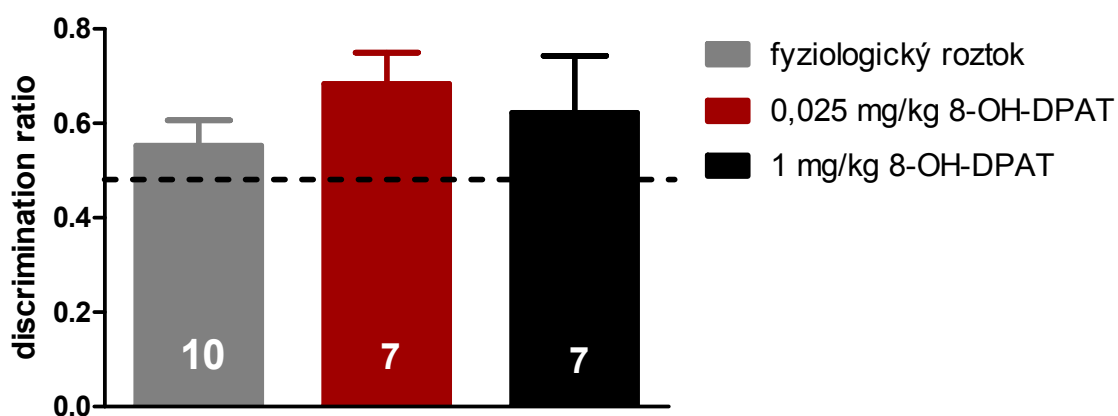
Kruskal-Wallisův test prokázal signifikantní změnu po podání tandospironu v UZV. Dunnstův post hoc test ukázal, že vyšší dávka tandospironu významně snižovala UZV v délce 300 a 600 ms proti kontrole. Nižší dávka tandospironu signifikantně zvyšovala UZV oproti vyšší dávce ovšem nikoli vůči kontrole. $p < 0,05$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. V každé skupině bylo 10 zvířat. Total duration: průměrná doba pískání potkana za celkovou dobu měření.

4.6. Účinek agonistů 5-HT_{1A} receptoru na Novel Object Recognition Test (NORT)

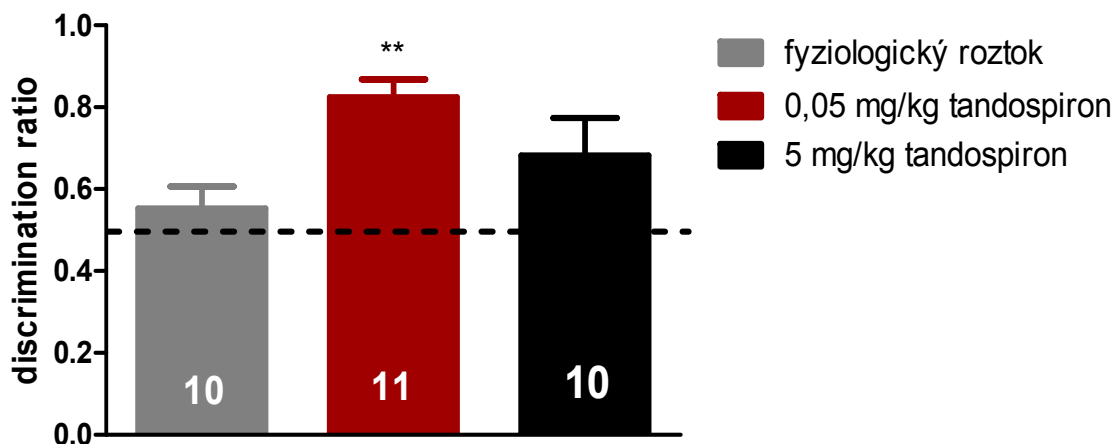
Kruskal-Wallisův test neprokázal signifikantní změnu v NORTu (discrimination ration) po podání 8-OH-DPAT (viz. obrázek 24). A neprokázal ani změnu v lokomoci (viz. obrázek 27) a rearingu (viz. obrázek 29) v NORTu

Kruskal-Wallisův test prokázal signifikantní změnu v NORTu (discrimination ration) po podání tandospironu. Post-hoc Dunnstův test ukázal, že tandospiron v dávce 0,05 mg/kg výrazně zvyšuje NORT (discrimination ration) oproti kontrole (viz. obrázek 25). Lokomoce (viz. obrázek 28) ani rearing (viz. obrázek 30) se po podání tandospironu nezměnily.

Hladina významnosti byla ve všech případech přijata na $p < 0,05$.

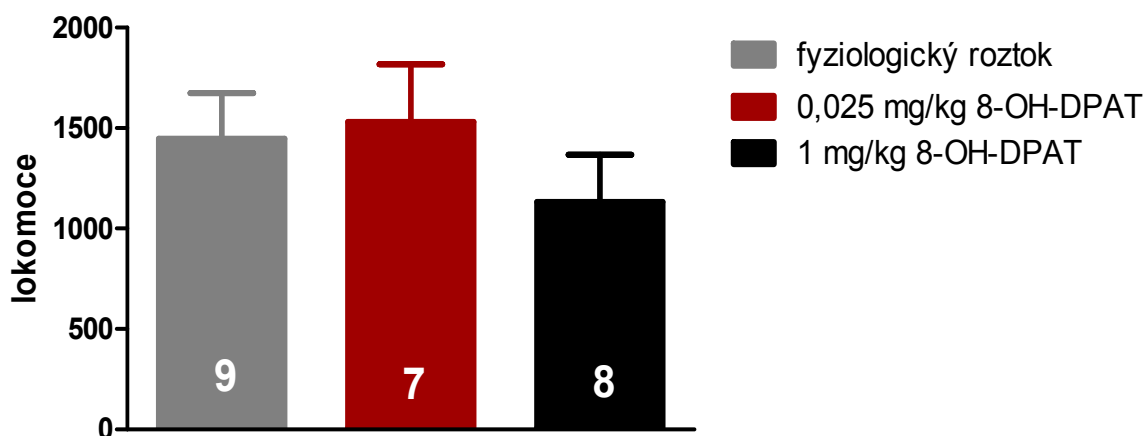


Obrázek 25: Vliv 8-OH-DPAT na discrimination ratio v NORTu. *Kruskal-Wallisův test neprokázal signifikantní změnu po podání 8-OH-DPAT na NORT; $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM. Discrimination ration: čas potkana strávený u nového předmětu/součet časů strávených u starého a nového předmětu. Přerušovaná čára v grafu znamená 50 %.*



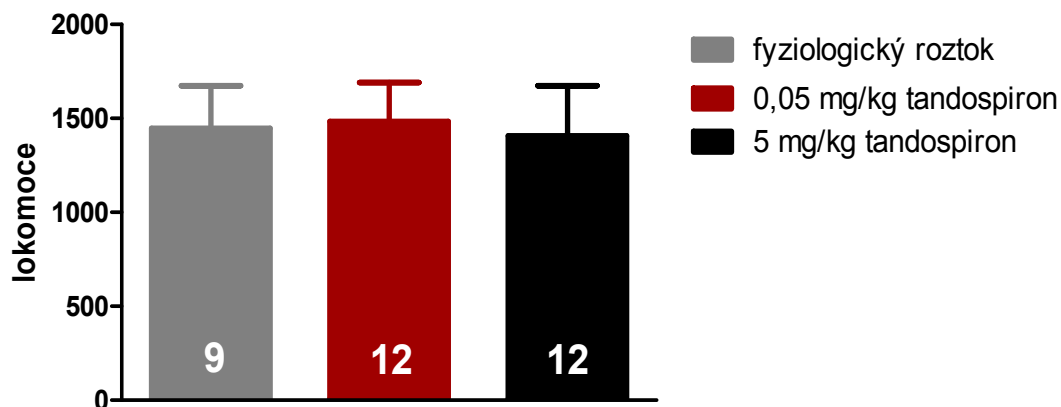
Obrázek 26: Vliv tandospironu na discrimination ratio v NORTu

Kruskal-Wallisův test prokázal signifikantní změnu po podání tandospironu na NORT. Dunnstův post hoc test ukázal, že nižší dávka tandospironu významně zvyšovala discrimination ratio proti kontrole, $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM. Discrimination ratio: čas potkana strávený u nového předmětu/součet časů strávených u starého a nového předmětu. Přerušovaná čára v grafu znamená 50 %.



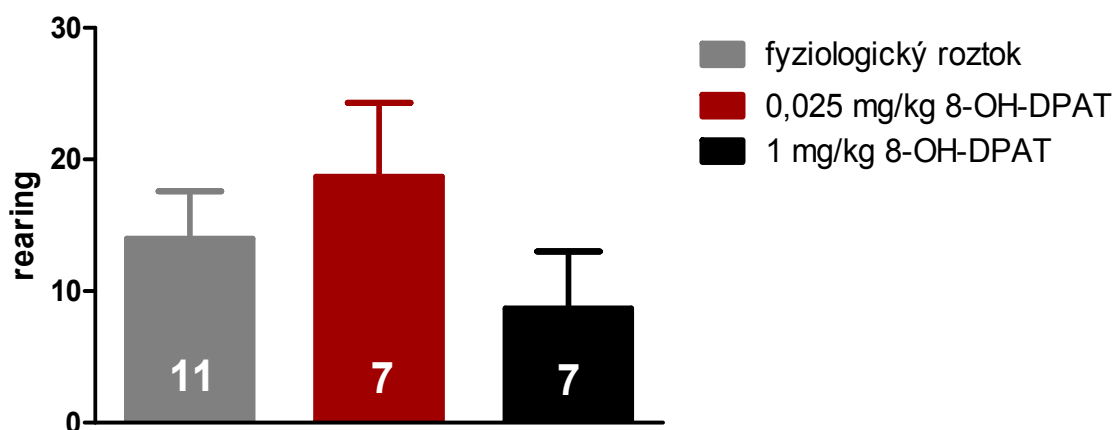
Obrázek 27: Vliv 8-OH-DPAT na lokomoci v NORTu.

Kruskal-Wallisův test neprokázal signifikantní změnu v lokomoci po podání 8-OH-DPAT v NORTu; $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM. Lokomoce: míra lokomoce potkana ve fázi testování.



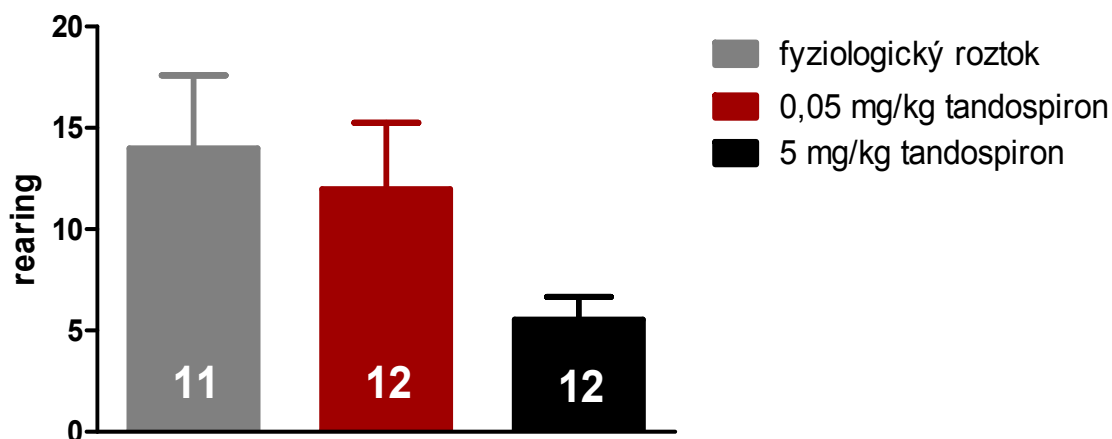
Obrázek 28: Vliv tandospironu na lokomoci v NORTu.

Kruskal-Wallisův test neprokázal signifikantní změnu v lokomoci po podání tandospironu v NORTu; $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM. Lokomoce: míra lokomoce potkana ve fázi testování.



Obrázek 29: Vliv tandospironu na rearing v NORTu.

Kruskal-Wallisův test neprokázal signifikantní změnu v rearingu po podání 8-OH-DPAT v NORTu, $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM. Rearing: míra vztyčování potkana ve fázi testování.



Ob

rázek 30: Vliv tandospironu na rearing v NORTu.

Kruskal-Wallisův test neprokázal signifikantní změnu v lokomoci po podání tandospironu v NORTu; $p < 0,05$. Čísla ve sloupcích uvádějí počet zvířat, data jsou vyjádřena v průměru \pm SEM. Rearing: míra vztyčování potkana ve fázi testování.

5. Diskuze

5.1. Vliv agonistů 5-HT_{1A} receptoru na expresi podjednotek NMDA receptoru

Cílem práce bylo zjistit, zda agonisté 5-HT_{1A} receptorů interagují s NMDA receptory na molekulární a behaviorální úrovni, po systémovém podání agonistů.

Studie na buněčných kulturách ukázaly, že aktivace postsynaptických 5-HT_{1A} receptorů snižuje amplitudu NMDA proudů (Yuen et al., 2005; Gu et al., 2007). Konkrétně aplikace 8-OH-DPAT, agonisty 5-HT_{1A} receptorů, způsobila významné snížení amplitudy NMDA receptorových iontových proudů v akutně izolovaných pyramidových neuronech prefrontální kůry (Yuen et al., 2005). Systémové podání nonkompetivních antagonistů NMDA receptorů nebo vyřazení NMDA receptorů vyvolává schizofrenii podobné chování (Jentsch a Roth, 1999; Mohn et al., 1999). Proto dysfunkce NMDA receptorů je silně svázána s patofyziologií duševních poruch (Tsai a Coyle, 2002; Lindsley et al., 2006). To dává předpoklad pro to, že jedním z důležitých terapeutických cílů by mohly být 5-HT_{1A} receptorů, prostřednictvím nichž jsou NMDA receptory nepřímo ovlivněny.

Jedním z experimentálních přístupů, jak sledovat interakci dvou receptorů na molekulární úrovni, je sledovat vliv agonistů 5-HT_{1A} receptorů na změnu v expresi

podjednotek NMDA receptorů pomocí imunoblotingu. Z našich výsledků vyplývá, že jak plný agonista (8-OH-DPAT), tak parciální agonista (tandospiron) interagovaly s podjednotkami NMDA receptorů. Plný agonista 5-HT1A receptoru 8-OH-DPAT snižoval expresi GluN2B podjednotky NMDA receptoru ve frontální kůře a naopak v hipokampu expresi GluN2B podjednotky zvyšoval. Parciální agonista 5-HT1A receptoru tandospiron snižoval expresi GluN1 podjednotky ve frontální kůře a zvyšoval expresi GluN2B podjednotky v hipokampu. Z těchto výsledků vyplývá silná interakce mezi 5-HT1A receptorem a GluN1 a GluN2B podjednotkou NMDA receptoru.

Glutamát se váže na GluN2A a GluN2B podjednotky NMDA receptoru. U myši s knockdownem GluN2B podjednotky byla pozorována perinatální smrt (Kutsuwada et al., 1996), ukázalo se, že GluN2B podjednotka je nezbytná pro vývoj. Dosavadní studie ukazují, že GluN2B podjednotka je důležitá pro kognitivní funkce. Myši se sníženou expresí GluN2B podjednotky vykazovali sníženou aktivitu v otevřeném poli (Ikeda et al., 1995). Také abnormality v regulaci GluN2B podjednotky NMDA receptoru významně ovlivňují učení a paměť u schizofrenie (Loftis and Janowsky, 2003). GluN2B asociuje s mikrotubulárním komplexem, jehož součástí je i protein KIF 17 (Setou et al., 2000). Tento komplex je nezbytný pro transport GluN2B podjednotky do NMDA receptoru (Yuen et al., 2005). Důležitost GluN2B podjednotky NMDA receptoru ve spojitosti s regulací vyšších kognitivních funkcí podporuje studie Wong et al., 2002, kde zvýšená exprese KIF17 v transgenních myších je spojena se zvýšenou expresí GluN2B a prokazuje zlepšení prostorové a pracovní paměti.

Na GluN1 podjednotku se váže ko-agonista glycin a je nutná pro funkční NMDA receptory. Myši se sníženou expresí GluN1 podjednotky vykazovali chování obdobné u schizofrenie: zvýšenou pohybovou aktivitu, sníženou metabolickou aktivitu v oblasti mediální prefrontální kůry, anteriálního cingula a hipokampu (Duncan et al., 2002), snížení sociální interakce (Duncan et al., 2004) a snížení PPI (Powell et al., 2009). Parciální agonisté 5-HT1A receptoru mají rozdílný účinek na expresi NMDA receptoru než plní agonista. Parciální agonista 5-HT1A receptorů tandospiron vykazuje 60 % aktivitu plného agonisty 5-HT1A receptorů 8-OH-DPAT. Protože přítomnost GluN1 podjednotky je nutná pro funkci NMDA receptoru, je možné, že snížení exprese GluN1 podjednotky indukované 5-HT1A agonisty, v našem případě tandospironem, vede právě ke snížení funkce NMDA receptoru a indukuje schizofrenii podobné chování. Poruchy funkce NMDA receptoru vyřazením

funkčně nezbytné GluN1 podjednotky, v kortikálních interneuronech během časného vývojového období, které vyplývají z epigenetické nebo genetické změny NMDA receptoru nebo ovlivněním navazující signální kaskády, vede k abnormálnímu kortikálnímu zrání a zvýšení náchylnosti k psychiatrickému onemocnění v dospívání (Belforte et al., 2010).

Jak z našich výsledků na potkanech, tak ze studií na tkáňových kulturách je zřejmé propojení mezi 5-HT_{1A} a NMDA receptory. Právě ovlivnění 5-HT_{1A} receptoru by mohlo nepřímo vést k potenciaci nebo inhibici NMDA receptoru. NMDA receptory hrají klíčovou úlohu v patofyziologii celé řady onemocnění, jako je ischemie, epilepsie a schizofrenie. U schizofrenie se na základě post mortem studií, animálních a klinických modelů předpokládá snížená funkce NMDA receptorů. Proto aktivace těchto receptorů by mohla vést k antipsychotickému účinku. V naší studii jsme ovšem našli sníženou expresi ubikvitivní GluN1 podjednotky a v některých oblastech zvýšení/snížení GluN2B podjednotky. Tyto nálezy tedy svědčí naopak o prohloubení hypofunkce NMDA receptorů a následné zhoršení psychotických příznaků

5.2. Vliv agonistů 5-HT_{1A} receptoru na prepulsní inhibici úlekové reakce (PPI)

PPI je marker senzomotorického gatingu, deficit v PPI byl nalezen u závažných neuropsychiatrických poruch, jako je právě schizofrenie (Geyer et al., 2001). Míru PPI lze měřit jak u lidí – pacientů se schizofrenií, tak u zvířat, proto lze tuto metodu použít ke zkoumání schizofrenii podobného chování.

Naše výsledky ukázaly, že agonisté mají vliv na PPI. Plný agonista 5-HT_{1A} receptorů 8-OH-DPAT snižoval PPI. Vyšší dávka (1 mg/kg) 8-OH-DPAT snižovala PPI významněji než nižší dávka (0,025 mg/kg) 8-OH-DPAT. U tandospironu se neprokázal žádný signifikantní vliv na změnu PPI. Narušení PPI po aplikaci vysoké dávky 5-HT_{1A} agonisty (8-OH-DPAT) bylo popsáno opakovaně (Rigdon a Weatherspoon, 1992; Sipes a Geyer, 1995). Na základě zjištění, že podání 8-OH-DPAT do rafeálních jader narušuje PPI u potkana, se zdá, že efekt účinku je dán tím, že agonista působí na 5-HT_{1A} autoreceptory, které se vyskytují presynapticky (Sipes a Geyer, 1995). Nicméně, se v poslední době ukazuje, že systémová aplikace 8-OH-DPAT narušuje PPI převážně prostřednictvím aktivace postsynaptických 5-HT_{1A} receptorů (Gogos et al., 2005). Také myši s knockoutem 5-HT_{1A} receptorů vykazují zvýšenou úzkost, a mají poruchy v PPI. Ukázalo se, že zvýšená úroveň úzkosti

negativně ovlivňuje učení paměť. U myši s knockoutovaným 5-HT1A receptorem byla také zjištěna vyšší náchylnost ke stresu (Ogren et al., 2008).

5.3. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na ultrazvukovou vokalizaci (UZV)

Jedním ze symptomů schizofrenie, je zvýšení úzkosti a deprese. Stresem indukovaná ultrazvuková vokalizace je marker úzkostného chování a lze ji měřit jak u lidí, tak u zvířat, proto může být využita pro studium schizofrenii podobného chování. Ultrasonická vokalizace u potkanů na hladině 22kHz v délce trvání 300-4000 ms je signálem negativního afektivního stavu (nebezpečí, úzkost, ohrožení, stres), (Anderson, 1954; Graham et al., 2009).

Naše výsledky ukázaly, že jak plný, tak parciální agonista 5-HT1A receptoru ve vyšších dávkách v délkách 300 a 600 ms zlepšovaly UZV vůči kontrole. Nižší dávky agonistů 5-HT1A receptorů neměly na UZV žádný signifikantní vliv. Ovšem u parciálního agonisty 5-HT1A receptorů tandospironu slabší dávka signifikantně UZV zhoršovala oproti dávce vysoké.

Studie, které by popisovaly vliv tandospironu nebo 8-OH-DPAT na anxieta v testu UZV jsem nenašla. Ve studiích, které využily k výzkumu anxiety u potkanů metodu vyvýšeného křížového bludiště (elevated plus maze) se po podání plného agonisty 5-HT1A receptorů 8-OH-DPAT významně zvýšila doba strávená potkanem v otevřených ramenech bludiště, což ukazuje na anxiolytický efekt této látky. Naopak buspiron (parciální agonista 5-HT1A receptorů) vykazoval spíše anxiogenní efekt. Doba, po kterou byl potkan v otevřených ramenech bludiště se značně zredukovala (Collinson a Dawson, 1997).

Tandospiron a buspiron (parciální agonisté 5-HT1A receptorů) se využívají jako anxiolytika a jsou registrovány pro léčbu generalizované úzkostné poruchy (tandospiron pouze v Číně a Japonsku). Plní agonisté 5-HT1A receptorů (8-OH-DPAT) vykazují bifázický účinek na kognitivní funkce, zlepšují je při nízkých dávkách a zhoršují při vysokých dávkách, což je pravděpodobně zprostředkováno stimulací presynaptických a postsynaptických 5-HT1A receptorů (Luttgen et al., 2005; King et al., 2008).

5.4. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na rozpoznávací (recognition) paměť v NORTu

Novel object recognition test se používá ke zkoumání epizodické paměti u lidí (Davis et al., 2010). Deficit v epizodické paměti a zhoršené rozpoznávání předmětů je jedním ze symptomů schizofrenního onemocnění. Agonisté 5-HT1A receptorů jako je 8-OH-DPAT a tandospiron mají pozitivní vliv na kognitivní deficit u pacientů se schizofrenií (Sumiyoshi et al., 2007). Proto je opodstatněnou snahou testování agonistů 5-HT1A receptorů v animálních modelech rozpoznávací paměti, jako je právě NORT.

Naše výsledky ukazují, že parciální agonista 5-HT1A receptorů tandospiron signifikantně zlepšoval rozpoznávací paměť. Toto zlepšení bylo zjištěno pouze u dávky 0,05 mg/kg, nikoliv u dávky 5 mg/kg. Plný agonista 5-HT1A receptorů 8-OH-DPAT neměl na rozpoznání nového předmětu vliv.

Ovlivnění paměti a učení u schizofrenie bylo studováno v souvislosti s modulací GluN2B podjednotky NMDA receptoru (Loftis a Janowsky, 2003). Důležitost GluN2B podjednotky NMDA receptoru ve spojitosti s regulací vyšších kognitivních funkcí podporuje studie Wonga a spolupracovníků z roku 2002, dokazuje, že zvýšená exprese KIF17 u transgenních myší je spojena se zvýšenou expresí GluN2B, což vede ke zlepšení prostorové a pracovní paměti.

Současné studie ukazují, že podávání tandospironu (parciální agonista 5-HT1A receptorů) v kombinaci s typickými antipsychotiky zlepšuje slovní paměť u nemocných schizofrenií (Sumiyoshi et al., 2001). Myši s knockoutem 5-HT1A receptorů vykazují zvýšenou úzkost, a mají poruchy v PPI. Ukázalo se, že zvýšená úroveň úzkosti negativně ovlivňuje učení a paměť. U myší s knockoutem receptorem 5-HT1A byla také zjištěna vyšší náchylnost ke stresu. Plní agonisté 5-HT1A receptorů (8-OH-DPAT) zhoršují kognici tím, že inhibují uvolňování glutamátu a acetylcholinu v různých oblastech mozku včetně mozkové kůry (Ogren et al., 2008).

Řada studií ukazuje na zhoršené učení, konsolidaci paměti i vybavování po podání agonisty 5-HT1A receptoru (8-OH-DPAT, buspiron); (Meneses a Perez-Garcia, 2007). Další studie ukazují, že aktivace 5-HT1A receptorů vyšší dávkou agonistů 5-HT1A receptorů zhoršuje pasivní vyhýbání se místu a podmíněnou strachovou odpověď u myší (Quartermain et al., 1993). Systémové podání 8-OH-DPAT zhoršovalo učení v Morrisově vodním bludišti (Carli et al., 1995). Naopak nízké

dávky 8-OH-DPAT zlepšují paměť v testu pasivního vyhýbání (Madjid et al., 2006) a v testu rozpoznávání objektu (Cole et al., 1994). Nízké dávky parciálních agonistů zlepšovaly kognitivní funkce. Předpokládá se, že aktivují autoreceptory, ty jsou citlivější na agonisty než postsynaptické receptory (Yocca et al., 1992).

5.5. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru v kombinaci s MK-801 na expresi podjednotek NMDA receptoru

Dílčím cílem práce bylo zjistit, zda agonisté 5-HT1A receptorů interagují s NMDA receptory na molekulární a behaviorální úrovni, po systémovém podání agonistů 5-HT1A receptorů a antagonistů NMDA receptorů.

Naše výsledky ukázaly, že agonisté v kombinaci s MK-801 (inhibitor NMDA receptoru) interagovaly s GluN2A a GluN2B podjednotkami NMDA receptoru. 8-OH-DPAT zvyšoval expresi GluN2A podjednotky v hipokampu. Tansospiron snižoval expresi GluN2B podjednotky NMDA receptoru ve frontální kůře, kdežto v hipokampu expresi této podjednotky zvyšoval. Opakované podávání nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů vede ke specifickým změnám v chování, biochemických morfologických parametrů v centrální nervové soustavě, které je v mnoha ohledech podobné schizofrenii (Bubeníková-Valešová et al., 2008). Studie s podobným antagonistou NMDA receptoru (fencyklidinem) ukázaly buď snížení exprese GluN1 ve frontální kůře (Lindahl a Keifer, 2004), nebo žádné změny v expresi této podjednotky (Gu et al., 2007). Podání MK-801 samotné nebo v kombinaci s agonisty 5-HT1A receptoru snižovalo expresi GluN2A podjednotky. Snížení exprese GluN2A podjednotky po podání MK-801 bylo již dokumentováno na úrovni mRNA (Oh et al., 2001). Chronické podávání antagonisty NMDA receptoru snižuje expresi proteinu RGS4 (Gu et al., 2007). Nižší exprese RGS4 byla prokázána ve frontální oblasti pacientů se schizofrenií (Mirnics et al., 2001).

Z našich i z dalších studií vyplývá, že parciální agonisté 5-HT1A receptoru spíše zlepšují účinky navozené podáváním MK-801.

5.6. Vliv agonistů 5-HT1A receptoru na MK-801 indukovanou inhibici PPI

Naše výsledky ukázaly, že agonisté 5-HT1A receptoru v kombinaci s antagonistou NMDA receptoru MK-801 mají vliv na PPI. Plný agonista 5-HT1A receptorů 8-OH-DPAT v dávce 0,025mg/kg v kombinaci s MK-801 (0,1mg/kg) zvyšovaly PPI, naproti tomu dávka 1mg/kg 8-OH-DPAT v kombinaci s MK-801 snižovaly PPI. Tanspiron, parciální agonista 5-HT1A receptorů, v kombinaci s MK-801 (0,1 mg/kg) vykazoval stejný design účinku jako plný agonista, nižší dávka tandospironu zvyšuje PPI a vyšší dávka PPI snižuje.

Opakované podávání MK-801 indukuje schizofrenii podobné chování jako je právě například deficit v senzomotorickém gatingu, který lze měřit pomocí PPI (Geyer et al., 2001; Bubeníková et al., 2005; Bubenikova-Valesova et al., 2008). Administrace MK-801 způsobuje deficit v PPI a zvýšení akustické úlekové reakce (Geyer et al, 2001; Bubeníková et al., 2005). Nízké dávky 8-OH-DPAT (0,025 mg/kg) zmírňují deficit v PPI vyvolaný MK-801 (0,1 mg/kg). Naopak, byl zjištěn větší deficit v PPI po podání vysoké dávky 8-OH-DPAT (1 mg/kg) a MK-801 (0,1 mg/kg) oproti samotnému podání MK-801. Nicméně, poškození v PPI bylo pozorováno i po podání jen 8-OH-DPAT (1 mg/kg), takže můžeme učinit závěr, že vysoké dávky 8-OH-DPAT zesilují účinek MK-801 na PPI. Vysoko potentní agonisté 5-HT1A receptoru zhoršují schizofrenii podobné chování vyvolané MK-801 u potkanů (Maj et al, 1996; Dall'Olio et al, 1999). Různý efekty nízké a vysoké dávky 8-OH-DPAT na narušené chování potkanů vyvolané MK-801 lze možná vysvětlit různou afinitou 5-HT1A autoreceptorů a postsynaptických receptorů (Yocca et al., 1992). Nonkompetitivní antagonist NMDA podobný MK-801, fencyklidin, zvyšuje extracelulární hladinu serotoninu v prefrontální kůře a hipokampu u potkanů (Martin et al., 1998). Proto, aktivace presynaptických 5-HT1A receptorů v rafeálních jádrech neutralizuje účinek potlačený NMDA receptory. Postsynaptické 5-HT1A receptory lokalizované na pyramidových (glutamátergních) neuronech inhibují činnost glutamátergních neuronů (Araneda a Andrade, 1991). Parciální agonisté 5-HT1A receptorů lze využít k léčbě schizofrenie, ale plný silný agonista receptoru by mohl zhoršit psychotické příznaky (Roth et al., 2004). Parciální agonista 5-HT1A receptoru bude působit jako agonista autoreceptorů. Kromě toho podání 5-HT1A receptorů zmírňuje změny chování, jako jsou stereotypie, hyperlokomoci a poruchy kognitivních funkcí vyvolané MK-801

(Harder a Ridley, 2000; Wedzony et al., 2000). Stimulace 5-HT_{1A} receptorů 8-OH-DPAT (plný agonista) nebo buspironem (parciální agonista) snižují PPI (Bubenikova-Valesova et al., 2007; Van den Buuse a Gogos, 2007). Účinku tandospironu (5 mg/kg) na PPI bylo zabráněno akutním podáváním WAY 100635, selektivní antagonisty 5-HT_{1A} (Fornal et al., 1996), což naznačuje, že tandospiron snižuje PPI přes selektivně působení na 5-HT_{1A} receptory. Opakované podávání agonistů 5-HT_{1A} receptorů deaktivuje 5-HT_{1A} autoreceptory v rafeálních jádrech, ale neovlivňuje postsynaptické receptory v projekčních oblastech (Hensler, 2003). Zajímavé je, že tandospiron v dávce 0,05 mg/kg při opakovaném, ale akutní, administraci indukuje deficit v PPI, který nebyl ovlivněn WAY 100635. Úroveň úlekové reakce ukazuje na míru emocí a pozornosti u hlodavců. Vysoká úleková reakce narušuje smyslové a kognitivní zpracování informací, což je následováno zvýšením srdeční frekvence (Yeomans et al. 2002).

6. Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda glutamátové NMDA receptory interagují se serotoninovými-1A (5-HT_{1A}) receptory jak na molekulární, tak na behaviorální úrovni. Metodou imunoblottingu jsme zjistili, že podání agonistů 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT, tandospiron) vede ke zvýšení/snížení exprese podjednotek (GluN1, 2A, 2B) NMDA receptoru ve frontální kůře a hipokampu.

Dílčím cílem bylo toto ověřit i v testu PPI, kde jsme zjistili, že podání plného agonisty 5-HT_{1A} receptorů 8-OH-DPAT vede ke změně zpracování informací v testu PPI, obě dávky (0,025 mg/kg i 1 mg/kg) PPI snižují. Tandospiron neměl na PPI vliv. Nakonec jsme chtěli ověřit, zda mají parciální agonisté 5-HT_{1A} receptoru vliv na snížení stresem indukované ultrazvukové vokalizace. Měřením UZV u potkanů jsme zjistili, že 8-OH-DPAT a tandospiron ve vysokých dávkách signifikantně zlepšují anxieta.

Účinek agonistů 5-HT_{1A} receptorů jsme ověřovali i v animálním modelu rozpoznávací paměti NORTu. Z našich výsledků vyplývá, že parciální agonista 5-HT_{1A} receptorů, tandospiron, v dávce 0,05 mg/kg zlepšuje rozpoznávací paměť. Plný agonista 5-HT_{1A} receptorů 8-OH-DPAT neměl na úroveň rozpoznání nového předmětu vliv. Ani jeden z agonistů 5-HT_{1A} receptoru neměl vliv na lokomoci a rearing v NORTu.

Dále bylo naším cílem zjistit, jestli podání parciálních agonistů 5-HT_{1A} receptoru v kombinaci s antagonistou NMDA receptoru MK-801 v dávce 0,1 mg/kg mění expresi podjednotek NMDA receptoru. Z výsledků pokusů je patrné, že po souběžné aplikaci antagonisty NMDA receptoru (MK-801) a agonisty 5-HT_{1A} receptoru (8-OH-DPAT, tandospiron) se exprese podjednotek NMDA receptoru mění. 8-OH-DPAT zvyšoval expresi GluN2A podjednotky v hipokampu. Tandospiron snižoval expresi GluN2B podjednotky NMDA receptoru ve frontální kůře, kdežto v hipokampu expresi této podjednotky zvyšoval.

Následně jsme vliv souběžné aplikace agonistů 5-HT_{1A} receptoru a antagonisty NMDA receptoru ověřovali v testu PPI. Plný agonista 5-HT_{1A} receptorů 8-OH-DPAT v dávce 0,025 mg/kg v kombinaci s MK-801 (0,1 mg/kg) zvyšovaly PPI, naproti tomu dávka 1 mg/kg 8-OH-DPAT v kombinaci s MK-801 snižovaly PPI. Tandospiron, parciální agonista 5-HT_{1A} receptorů, v kombinaci s MK-801 (0,1 mg/kg) vykazoval stejný design účinku jako plný agonista, nižší dávka tandospironu zvyšuje PPI a vyšší dávka PPI snižuje.

7. Literatura

1. Adams B. W. and Moghaddam B. Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biol.Psychiatry* 50 (10):750-757, 2001.
2. Adell A., Celada P., Abellan M. T. and Artigas F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 39 (2-3):154-180, 2002.
3. Adler C. M., Malhotra A. K., Elman I., Goldberg T., Egan M., Pickar D. and Breier A. Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 156 (10):1646-1649, 1999.
4. Aghajanian G. K. and Lakoski J. M. Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance. *Brain Res.* 305 (1):181-185, 1984.
5. Ago Y. and Matsuda T. Brain microdialysis of isolation-reared mice under freely-moving conditions. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 122 (2):135-140, 2003.
6. Akbarian S., Bunney W. E.Jr., Potkin S. G., Wigal S. B., Hagman J. O., Sandman C. A. and Jones E. G. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch.Gen.Psychiatry* 50 (3):169-177, 1993.
7. Akimova E., Lanzenberger R. and Kasper S. The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol.Psychiatry* 66 (7):627-635, 2009.
8. Alessandri B., Battig K. and Welzl H. Effects of ketamine on tunnel maze and water maze performance in the rat. *Behav.Neural Biol.* 52 (2):194-212, 1989.
9. Ali D. W. and Salter M. W. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11 (3):336-342, 2001.
10. Allison D. B., Mentore J. L., Heo M., Chandler L. P., Cappelleri J. C., Infante M. C. and Weiden P. J. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am.J.Psychiatry* 156 (11):1686-1696, 1999.
11. Anderson J. W. The production of ultrasonic sounds by laboratory rats and other mammals. *Science* 119 (3101):808-809, 1954.
12. Andreasen N. C., Weinberger D. R., Hirsch S. R., Roy M. A. Positive and negative symptoms in schizophrenia. 1995, 28-45.
13. Andreasen N. C., Nopoulos P., O'Leary D. S., Miller D. D., Wassink T. and Flaum M. Defining the phenotype of schizophrenia: cognitive dysmetria and its neural mechanisms. *Biol.Psychiatry* 46 (7):908-920, 1999.
14. Anis N. A., Berry S. C., Burton N. R. and Lodge D. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br.J.Pharmacol.* 79 (2):565-575, 1983.
15. Araneda R. and Andrade R. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40 (2):399-412, 1991.

16. Arnt J. and Skarsfeldt T. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18 (2):63-101, 1998.
17. Baldridge E. B. and Bessen H. A. Phencyclidine. *Emerg.Med.Clin.North Am.* 8 (3):541-550, 1990.
18. Balu D. T., Carlson G. C., Talbot K., Kazi H., Hill-Smith T. E., Easton R. M., Birnbaum M. J. and Lucki I. Akt1 deficiency in schizophrenia and impairment of hippocampal plasticity and function. *Hippocampus*, 2010.
19. Balu D. T. and Coyle J. T. Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 35 (3):848-870, 2011.
20. Bantick R. A., De Vries M. H. and Grasby P. M. The effect of a 5-HT1A receptor agonist on striatal dopamine release. *Synapse* 57 (2):67-75, 2005.
21. Barnes N. M. and Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38 (8):1083-1152, 1999.
22. Bartha R., Williamson P. C., Drost D. J., Malla A., Carr T. J., Cortese L., Canaran G., Rylett R. J. and Neufeld R. W. Measurement of glutamate and glutamine in the medial prefrontal cortex of never-treated schizophrenic patients and healthy controls by proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch.Gen.Psychiatry* 54 (10):959-965, 1997.
23. Becker A. and Grecksch G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 28 (8):1267-1277, 2004.
24. Beckmann H. and Franzek E. The genetic heterogeneity of "schizophrenia". *World J.Biol.Psychiatry* 1 (1):35-41, 2000.
25. Belforte J. E., Zsiros V., Sklar E. R., Jiang Z., Yu G., li Y., Quinlan E. M. and Nakazawa K. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci.* 13 (1): 76-83, 2010
26. Beresewicz M. Scaffold proteins (MAGUK, Shank and Homer) in postsynaptic density in the central nervous system. *Postepy Biochem.* 53 (2):188-197, 2007.
27. Berman D. M., Kozasa T. and Gilman A. G. The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J.Biol.Chem.* 271 (44):27209-27212, 1996.
28. Blier P. and Ward N. M. Is there a role for 5-HT1A agonists in the treatment of depression? *Biol.Psychiatry* 53 (3):193-203, 2003.
29. Braff D. L. and Geyer M. A. Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies. *Arch.Gen.Psychiatry* 47 (2):181-188, 1990.
30. Breier A., Schreiber J. L., Dyer J. and Pickar D. National Institute of Mental Health longitudinal study of chronic schizophrenia. Prognosis and predictors of outcome. *Arch.Gen.Psychiatry* 48 (3):239-246, 1991.
31. Breier A., Su T. P., Saunders R., Carson R. E., Kolachana B. S., de Bartolomeis A., Weinberger D. R., Weisenfeld N., Malhotra A. K., Eckelman W. C. and Pickar D. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine

- concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (6):2569-2574, 1997.
32. Brugg B. and Matus A. Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J.Cell Biol.* 114 (4):735-743, 1991.
 33. Brunet A., Datta S. R. and Greenberg M. E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11 (3):297-305, 2001.
 34. Brzustowicz L. M., Hodgkinson K. A., Chow E. W., Honer W. G. and Bassett A. S. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 288 (5466):678-682, 2000.
 35. Bubenikova-Valesova V., Votava M., Palenicek T. and Horacek J. The opposite effect of a low and a high dose of serotonin-1A agonist on behavior induced by MK-801. *Neuropharmacology* 52 (4):1071-1078, 2007.
 36. Bubenikova-Valesova V., Horacek J., Vrajova M. and Hoschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 32 (5):1014-1023, 2008.
 37. Bubenikova-Valesova V., Svoboda J., Horacek J. and Sumiyoshi T. Effect of tandospirone, a serotonin-1A receptor partial agonist, on information processing and locomotion in dizocilpine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)* 212 (2):267-276, 2010.
 38. Bubenikova V., Votava M., Horacek J., Palenicek T. and Dockery C. The effect of zotepine, risperidone, clozapine and olanzapine on MK-801-disrupted sensorimotor gating. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 80 (4):591-596, 2005.
 39. Burnet P. W., Eastwood S. L. and Harrison P. J. [3H]WAY-100635 for 5-HT1A receptor autoradiography in human brain: a comparison with [3H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem.Int.* 30 (6):565-574, 1997.
 40. Bustos G., Abarca J., Forray M. I., Gysling K., Bradberry C. W. and Roth R. H. Regulation of excitatory amino acid release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum: in vivo microdialysis studies. *Brain Res.* 585 (1-2):105-115, 1992.
 41. Callicott J. H., Straub R. E., Pezawas L., Egan M. F., Mattay V. S., Hariri A. R., Verchinski B. A., Meyer-Lindenberg A., Balkissoon R., Kolachana B., Goldberg T. E. and Weinberger D. R. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 (24):8627-8632, 2005.
 42. Carli M., Luschi R., Garofalo P. and Samanin R. 8-OH-DPAT impairs spatial but not visual learning in a water maze by stimulating 5-HT1A receptors in the hippocampus. *Behav.Brain Res.* 67 (1):67-74, 1995.
 43. Carlson N. *Physiology of behaviour*, Pearson Education Inc., 2004.

44. Carlsson A., Waters N., Holm-Waters S., Tedroff J., Nilsson M. and Carlsson M. L. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 41:237-260, 2001.
45. Chowdari K. V., Mirnics K., Semwa P. I., Wood J., Lawrence E., Bhatia T., Deshpande S. N., Ferrell R. E., Middleton F. A., Devlin B., Levitt P., Lewis D. A. and Nimgaonkar V. L.. Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum.Mol.Genet.* 11 (12):1373-1380, 2002.
46. Chowdari K. V., Bamne M., Wood J. M., Talkowski M. E., Mirnics K., Levitt P., Lewis D. A. and Nimgaonkar V. L. Linkage disequilibrium patterns and functional analysis of RGS4 polymorphisms in relation to schizophrenia. *Schizophr.Bull.* 34 (1):118-126, 2008.
47. Chubb J. E., Bradshaw N. J., Soares D. C., Porteous D. J. and Millar J. K. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol.Psychiatry* 13 (1):36-64, 2008.
48. Chung H. J., Huang Y. H., Lau L. F. and Haganir R. L. Regulation of the NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand. *J.Neurosci.* 24 (45):10248-10259, 2004.
49. Cole B. J., Jones G. H. and Turner J. D. 5-HT_{1A} receptor agonists improve the performance of normal and scopolamine-impaired rats in an operant delayed matching to position task. *Psychopharmacology (Berl)* 116 (2):135-142, 1994.
50. Collingridge G. L., Isaac J. T. and Wang Y. T. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat.Rev.Neurosci.* 5 (12):952-962, 2004.
51. Collinson N. and Dawson G. R. On the elevated plus-maze the anxiolytic-like effects of the 5-HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT, but not the anxiogenic-like effects of the 5-HT_{1A} partial agonist, buspirone, are blocked by the 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635. *Psychopharmacology (Berl)* 132 (1):35-43, 1997.
52. Cousins S. L., Papadakis M., Rutter A. R. and Stephenson F. A. Differential interaction of NMDA receptor subtypes with the post-synaptic density-95 family of membrane associated guanylate kinase proteins. *J.Neurochem.* 104 (4):903-913, 2008.
53. Craven R. Ketamine. *Anaesthesia* 62 Suppl 1:48-53, 2007.
54. Crow T. J. Positive and negative schizophrenia symptoms and the role of dopamine. *Br.J.Psychiatry* 139:251-254, 1981.
55. Cruz D. A., Eggan S. M., Azmitia E. C. and Lewis D. A. Serotonin_{1A} receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 161 (4):739-742, 2004.
56. Cuthbert P. C., Stanford L. E., Coba M. P., Ainge J. A., Fink A. E., Opazo P., Delgado J. Y., Komiyama N. H., O'Dell T. J. and Grant S. G. Synapse-associated protein 102/dlg3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies. *J.Neurosci.* 27 (10):2673-2682, 2007.

57. Dall'Olio R., Gaggi R., Bonfante V. and Gandolfi O. The non-competitive NMDA receptor blocker dizocilpine potentiates serotonergic function. *Behav.Pharmacol.* 10 (1):63-71, 1999.
58. Davis S., Renaudineau S., Poirier R., Poucet B., Save E. and Laroche S. The formation and stability of recognition memory: what happens upon recall? *Front Behav.Neurosci.* 4:177, 2010.
59. Dawe G. S. and Ratty A. K. The chakragati mouse: a mouse model for rapid in vivo screening of antipsychotic drug candidates. *Biotechnol.J.* 2 (11):1344-1352, 2007.
60. Dawe G. S., Nagarajah R., Albert R., Casey D. E., Gross K. W. and Ratty A. K. Antipsychotic drugs dose-dependently suppress the spontaneous hyperactivity of the chakragati mouse. *Neuroscience* 171 (1):162-172, 2010.
61. De Vries L., Zheng B., Fischer T., Elenko E. and Farquhar M. G. The regulator of G protein signaling family. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 40:235-271, 2000.
62. Dean B., Tomaskovic-Crook E., Opeskin K., Keks N. and Copolov D. No change in the density of the serotonin1A receptor, the serotonin4 receptor or the serotonin transporter in the dorsolateral prefrontal cortex from subjects with schizophrenia. *Neurochem.Int.* 34 (2):109-115, 1999.
63. Dean B. [3H]RX 821002 in human dorsolateral prefrontal cortex: no changes in postmortem tissue from subjects with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 119 (1-2):25-31, 2003.
64. Delay J., Deniker P. and Harl J. M. Therapeutic method derived from hiberno-therapy in excitation and agitation states. *Ann.Med.Psychol.(Paris)* 110 (2:2):267-273, 1952.
65. Den Boer J. A., Bosker F. J. and Slaap B. R. Serotonergic drugs in the treatment of depressive and anxiety disorders. *Hum.Psychopharmacol.* 15 (5):315-336, 2000.
66. Depoortere R., Auclair A. L., Bardin L., Bruins L., Kleven M. S., Colpaert F., Vacher B. and Newman-Tancredi A. F15063, a compound with D2/D3 antagonist, 5-HT 1A agonist and D4 partial agonist properties. III. Activity in models of cognition and negative symptoms. *Br.J.Pharmacol.* 151 (2):266-277, 2007.
67. Desbonnet L., Waddington J. L. and O'Tuathaigh C. M. Mutant models for genes associated with schizophrenia. *Biochem.Soc.Trans.* 37 (Pt 1):308-312, 2009.
68. Detera-Wadleigh S. D., Badner J. A., Berrettini W. H., Yoshikawa T., Goldin L. R., Turner G., Rollins D. Y., Moses T., Sanders A. R., Karkera J. D., Esterling L. E., Zeng J., Ferraro T. N., Guroff J. J., Kazuba D., Maxwell M. E., Nurnberger J. I. Jr. and Gershon E. S. A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (10):5604-5609, 1999.
69. Dhamodharan R. and Wadsworth P. Modulation of microtubule dynamic instability in vivo by brain microtubule associated proteins. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 4):1679-1689, 1995.
70. Didriksen M., Kreilgaard M. and Arnt J. Sertindole, in contrast to clozapine and olanzapine, does not disrupt water maze performance after acute or chronic treatment. *Eur.J.Pharmacol.* 542 (1-3):108-115, 2006.

71. Duncan G., Miyamoto S., Gu H., Lieberman J., Koller B. and Snouwaert J. Alterations in regional brain metabolism in genetic and pharmacological models of reduced NMDA receptor function. *Brain Res.* 951 (2):166-176, 2002.
72. Duncan G. E., Moy S. S., Knapp D. J., Mueller R. A. and Breese G. R. Metabolic mapping of the rat brain after subanesthetic doses of ketamine: potential relevance to schizophrenia. *Brain Res.* 787 (2):181-190,1998.
73. Duncan G. E., Moy S. S., Perez A., Eddy D. M., Zinzow W. M., Lieberman J. A., Snouwaert J. N. and Koller B. H. Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behav.Brain Res.* 153 (2):507-519, 2004.
74. Duncan G. E., Moy S. S., Lieberman J. A. and Koller B. H. Typical and atypical antipsychotic drug effects on locomotor hyperactivity and deficits in sensorimotor gating in a genetic model of NMDA receptor hypofunction. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 85 (3):481-491, 2006.
75. Dupre K. B., Eskow K. L., Barnum C. J. and Bishop C. Striatal 5-HT1A receptor stimulation reduces D1 receptor-induced dyskinesia and improves movement in the hemiparkinsonian rat. *Neuropharmacology* 55 (8):1321-1328, 2008.
76. Egan M. F., Hurd Y., Ferguson J., Bachus S. E., Hamid E. H. and Hyde T. M. Pharmacological and neurochemical differences between acute and tardive vacuous chewing movements induced by haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 127 (4):337-345, 1996.
77. Egan M. F., Straub R. E., Goldberg T. E., Yakub I., Callicott J. H., Hariri A. R., Mattay V. S., Bertolino A., Hyde T. M., Shannon-Weickert C., Aki M. I, Crook J., Vakkalanka R. K., Balkissoon R., Gibbs R. A., Kleinman J. E. and Weinberger D. R. Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (34):12604-12609, 2004.
78. Ekelund J., Lichtermann D., Hovatta I., Ellonen P., Suvisaari J., Terwilliger J. D., Juvonen H., Varilo T., Arajarvi R., Kokko-Sahin M. L., Lonqvist J. and Peltonen L. Genome-wide scan for schizophrenia in the Finnish population: evidence for a locus on chromosome 7q22. *Hum.Mol.Genet.* 9 (7):1049-1057, 2000.
79. Ekelund J., Hovatta I., Parker A., Paunio T., Varilo T., Martin R., Suhonen J., Ellonen P., Chan G., Sinsheimer J. S., Sobe E. I, Juvonen H., Arajarvi R., Partonen T., Suvisaari J., Lonqvist J., Meyer J. and Peltonen L.. Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum.Mol.Genet.* 10 (15):1611-1617, 2001.
80. Ekelund J., Hennah W., Hiekkalinna T., Parker A., Meyer J., Lonqvist J. and Peltonen L. Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees. *Mol.Psychiatry* 9 (11):1037-1041, 2004.
81. Emamian E. S., Hall D., Birnbaum M. J., Karayiorgou M. and Gogos J. A. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat.Genet.* 36 (2):131-137, 2004.
82. Fernández E, Collins M.O., Uren R.T., Kopanitsa M.V., Komiyama N. H., Croning M. D., Zografos L., Armstrong J. D., Choudhary J. S., Grant S. G. Targeted tandem affinity purification of PSD-95 recovers core postsynaptic complexes and schizophrenia susceptibility proteins. *Mol.Syst.Biol* (5):269, 2009.
83. Fornal C. A., Metzler C. W., Gallegos R. A., Veasey S. C., McCreary A. C. and Jacobs B. L. WAY-100635, a potent and selective 5-hydroxytryptamine1A antagonist,

increases serotonergic neuronal activity in behaving cats: comparison with (S)-WAY-100135. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 278 (2):752-762, 1996.

84. Forrest D., Yuzak M. i, Soares H. D., Ng L., Luk D. C., Sheng M., Stewart C. L., Morgan J. I., Connor J. A. and Curran T. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13 (2):325-338, 1994.
85. Fredriksson A., Archer T., Alm H., Gordh T. and Eriksson P. Neurofunctional deficits and potentiated apoptosis by neonatal NMDA antagonist administration. *Behav.Brain Res.* 153 (2):367-376, 2004.
86. Fujii Y., Shibata H., Kikuta R., Makino C., Tani A., Hirata N., Shibata A., Ninomiya H., Tashiro N. and Fukumaki Y. Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia. *Psychiatr.Genet.* 13 (2):71-76, 2003.
87. Garey L. J., Ong W. Y., Patel T. S., Kanani M., Davis A., Mortimer A. M., Barnes T. R. and Hirsch S. R. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 65 (4):446-453, 1998.
88. Geyer M. A., Krebs-Thomson K., Braff D. L. and Swerdlow N. R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156 (2-3):117-154, 2001.
89. Ghavami A., Hunt R. A., Olsen M. A., Zhang J., Smith D. L., Kalgaonkar S., Rahman Z. and Young K. H. Differential effects of regulator of G protein signaling (RGS) proteins on serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, and dopamine D₂ receptor-mediated signaling and adenylyl cyclase activity. *Cell Signal.* 16 (6):711-721, 2004.
90. Giros B., Jaber M., Jones S. R., Wightman R. M. and Caron M. G. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379 (6566):606-612, 1996.
91. Goff D. C., Tsai G., Manoach D. S. and Coyle J. T. Dose-finding trial of D-cycloserine added to neuroleptics for negative symptoms in schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 152 (8):1213-1215, 1995.
92. Gogos A., Kusljic S. and Van den Buuse M. 8-OH-DPAT-induced effects on prepulse inhibition: pre- vs. post-synaptic 5-HT_{1A} receptor activation. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 81 (3):664-672, 2005.
93. Gorter J. A. and de Bruin J. P. Chronic neonatal MK-801 treatment results in an impairment of spatial learning in the adult rat. *Brain Res.* 580 (1-2):12-17, 1992.
94. Gottesman I. I., Shields J. Schizophrenia: The epigenetic puzzle. *Cambridge University Press, Cambridge UK*, 1982.
95. Graham L.K., Kim J. J., Lee H. J., Yoon T. Strain and sex differences in fear conditioning: 22 kHz ultrasonic vocalizations and freezing in rats. *Psych Neurosci* (2):219-225, 2009.
96. Greer P. L. and Greenberg M. E. From synapse to nucleus: calcium-dependent gene transcription in the control of synapse development and function. *Neuron* 59 (6):846-860, 2008.

97. Gu Z., Jiang Q. and Yan Z. RGS4 modulates serotonin signaling in prefrontal cortex and links to serotonin dysfunction in a rat model of schizophrenia. *Mol.Pharmacol.* 71 (4):1030-1039, 2007.
98. Guillaud L., Setou M. and Hirokawa N. KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons. *J.Neurosci.* 23 (1):131-140, 2003.
99. Guillaud L., Wong R. and Hirokawa N. Disruption of KIF17-Mint1 interaction by CaMKII-dependent phosphorylation: a molecular model of kinesin-cargo release. *Nat.Cell Biol.* 10 (1):19-29, 2008.
100. Hamon, Paraire and Velluz. Effect of R. P. 4560 on maniacal agitation. *Ann.Med.Psychol.(Paris)* 110 (1:3):331-335, 1952.
101. Hamshere M. L., Bennett P., Williams N., Segurado R., Cardno A., Norton N., Lambert D., Williams H., Kirov G., Corvin A., Holmans P., Jones L., Jones I., Gill M., O'Donovan M. C., Owen M. J. and Craddock N. Genomewide linkage scan in schizoaffective disorder: significant evidence for linkage at 1q42 close to DISC1, and suggestive evidence at 22q11 and 19p13. *Arch.Gen.Psychiatry* 62 (10):1081-1088, 2005.
102. Harder J. A. and Ridley R. M. The 5-HT1A antagonist, WAY 100 635, alleviates cognitive impairments induced by dizocilpine (MK-801) in monkeys. *Neuropharmacology* 39 (4):547-552, 2000.
103. Harris B. R., Gibson D. A., Prendergast M. A., Blanchard J. A., Holley R. C., Hart S. R., Scotland R. L., Foster T. C., Pedigo N. W. and Littleton J. M. The neurotoxicity induced by ethanol withdrawal in mature organotypic hippocampal slices might involve cross-talk between metabotropic glutamate type 5 receptors and N-methyl-D-aspartate receptors. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 27 (11):1724-1735, 2003.
104. Harrison P. J. and Owen M. J. Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *Lancet* 361 (9355):417-419, 2003.
105. Harrison P. J. and Weinberger D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol.Psychiatry* 10 (1):40-68, 2005.
106. Hashimoto K. and Goromaru T. High affinity binding of [3H]6-nitroquipazine to cortical membranes in the rat: inhibition by 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxytryptamine uptake inhibitors. *Neuropharmacology* 30 (2):113-117, 1991.
107. Hashimoto R., Numakawa T., Ohnishi T., Kumamaru E., Yagasaki Y., Ishimoto T., Mori T., Nemoto K., Adachi N., Izumi A., Chiba S., Noguchi H., Suzuki T., Iwata N., Ozaki N., Taguchi T., Kamiya A., Kosuga A., Tatsumi M., Kamijima K., Weinberger D. R., Sawa A. and Kunugi H. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling. *Hum.Mol.Genet.* 15 (20):3024-3033, 2006.
108. Hatip-Al-Khatib I., Mishima K., Iwasaki K. and Fujiwara M. Microdialysates of amines and metabolites from core nucleus accumbens of freely moving rats are altered by dizocilpine. *Brain Res.* 902 (1):108-118, 2001.
109. Heaton R., Paulsen J. S., McAdams L. A., Kuck J., Zisook S., Braff D., Harris J. and Ještě D. V. Neuropsychological deficits in schizophrenics. Relationship to age, chronicity, and dementia. *Arch.Gen.Psychiatry* 51 (6):469-476, 1994.
110. Hensler J. G. Regulation of 5-HT1A receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. *Life Sci.* 72 (15):1665-1682, 2003.

111. Heresco-Levy U. Glutamatergic neurotransmission modulation and the mechanisms of antipsychotic atypicality. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27 (7):1113-1123, 2003.
112. Honey G. D., Corlett P. R., Absalom A. R., Lee M., Pomarol-Clotet E., Murray G. K., McKenna P. J., Bullmore E. T., Menon D. K. and Fletcher P. C. Individual differences in psychotic effects of ketamine are predicted by brain function measured under placebo. *J.Neurosci.* 28 (25):6295-6303, 2008.
113. Horáček J. Mechanismus účinku atypických antipsychotik a neurobiologie schizofrenie. *Psychiatrie.* (8):293-303, 2004.
114. Horacek J., Bubenikova-Valesova V., Kopecek M., Palenicek T., Dockery C., Mohr P. and Hoschl C. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS.Drugs* 20 (5):389-409, 2006.
115. Höschl C., Libiger J. Švestka J. *Psychiatrie*, Tigris 2. vydání. 352-412, 2004.
116. Hovatta I., Varilo T., Suvisaari J., Terwilliger J. D., Ollikainen V., Arajärvi R., Juvonen H., Kokko-Sahin M. L., Vaisanen L., Mannila H., Lonnqvist J. and Peltonen L. A genomewide screen for schizophrenia genes in an isolated Finnish subpopulation, suggesting multiple susceptibility loci. *Am.J.Hum.Genet.* 65 (4):1114-1124, 1999.
117. Hoyer D., Hannon J. P. and Martin G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 71 (4):533-554, 2002.
118. Ikeda M., Iwata N., Suzuki T., Kitajima T., Yamanouchi Y., Kinoshita Y., Inada T., and Ozaki N. Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population. *Biol.Psychiatry* 56 (9):698-700, 2004.
119. Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vockler J., Dikranian K., Tenkova T. I., Stefovská V., Turski L. and Olney J.W. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283 (5398):70-74, 1999.
120. Ingebritsen T.S. and Cohen P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221 (4608):331-338, 1983.
121. Ishibashi T., Horisawa T., Tokuda K., Ishiyama T., Ogasa M., Tagashira R., Matsumoto K., Nishikawa H., Ueda Y., Toma S., Oki H., Tanno N., Saji I., Ito A., Ohno Y. and
122. Ishiyama T., Tokuda K., Ishibashi T., Ito A., Toma S., and Ohno Y. Lurasidone (SM-13496), a novel atypical antipsychotic drug, reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the rat passive-avoidance test. *Eur.J.Pharmacol.* 572 (2-3):160-170, 2007.
123. Itoh T. J., Hisanaga S., Hosoi T., Kishimoto T. and Hotani H. Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry* 36 (41):12574-12582, 1997.
124. Iwamoto T., Yamada Y., Hori K., Watanabe Y., Sobue K. and Inui M. Differential modulation of NR1-NR2A and NR1-NR2B subtypes of NMDA receptor by PDZ domain-containing proteins. *J.Neurochem.* 89 (1):100-108, 2004.
125. Jaaro-Peled H., Ayhan Y., Pletnikov M. V. and Sawa A. Review of pathological hallmarks of schizophrenia: comparison of genetic models with patients and nongenetic models. *Schizophr.Bull.* 36 (2):301-313, 2010.

126. Jablensky A., Sartorius N., Ernberg G., Anker M., Korten A., Cooper J. E., Day R., and Bertelsen A. Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. A World Health Organization ten-country study. *Psychol.Med.Monogr Suppl* 20:1-97, 1992.
127. Javitt D. C. and Zukin S. R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 148 (10):1301-1308, 1991.
128. Jeltsch H., Bertrand F., Galani R., Lazarus C., Schimchowitsch S. and Cassel J. C. Intraseptal injection of the 5-HT_{1A}/5-HT₇ agonist 8-OH-DPAT and working memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 175 (1):37-46, 2004.
129. Jentsch J. D., Tran A., Le D., Youngren K. D. and Roth R. H. Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat. *Neuropsychopharmacology* 17 (2):92-99, 1997.
130. Jentsch J. D. and Roth R. H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20 (3):201-225, 1999.
131. Johnson J. W. and Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325 (6104):529-531, 1987.
132. Joyce J. N., Shane A., Lexow N., Winokur A., Casanova M. F. and Kleinman J. E. Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 8 (4):315-336, 1993.
133. Kalus P., Muller T. J., Zuschratter W., and D. Senitz D. The dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenic patients. *Neuroreport* 11 (16):3621-3625, 2000.
134. Kane J. M. and Marder S. R. Psychopharmacologic treatment of schizophrenia. *Schizophr.Bull.* 19 (2):287-302, 1993.
135. Kapur S. and Seeman P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2)receptors-implications for models of schizophrenia. *Mol.Psychiatry* 7 (8):837-844, 2002.
136. Kia H. K., Brisorgueil M. J., Hamon M. Calas A. and Verge D. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat brain. *J.Neurosci.Res.* 46 (6):697-708, 1996.
137. Kim J. S., Kornhuber H. H., Schmid-Burgk W. and Holzmuller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci.Lett.* 20 (3):379-382, 1980.
138. King M. V., Marsden C. A. and Fone K. C. A role for the 5-HT(1A), 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory. *Trends Pharmacol.Sci.* 29 (9):482-492, 2008.
139. Kirkpatrick B., Conley R. C., Kakoyannis A., Reep R. L. and Roberts R. C. Interstitial cells of the white matter in the inferior parietal cortex in schizophrenia: An unbiased cell-counting study. *Synapse* 34 (2):95-102, 1999.
140. Kleckner N. W. and Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241 (4867):835-837, 1988.

141. Kochhar A., Zivin J. A. and Mazzarella V. Pharmacologic studies of the neuroprotective actions of a glutamate antagonist in ischemia. *J.Neurotrauma* 8 (3):175-186, 1991.
142. Kondziella D., Brenner E., Eyjolfsson E. M., Markinhuhta K. R., Carlsson M. L. and Sonnewald U. Glial-neuronal interactions are impaired in the schizophrenia model of repeated MK801 exposure. *Neuropsychopharmacology* 31 (9):1880-1887, 2006.
143. Konradi C. and Heckers S. Antipsychotic drugs and neuroplasticity: insights into the treatment and neurobiology of schizophrenia. *Biol.Psychiatry* 50 (10):729-742, 2001.
144. Konradi C. and Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol.Ther.* 97 (2):153-179, 2003.
145. Kowalski R. J. and Williams R. C. Jr. Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *J.Biol.Chem.* 268 (13):9847-9855, 1993.
146. Kravariti E., Dixon T., Frith C., Murray R. and McGuire P. Association of symptoms and executive function in schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr.Res.* 74 (2-3):221-231, 2005.
147. Krebs H. A. Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids. *Biochem.J.* 29 (7):1620-1644, 1935.
148. Kristiansen L. V., Huerta I., Beneyto M. and Meador-Woodruff J. H. NMDA receptors and schizophrenia. *Curr.Opin.Pharmacol.* 7 (1):48-55, 2007.
149. Krystal J. H., Karper L. P., Seibyl J. P., Freeman G.K., Delaney R., Bremner J. D., Heninger G. R., Bowers M. B., Jr. and Charney D.S. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch.Gen.Psychiatry* 51 (3):199-214, 1994.
150. Krystal J. H., D'Souza D. C., Karper L. P., Bennett A., Abi-Dargham A., Abi-Saab D., Cassello K., Bowers M. B. Jr., Vegso S., Heninger G. R. and Charney D. S. Interactive effects of subanesthetic ketamine and haloperidol in healthy humans. *Psychopharmacology (Berl)* 145 (2):193-204, 1999.
151. Kumamoto N., Matsuzaki S., Inoue K., Hattori T., Shimizu S., Hashimoto R., Yamatodani A., Katayama T. and Tohyama M. Hyperactivation of midbrain dopaminergic system in schizophrenia could be attributed to the down-regulation of dysbindin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 345 (2):904-909, 2006.
152. Kutsuwada T., Sakimura K., Manabe T., Takayama C., Katakura N., Kushiya E., Natsume R., Watanabe M., Inoue Y., Yagi T., Aizawa S., Arakawa M., Takahashi T., Nakamura Y., Mori H. and Mishina M. Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice. *Neuron* 16 (2):333-344, 1996.
153. Lahti A. C., Koffel B., LaPorte D. and Tamminga C. A. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13 (1):9-19, 1995.
154. Lahti A. C., Weiler M. A., Tamara Michaelidis B. A., Parwani A. and Tamminga C. A. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25 (4):455-467, 2001.

155. Langsjo J. W., Kaisti K. K., Aalto S., Hinkka S., Aantaa R., Oikonen V., Sipila H., Kurki T., Silvanto M. and Scheinin H. Effects of subanesthetic doses of ketamine on regional cerebral blood flow, oxygen consumption, and blood volume in humans. *Anesthesiology* 99 (3):614-623, 2003.
156. Large C. H. Do NMDA receptor antagonist models of schizophrenia predict the clinical efficacy of antipsychotic drugs? *J.Psychopharmacol.* 21 (3):283-301, 2007.
157. Lavezzari G., McCallum J., Dewey C. M. and Roche K. W. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J.Neurosci.* 24 (28):6383-6391, 2004.
158. Law A. J., Weickert C. S., Webster M. J., Herman M. M., Kleinman J. E. and Harrison P. J. Expression of NMDA receptor NR1, NR2A and NR2B subunit mRNAs during development of the human hippocampal formation. *Eur.J.Neurosci.* 18 (5):1197-1205, 2003.
159. Lehrer D. S., Christian B. T., Mantil J., Murray A. C., Buchsbaum B. R., Oakes T. R., Byne W., Kemether E. M. and Buchsbaum M. S. Thalamic and prefrontal FDG uptake in never medicated patients with schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 162 (5):931-938, 2005.
160. Leucht S., Barnes T. R., Kissling W., Enge R. R., Correll I. C. and Kane J. M. Relapse prevention in schizophrenia with new-generation antipsychotics: a systematic review and exploratory meta-analysis of randomized, controlled trials. *Am.J.Psychiatry* 160 (7):1209-1222, 2003.
161. Leucht S., Corves C., Arbter D., Engel R. R., Li C. and Davis J. M. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 373 (9657):31-41, 2009.
162. Lewander T. Neuroleptics and the neuroleptic-induced deficit syndrome. *Acta Psychiatr.Scand.Suppl* 380:8-13, 1994.
163. Lewis D. A. and Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu.Rev.Neurosci.* 25:409-432, 2002.
164. Lewis D. A. and Gonzalez-Burgos G. Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 33 (1):141-165, 2008.
165. Liddle P. F. The symptoms of chronic schizophrenia. A re-examination of the positive-negative dichotomy. *Br.J.Psychiatry* 151:145-151, 1987.
166. Lillrank S. M., O'Connor W. T., Saransaari P. and Ungerstedt U. In vivo effects of local and systemic phencyclidine on the extracellular levels of catecholamines and transmitter amino acids in the dorsolateral striatum of anaesthetized rats. *Acta Physiol Scand.* 150 (2):109-115, 1994.
167. Lin Y., Skeberdis V. A., Francesconi A., Bennett M. V. and Zukin R. S. Postsynaptic density protein-95 regulates NMDA channel gating and surface expression. *J.Neurosci.* 24 (45):10138-10148, 2004.
168. Lindahl J. S. and Keifer J. Glutamate receptor subunits are altered in forebrain and cerebellum in rats chronically exposed to the NMDA receptor antagonist phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* 29 (11):2065-2073, 2004.

169. Lindefors N., Barati S. and O'Connor W. T. Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain Res.* 759 (2):205-212, 1997.
170. Lindsley C. W., Shipe W. D., Wolkenberg S. E., Theberge C. R., Williams D. L., Jr., Sur C. and Kinney G. G. Progress towards validating the NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. *Curr.Top.Med.Chem.* 6 (8):771-785, 2006.
171. Linn G. S., O'Keeffe R. T., Lifshitz K., Schroeder C. and Javitt D. C. Behavioral effects of orally administered glycine in socially housed monkeys chronically treated with phencyclidine. *Psychopharmacology (Berl)* 192 (1):27-38, 2007.
172. Lipska B. K. and Weinberger D. R. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23 (3):223-239, 2000.
173. Lodge D. J. and Grace A. A. Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia. *Behav.Brain Res.* 204 (2):306-312, 2009.
174. Loftis J. M. and Janowsky A. The N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2B: localization, functional properties, regulation, and clinical implications. *Pharmacol.Ther.* 97 (1):55-85, 2003.
175. Luttgen M., Elvander E., Madjid N. and Ogren S. O. Analysis of the role of 5-HT_{1A} receptors in spatial and aversive learning in the rat. *Neuropharmacology* 48 (6):830-852, 2005.
176. Madjid N., Tottie E. E., Luttgen M., Meister B., Sandin J., Kuzmin A., Stiedl O. and Ogren S. O. 5-Hydroxytryptamine 1A receptor blockade facilitates aversive learning in mice: interactions with cholinergic and glutamatergic mechanisms. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 316 (2):581-591, 2006.
177. Maj J., Rogoz Z., Skuza G. and Wedzony K. The synergistic effect of fluoxetine on the locomotor hyperactivity induced by MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist. *J.Neural Transm.* 103 (1-2):131-146, 1996.
178. Marchese G., Casu M. A., Bartholini F., Ruiu S., Saba P., Gessa G. L. and Pani L. Sub-chronic treatment with classical but not atypical antipsychotics produces morphological changes in rat nigro-striatal dopaminergic neurons directly related to "early onset" vacuous chewing. *Eur.J.Neurosci.* 15 (7):1187-1196, 2002.
179. Martin P., Carlsson M. L. and Hjorth S. Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. *Neuroreport* 9 (13):2985-2988, 1998.
180. McCullough L. D. and Salamone J. D. Involvement of nucleus accumbens dopamine in the motor activity induced by periodic food presentation: a microdialysis and behavioral study. *Brain Res.* 592 (1-2):29-36, 1992.
181. McGrath J., Saha S., Welham J., El Saadi O., MacCauley C., and Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC.Med.* 2:13, 2004.
182. Meltzer H. Y. Treatment of suicidality in schizophrenia. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 932:44-58, 2001.

183. Meltzer H. Y., Li Z., Kaneda Y. and Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27 (7):1159-1172, 2003.
184. Meltzer H. Y. and Sumiyoshi T. Does stimulation of 5-HT(1A) receptors improve cognition in schizophrenia? *Behav.Brain Res.* 195 (1):98-102, 2008.
185. Meneses A. and Perez-Garcia G. 5-HT(1A) receptors and memory. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 31 (5):705-727, 2007.
186. Mignon L. and Wolf W. A. Postsynaptic 5-HT(1A) receptors mediate an increase in locomotor activity in the monoamine-depleted rat. *Psychopharmacology (Berl)* 163 (1):85-94, 2002.
187. Millar J. K., Wilson-Annan J. C., Anderson S., Christie S., Taylor M. S., Semple C. A., Devon R. S., St Clair D. M., Muir W. J., Blackwood D. H. and Porteous D. J. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum.Mol.Genet.* 9 (9):1415-1423, 2000.
188. Miller S. G. and Kennedy M. B. Regulation of brain type II Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca²⁺-triggered molecular switch. *Cell* 44 (6):861-870, 1986.
189. Mirnics K., Middleton F. A., Stanwood G. D., Lewis D. A. and Levitt P. Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol.Psychiatry* 6 (3):293-301, 2001.
190. Moghaddam B., Adams B., Verma A. and Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J.Neurosci.* 17 (8):2921-2927, 1997.
191. Moghaddam B. Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron* 40 (5):881-884, 2003.
192. Mohn A. R., Gainetdinov R. R., Caron M. G. and Koller B. H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98 (4):427-436, 1999.
193. Morgan J. C., Muetzelfeldt L. and Curran H. V. Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction* 105 (1):121-133, 2010.
194. Mortimer A. M. Cognitive function in schizophrenia do neuroleptics make a difference? *Pharmacol.Biochem.Behav.* 56 (4):789-795, 1997.
195. Murotani T., Ishizuka T., Hattori S., Hashimoto R., Matsuzaki S. and Yamatodani A. High dopamine turnover in the brains of Sandy mice. *Neurosci.Lett.* 421 (1):47-51, 2007.
196. Murthy S. S., Tosolini A., Taguchi T. and Testa J. R. Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* 88 (1-2):38-40, 2000.
197. Mutlu O., Ulak G., Celikyurt I. K., Akar F. Y. and Erden F. Effects of olanzapine, sertindole and clozapine on learning and memory in the Morris water maze test in naive and MK-801-treated mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 98 (3):398-404, 2011.

198. Nakamura M., Ogasa M., Guarino J., Phillips D., Severs J., Cucchiaro J. and Loebel A. Lurasidone in the treatment of acute schizophrenia: a double-blind, placebo-controlled trial. *J.Clin.Psychiatry* 70 (6):829-836, 2009.
199. Nakamura M. Pharmacological profile of lurasidone, a novel antipsychotic agent with potent 5-hydroxytryptamine 7 (5-HT7) and 5-HT1A receptor activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 334 (1):171-181, 2010.
200. Neal-Beliveau B. S., Joyce J. N. and Lucki I. Serotonergic involvement in haloperidol-induced catalepsy. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 265 (1):207-217, 1993.
201. Newcomer J. W. Antipsychotic medications: metabolic and cardiovascular risk. *J.Clin.Psychiatry* 68 Suppl 4:8-13, 2007.
202. Nicolson R., Lenane M., Hamburger S. D., Fernandez T., Bedwell J. and Rapoport J. L. Lessons from childhood-onset schizophrenia. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 31 (2-3):147-156, 2000.
203. Numakawa T., Yagasaki Y., Ishimoto T., Okada T., Suzuki T., Iwata N., Ozaki N., Taguchi T., Tatsumi M., Kamijima K., Straub R. E., Weinberge D. R., Kunugi H. and Hashimoto R. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum.Mol.Genet.* 13 (21):2699-2708, 2004.
204. Ogren S. O., Eriksson T. M., Elvander-Tottie E., D'Addario C., Ekstrom J. C., Svenningsson P., Meister B., Kehr J. and Stiedl O. The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory. *Behav.Brain Res.* 195 (1):54-77, 2008.
205. Oh S., Kim Y. H., Hann H. J., Lee L., Choi H. S., Kim H. S. and Ho I. K. Modulation of the levels of NMDA receptor subunit mRNA and the bindings of [3H]MK-801 in rat brain by chronic infusion of subtoxic dose of MK-801. *Neurochem.Res.* 26 (5):559-565, 2001.
206. Ohno Y., Ishida-Tokuda K., Ishibashi T., Sakamoto H., Tagashira R., Horisawa T., Yabuuti K., Matsumoto K., Kawabe A. and Nakamura M. Potential role of 5-HT2 and D2 receptor interaction in the atypical antipsychotic action of the novel succinimide derivative, perospirone. *Pol.J.Pharmacol.* 49 (4):213-219, 1997.
207. Ohno Y., Shimizu S., Imaki J., Ishihara S., Sofue N., Sasa M. and Kawai Y. Anticataleptic 8-OH-DPAT preferentially counteracts with haloperidol-induced Fos expression in the dorsolateral striatum and the core region of the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 55 (5):717-723, 2008.
208. Ohno Y., Shimizu S. and Imaki J. Effects of tandospirone, a 5-HT1A agonistic anxiolytic agent, on haloperidol-induced catalepsy and forebrain Fos expression in mice. *J.Pharmacol.Sci.* 109 (4):593-599, 2009.
209. Olney J. W., Ikonomidou C., Mosinger J. L. and Frierdich G. MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain. *J.Neurosci.* 9 (5):1701-1704, 1989.
210. Olney J. W., Labruyere J., Wang G., Wozniak D. F., Price M. T. and Sesma M. A. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254 (5037):1515-1518, 1991.
211. Osby U., Correia N., Brandt L., Ekbohm A., and Sparen P. Mortality and causes of death in schizophrenia in Stockholm county, Sweden. *Schizophr.Res.* 45 (1-2):21-28, 2000.

212. Owen R. R., Thrush C. R., Hudson T. J., Mallory S. R., Fischer E. P., Clardy J. A., and Williams D. K. Using an explicit guideline-based criterion and implicit review to assess antipsychotic dosing performance for schizophrenia. *Int.J.Qual.Health Care* 14 (3):199-206, 2002.
213. Ozawa S., Kamiya H. and Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog.Neurobiol.* 54 (5):581-618, 1998.
214. Palchadhuri M. and Flugge G. 5-HT1A receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res.* 321 (2):159-172, 2005.
215. Parsons C. G., Quack G., Bresink I., Baran L., Przegalinski E., Kostowski W., Krzascik P., Hartmann S. and Danysz W. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of a series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 34 (10):1239-1258, 1995.
216. Parwani A., Weiler M. A., Blaxton T. A., Warfel D., Hardin M., Frey K. and Lahti A. C. The effects of a subanesthetic dose of ketamine on verbal memory in normal volunteers. *Psychopharmacology (Berl)* 183 (3):265-274, 2005.
217. Pilowsky L. S., Bressan R. A., Stone J. M., Erlandsson K., Mulligan R. S., Krystal J. H. and Eil P. J. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol.Psychiatry* 11 (2):118-119, 2006.
218. Pitsikas N., Boultadakis A. and Sakellaridis N. Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience* 154 (2):454-460, 2008.
219. Powell S. B., Zhou X. and Geyer M. A. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav.Brain Res.* 204 (2):282-294, 2009.
220. Preston G. A. and Weinberger D. R. Intermediate phenotypes in schizophrenia: a selective review. *Dialogues.Clin.Neurosci.* 7 (2):165-179, 2005.
221. Prinssen E. P., Colpaert F. C. and Koek W. 5-HT1A receptor activation and anti-cataleptic effects: high-efficacy agonists maximally inhibit haloperidol-induced catalepsy. *Eur.J.Pharmacol.* 453 (2-3):217-221, 2002.
222. Pucadyil T. J., Kalipatnapu S. and Chattopadhyay A. The serotonin1A receptor: a representative member of the serotonin receptor family. *Cell Mol.Neurobiol.* 25 (3-4):553-580, 2005.
223. Quartermain D., Clemente J. and Shemer A. 5-HT1A agonists disrupt memory of fear conditioning in mice. *Biol.Psychiatry* 33 (4):247-254, 1993.
224. Rajkowska G., Selemon L. D., and Goldman-Rakic P. S. Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch.Gen.Psychiatry* 55 (3):215-224, 1998.
225. Rasmussen B. A., O'Neil J., Manaye K. F., Perry D. C. and Tizabi Y. Long-term effects of developmental PCP administration on sensorimotor gating in male and female rats. *Psychopharmacology (Berl)* 190 (1):43-49, 2007.
226. Ratty A. K., Fitzgerald L. W., Titeler M., Glick S. D., Mullins J. J. and Gross K. W. Circling behavior exhibited by a transgenic insertional mutant. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 8 (4):355-358, 1990.

227. Raymond J. R., Mukhin Y. V., Gettys T. W. and Garnovskaya M. N.. The recombinant 5-HT_{1A} receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br.J.Pharmacol.* 127 (8):1751-1764, 1999.
228. Remington G. Understanding antipsychotic "atypicality": a clinical and pharmacological moving target. *J.Psychiatry Neurosci.* 28 (4):275-284, 2003.
229. Rigdon G. C. and Weatherspoon J. K. 5-Hydroxytryptamine 1a receptor agonists block prepulse inhibition of acoustic startle reflex. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 263 (2):486-493, 1992.
230. Risgaard R., Hansen K. B. and Clausen R. P. Partial agonists and subunit selectivity at NMDA receptors. *Chemistry.* 16 (47):13910-13918, 2010.
231. Roche K. W., Standley S., McCallum J., Dune Ly C., Ehlers M. D. and Wenthold R. J. Molecular determinants of NMDA receptor internalization. *Nat.Neurosci.* 4 (8):794-802, 2001.
232. Ross C. A., Margolis R. L., Reading S. A., Pletnikov M., and J. T. Coyle J. T. Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52 (1):139-153, 2006.
233. Roth B. L. Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects. *Ann.Clin.Psychiatry* 6 (2):67-78, 1994.
234. Rujescu D., Bender A., Keck M., Hartmann A. M., Ohl F., Raeder H., Giegling I., Genius J., McCarley R. W., Moller H. J. and Grunze H. A pharmacological model for psychosis based on N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction: molecular, cellular, functional and behavioral abnormalities. *Biol.Psychiatry* 59 (8):721-729, 2006.
235. Saha S., Chant D., Welham J., and McGrath J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS.Med.* 2 (5):e141, 2005.
236. Salter M. W. and Kalia L. V. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat.Rev.Neurosci.* 5 (4):317-328, 2004.
237. Sanchez C., Perez M. and Avila J. GSK3beta-mediated phosphorylation of the microtubule-associated protein 2C (MAP2C) prevents microtubule bundling. *Eur.J.Cell Biol.* 79 (4):252-260, 2000.
238. Schulz B., Fendt M., Pedersen V. and Koch M. Sensitization of prepulse inhibition deficits by repeated administration of dizocilpine. *Psychopharmacology (Berl)* 156 (2-3):177-181, 2001.
239. Schwab S. G., Hoefgen B., Hanses C., Hassenbach M. B., Albus M., Lerer B., Trixler M., Maier W and Wildenauer D. B. Further evidence for association of variants in the AKT1 gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families. *Biol.Psychiatry* 58 (6):446-450, 2005.
240. Seeman P., Weinschenker D., Quirion R., Srivastava L. K., Bhardwaj S. K., Grandy D. K., Premont R. T., Sotnikova T. D., Boksa P., Ghundi M. El, O'dowd B. F., George S. R., Perreault M. L., Mannisto P. T., Robinson S., Palmiter R. D. and Tallerico T. Dopamine supersensitivity correlates with D₂High states, implying many paths to psychosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102 (9):3513-3518, 2005.
241. Seeman P., Caruso C. and Lasaga M. Memantine agonist action at dopamine D₂High receptors. *Synapse* 62 (2):149-153, 2008.

242. Setou M., Nakagawa T., Seog D. H. and Hirokawa N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 288 (5472):1796-1802, 2000.
243. Sheng M., Cummings J., Roldan L. A., Jan Y. N., and Jan L. Y. Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368 (6467):144-147, 1994.
244. Shimizu S., Tatara A., Imaki J. and Ohno Y. Role of cortical and striatal 5-HT1A receptors in alleviating antipsychotic-induced extrapyramidal disorders. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 34 (6):877-881, 2010.
245. Sipes T. A. and Geyer M. A. 8-OH-DPAT disruption of prepulse inhibition in rats: reversal with (+)WAY 100,135 and localization of site of action. *Psychopharmacology (Berl)* 117 (1):41-48, 1995.
246. Sircar R. and Rudy J. W. Repeated neonatal phencyclidine treatment impairs performance of a spatial task in juvenile rats. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 844:303-309, 1998.
247. Sircar R. Postnatal phencyclidine-induced deficit in adult water maze performance is associated with N-methyl-D-aspartate receptor upregulation. *Int.J.Dev.Neurosci.* 21 (3):159-167, 2003.
248. Skarsfeldt T. Differential effect of antipsychotics on place navigation of rats in the Morris water maze. A comparative study between novel and reference antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* 124 (1-2):126-133, 1996.
249. Smolík P. Duševní a behaviorální poruchy. Praha: Maxdorf, 1996
250. Sora I., Hall F. S., Andrews A. M., Itokawa M., Li X. S., Wei H. B., Wichems C., Lesch K. P., Murphy D. L. and Uhl G. R. Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (9):5300-5305, 2001.
251. Soyka M., Koch W., Moller H. J., Ruther T. and Tatsch T. Hypermetabolic pattern in frontal cortex and other brain regions in unmedicated schizophrenia patients. Results from a FDG-PET study. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 255 (5):308-312, 2005.
252. St Clair D., Blackwood D., Muir W., Carothers A., Walker M., Spowart G., Gosden C. and Evans H. J. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet* 336 (8706):13-16, 1990.
253. Stefani M. R. and Moghaddam B. Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. *Biol.Psychiatry* 57 (4):433-436, 2005.
254. Stefanovic A., Brandner B., Klaassen E., Cregg R., Nagaratnam M., Bromley L. M., Das R. K., Rossell S. L., Morgan C. J. and Curran H. V. Acute and chronic effects of ketamine on semantic priming: modeling schizophrenia? *J.Clin.Psychopharmacol.* 29 (2):124-133, 2009.
255. Stefansson H., Sigurdsson E., Steinthorsdottir V., Bjornsdottir S., Sigmundsson T., Ghosh S., Brynjolfsson J., Gunnarsdottir S., Ivarsson O., Chou T. T., Hjaltason O., Birgisdottir B., Jonsson H., Gudnadottir V. G., Gudmundsdottir E., Bjornsson A., Ingvarsson B., Ingason A., Sigfusson S., Hardardottir H., Harvey R. P., Lai D., Zhou M., Brunner D., Mutel V., Gonzalo A., Lemke G., Sainz J., Johannesson G., Andresson T., Gudbjartsson D., Manolescu A., Frigge M. L., Gurney M. E., Kong A.,

- Gulcher J. R., Petursson H., and Stefansson K. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am.J.Hum.Genet.* 71 (4):877-892, 2002.
256. Stephenson F. A. Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr.Drug Targets.* 2 (3):233-239, 2001.
257. Stip E., Caron J., Renaud S., Pampoulova T. and Lecomte Y. Exploring cognitive complaints in schizophrenia: the subjective scale to investigate cognition in schizophrenia. *Compr.Psychiatry* 44 (4):331-340, 2003.
258. Stoet G. and Snyder L. H. Effects of the NMDA antagonist ketamine on task-switching performance: evidence for specific impairments of executive control. *Neuropsychopharmacology* 31 (8):1675-1681, 2006.
259. Stone J. M. Imaging the glutamate system in humans: relevance to drug discovery for schizophrenia. *Curr.Pharm.Des* 15 (22):2594-2602, 2009.
260. Straub R. E., Jiang Y., MacLean C. J., Ma Y., Webb B. T., Myakishev M. V., Harris-Kerr C., Wormley B., Sadek H., Kadambi B., Cesare A. Gibberman J., A., Wang X., O'Neill F. A., Walsh D., and Kendler K. S. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am.J.Hum.Genet.* 71 (2):337-348, 2002.
261. Stuchlik A. and Vales K. Systemic administration of MK-801, a non-competitive NMDA-receptor antagonist, elicits a behavioural deficit of rats in the Active Allothetic Place Avoidance (AAPA) task irrespectively of their intact spatial pretraining. *Behav.Brain Res.* 159 (1):163-171, 2005.
262. Sumiyoshi T., Stockmeier C. A., Overholser J. C., Dilley G. E. and Meltzer H. Y. Serotonin1A receptors are increased in postmortem prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res.* 708 (1-2):209-214, 1996.
263. Sumiyoshi T., Matsui M., Nohara S., Yamashita I., Kurachi M., Sumiyoshi C., Jayathilake K. and Meltzer H. Y. Enhancement of cognitive performance in schizophrenia by addition of tandospirone to neuroleptic treatment. *Am.J.Psychiatry* 158 (10):1722-1725, 2001.
264. Sumiyoshi T., Park S., Jayathilake K., Roy A., Ertugrul A. and Meltzer H. Y. Effect of buspirone, a serotonin1A partial agonist, on cognitive function in schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Schizophr.Res.* 95 (1-3):158-168, 2007.
265. Švestka J., Libiger J., Hoschl C. Psychofarmaka. *Psychiatrie*:692-703, 2002.
266. Takahashi K., Nagai T., Kamei H., Maeda K., Matsuya T., Arai S., Mizoguchi H., Yoneda Y., Nabeshima T., Takuma K. and Yamada K. Neural circuits containing pallidotegmental GABAergic neurons are involved in the prepulse inhibition of the startle reflex in mice. *Biol.Psychiatry* 62 (2):148-157, 2007.
267. Talbot K., Eidem W. L., Tinsley C. L., Benson M. A., Thompson E. W., Smith R. J., Hahn C. G., Siegel C. G., Trojanowski J. Q., Gur R. E., Blake D. J., and Arnold S. E. Dysbindin-1 is reduced in intrinsic, glutamatergic terminals of the hippocampal formation in schizophrenia. *J.Clin.Invest* 113 (9):1353-1363, 2004.
268. Talkowski M. E., Chowdari K., Lewis D. A. and Nimgaonkar V. L. Can RGS4 polymorphisms be viewed as credible risk factors for schizophrenia? A critical review of the evidence. *Schizophr.Bull.* 32 (2):203-208, 2006.

269. Tan H. Y., Nicodemus K. K., Chen Q., Li Z., Brooke J. K., Honea R., Kolachana B. S., Straub R. E., Meyer-Lindenberg A., Sei Y., Mattay V. S., Callicott J. H. and Weinberger D. R. Genetic variation in AKT1 is linked to dopamine-associated prefrontal cortical structure and function in humans. *J.Clin.Invest* 118 (6):2200-2208, 2008.
270. Tang J. X., Zhou J., Fan J. B., Li X. W., Shi Y. Y., Gu N. F., Feng G. Y., Xing Y. L., Shi J. G., and He L.. Family-based association study of DTNBP1 in 6p22.3 and schizophrenia. *Mol.Psychiatry* 8 (8):717-718, 2003.
271. Tauscher J., Kapur S., Verhoeff N. P., Hussey D. F., Daskalakis Z. J., Tauscher-Wisniewski S., Wilson A. A., Houle, Kasper S. and Zipursky R. B. Brain serotonin 5-HT(1A) receptor binding in schizophrenia measured by positron emission tomography and [11C]WAY-100635. *Arch.Gen.Psychiatry* 59 (6):514-520, 2002.
272. Tesmer J. J., Berman D. M., Gilman A. G. and Sprang S. R. Structure of RGS4 bound to AIF4 activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89 (2):251-261, 1997.
273. Theberge J., Bartha R., Drost D. J., Menon R. S., Malla A., Takhar J., Neufeld R. W., Rogers J., Pavlosky W., Schaefer B., Densmore M., Al Semaan Y. and Williamson P. C. Glutamate and glutamine measured with 4.0 T proton MRS in never-treated patients with schizophrenia and healthy volunteers. *Am.J.Psychiatry* 159 (11):1944-1946, 2002.
274. Thiselton D. L., Vladimirov V. I., Kuo P. H., McClay J., Wormley B., Fanous A., O'Neill F. A., Walsh D., Van den Oord E. J., Kendler K. S. and Riley B. P. AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families. *Biol.Psychiatry* 63 (5):449-457, 2008.
275. Thomson P. A., Wray N. R., Millar J. K., Evans K. L., Hellard S. L., Condie A., Muir W. J., Blackwood D. H. and Porteous D. J. Association between the TRAX/DISC locus and both bipolar disorder and schizophrenia in the Scottish population. *Mol.Psychiatry* 10 (7):657-68, 616, 2005.
276. Torres G., Hallas B. H., Vernace V. A., Jones C., Gross K. W. and Horowitz J. M. A neurobehavioral screening of the ckr mouse mutant: implications for an animal model of schizophrenia. *Brain Res.Bull.* 62 (4):315-326, 2004.
277. Torres G., Meeder B. A., Hallas B. H., Gross K. W. and Horowitz J. M. Preliminary evidence for reduced social interactions in Chakragati mutants modeling certain symptoms of schizophrenia. *Brain Res.* 1046 (1-2):180-186, 2005.
278. Tricklebank M. D., Forler C., Middlemiss D. N. and Fozar J. R. Subtypes of the 5-HT receptor mediating the behavioural responses to 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in the rat. *Eur.J.Pharmacol.* 117 (1):15-24, 1985.
279. Tsai G., Passani L. A., Slusher B. S., Carter R., Baer L., Kleinman J. E. and Coyle J. T. Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch.Gen.Psychiatry* 52 (10):829-836, 1995.
280. Tsai G. and Coyle J. T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 42:165-179, 2002.
281. Tsuang M. Schizophrenia: genes and environment. *Biol.Psychiatry* 47 (3):210-220, 2000.

282. Tu J. C., Xiao B., Naisbitt S., Yuan J. P., Petralia R. S., Brakeman P., Doan A., Aakalu V. K., Lanahan A., Sheng M. and Worley P. F. Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23 (3):583-592, 1999.
283. Vales K., Bubenikova-Valesova V., Klement D. and Stuchlik A. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neurosci.Res.* 55 (4):383-388, 2006.
284. Van den Buuse M. and Gogos A. Differential effects of antipsychotic drugs on serotonin-1A receptor-mediated disruption of prepulse inhibition. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 320 (3):1224-1236, 2007.
285. Van den Buuse M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. *Schizophr.Bull.* 36 (2):246-270, 2010.
286. Verma A. and Moghaddam B. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J.Neurosci.* 16 (1):373-379, 1996.
287. Verma V., Tan C. H., Ong W. Y., Grigoryan G. A., Jones C. A., Stolzberg D., Salvi R., Gross K. W., Ratty A. K. and Dawe G. S. The chakragati mouse shows deficits in prepulse inhibition of acoustic startle and latent inhibition. *Neurosci.Res.* 60 (3):281-288, 2008.
288. Vohs J. L., Chambers R. A., Krishnan G. P., O'Donnell B. F., Hetrick W. P., Kaiser S. T., Berg S. and Morzorati S. L. Auditory sensory gating in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. *Neuropsychobiology* 60 (1):12-22, 2009.
289. Vollenweider F. X., Leenders K. L., Scharfetter C., Antonini A. P., Maguire P., Missimer J. and Angst J. Metabolic hyperfrontality and psychopathology in the ketamine model of psychosis using positron emission tomography (PET) and [18F]fluorodeoxyglucose (FDG). *Eur.Neuropsychopharmacol.* 7 (1):9-24, 1997.
290. Vollenweider F. X. and Geyer M. A. A systems model of altered consciousness: integrating natural and drug-induced psychoses. *Brain Res.Bull.* 56 (5):495-507, 2001.
291. Wayman G. A., Lee Y. S., Tokumitsu H., Silva A. J. and Soderling T. R. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron* 59 (6):914-931, 2008.
292. Wedzony K., Mackowiak M., Zajackowski W., Fijal K., Chocyk A. and Czyrak A. WAY 100135, an antagonist of 5-HT_{1A} serotonin receptors, attenuates psychotomimetic effects of MK-801. *Neuropsychopharmacology* 23 (5):547-559, 2000.
293. Weickert C. S., Straub R. E., McClintock B. W., Matsumoto M., Hashimoto R., Hyde T. M., Herman M. M., Weinberger D. R., and Kleinman J. E. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch.Gen.Psychiatry* 61 (6):544-555, 2004.

294. Weickert C. S., Rothmond D. A., Hyde T. M., Kleinman J. E., and Straub R. E. Reduced DTNBP1 (dysbindin-1) mRNA in the hippocampal formation of schizophrenia patients. *Schizophr.Res.* 98 (1-3):105-110, 2008.
295. Wenthold R. J., Prybylowski K., Standley S., Sans N. and Petralia R. S. Trafficking of NMDA receptors. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43:335-358, 2003.
296. Wetterling T. and Mussigbrodt H. E. Weight gain: side effect of atypical neuroleptics? *J.Clin.Psychopharmacol.* 19 (4):316-321, 1999.
297. White P. F., Way W. L. and Trevor A. J. Ketamine its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology* 56 (2):119-136, 1982.
298. Williams N. M., Preece A., Spurlock G., Norton N., Williams H. J., McCreadie R. G., Buckland P., Sharkey V., Chowdari K. V., Zammit S., Nimgaonkar V., Kirov G., Owen M. J., and O'Donovan M. C. Support for RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Biol.Psychiatry* 55 (2):192-195, 2004.
299. Wong R. W., Setou M., Teng J., Takei Y. and Hirokawa N. Overexpression of motor protein KIF17 enhances spatial and working memory in transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (22):14500-14505, 2002.
300. Xu M. Q., Xing Q. H., Zheng Y. L., Li S., Gao J. J., He G., Guo T. W., Feng G. Y., Xu F. and He L. Association of AKT1 gene polymorphisms with risk of schizophrenia and with response to antipsychotics in the Chinese population. *J.Clin.Psychiatry* 68 (9):1358-1367, 2007.
301. Yeomans J. S., Li L., Scott B. W. and Frankland P. W. Tactile, acoustic and vestibular systems sum to elicit the startle reflex. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 26 (1):1-11, 2002.
302. Yocca F. D., Iben L. and Meller E. Lack of apparent receptor reserve at postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors negatively coupled to adenylyl cyclase activity in rat hippocampal membranes. *Mol.Pharmacol.* 41 (6):1066-1072, 1992.
303. Yonezawa Y., Kuroki T., Kawahara T., Tashiro N. and Uchimura H. Involvement of gamma-aminobutyric acid neurotransmission in phencyclidine-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex. *Eur.J.Pharmacol.* 341 (1):45-56, 1998.
304. Yuen E. Y., Jiang Q., Chen P., Gu Z., Feng J. and Yan Z. Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J.Neurosci.* 25 (23):5488-5501, 2005.
305. Zajaczkowski W., Czyrak A. and Wedzony K. A competitive antagonist of NMDA receptors CGP 40116 attenuates experimental symptoms of schizophrenia evoked by MK-801. *Pol.J.Pharmacol.* 55 (5):703-711, 2003.
306. Zazpe A., Artaiz I., Innerarity A., Del Olmo E., Castro E., Labeaga L., Pazos A. and Orjales A. In vitro and in vivo characterization of F-97013-GD, a partial 5-HT_{1A} agonist with antipsychotic- and antiparkinsonian-like properties. *Neuropharmacology* 51 (1):129-140, 2006.
307. Zhuang X., Oosting R. S., Jones S. R., Gainetdinov R. R., Miller G. W., Caron M. G. and Hen R. Hyperactivity and impaired response habituation in hyperdopaminergic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (4):1982-1987, 2001.
308. Zimmermann U., Kraus T., Himmerich H., Schuld A. and Pollmacher T. Epidemiology, implications and mechanisms underlying drug-induced weight gain in psychiatric patients. *J.Psychiatr.Res.* 37 (3):193-220, 2003.

309. Zuo D. Y., Zhang Y. H., Cao Y., Wu C. F., Tanaka M. and Wu Y. L. Effect of acute and chronic MK-801 administration on extracellular glutamate and ascorbic acid release in the prefrontal cortex of freely moving mice on line with open-field behavior. *Life Sci.* 78 (19):2172-2178, 2006.

8. Seznam příloh:

Bubeníková-Valešová V., Puskarčíková J., Vrajová M., Horáček J. Změny v expresi podjednotek N-metyl-D-aspartátového receptoru po podání parciálních agonistů serotoninových-1A receptorů (buspiron, tandospiron) v hipokampu a frontální kůře u potkana. *Psychiatrie*, 14, supplementum 2, 2010.

Puskarčíková J., Vrajová M., Bubeníková-Valešová V. Účinek agonistů serotoninových 1A receptorů na expresi N-metyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů u potkana. (abstrakt k posteru, 53. ČESKO-SLOVENSKÁ PSYCHOFARMAKOLOGICKÁ KONFERENCE 2011 LÁZNĚ JESENÍK

Vera Bubenikova-Valesova, Jana Puskarcikova. The effect of early postnatal inhibition of NMDA receptors and social isolation during puberty on expression of NMDA receptor subunits and social recognition. (Abstrakt, 10th World Congress of Biological Psychiatry, Praha, 2011)

ZMĚNY V EXPRESI PODJEDNOTEK N-METYL-D-ASPARTÁTOVÉHO RECEPTORU PO PODÁNÍ PARCIÁLNÍCH AGONISTŮ SEROTONINOVÝCH-1A RECEPTORŮ (BUSPIRON, TANDOSPIRON) V HIPOKAMPU A FRONTÁLNÍ KŮŘE U POTKANA

ALTERATION IN SUBUNITS EXPRESSION OF N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTOR
AFTER APPLICATION OF SEROTONIN-1A RECEPTOR PARTIAL AGONISTS (BUSPIRONE,
TANDOSPIRONE) IN HIPPOCAMPUS AND FRONTAL CORTEX IN RATS

VĚRA BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ, JANA PUŠKARČÍKOVÁ,
MONIKA VRAJOVÁ, JIRÍ HORÁČEK

Psychiatrické centrum Praha

SOUHRN

Buspiron a tandospiron jsou parciální agonisté serotoninového-1A (5-HT_{1A}) receptoru registrovaní pro léčbu generalizované úzkostné poruchy. Některé preklinické i klinické studie ukazují, že tyto látky také mají prokognitivní účinek v kombinaci s antipsychotiky (haloperidol) a antipsychotický profil v animálním modelu schizofrenie založeném na inhibici NMDA receptoru. Cílem práce bylo zjistit, jestli opakované podání (4 dny) buspironu (1 a 10 mg/kg) a tandospironu (0,05 a 5 mg/kg) mění expresi podjednotek (NR1, NR2A) NMDA receptoru ve frontální kůře a hipokampu jak u intaktních potkanů, tak u potkanů po podání NMDA antagonisty (MK-801; 0,1 mg/kg). Naše výsledky ukázaly, že opakovaná aplikace parciálních agonistů významně snižuje expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře a hipokampu. Podání MK-801 ruší účinek 5-HT_{1A} agonistů vzhledem ke změně v expresi podjednotek NMDA receptoru. Aplikace parciálních agonistů 5-HT_{1A} receptoru neměla vliv na expresi NR2A podjednotky. Podání MK-801 snižovalo expresi NR2A podjednotky.

Závěrem lze říci, že aktivací 5-HT_{1A} R můžeme snížit expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře a hipokampu a navodit poškození kognitivních funkcí, které jsme potvrdili už v předeslých studiích.

Klíčová slova: NMDA receptor, MK-801, buspiron, tandospiron, exprese, NR1, NR2A, podjednotka

SUMMARY

Buspirone and tandospirone are partial agonists of 5-HT_{1A} receptor authorized for treatment of generalized anxiety disorder. Some of preclinical and clinical studies show that these drugs have procognitive effect in combination with antipsychotic (haloperidol) and exert antipsychotic-like profile in animal model of schizophrenia based on inhibition of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. The aim of the study was to investigate the effect of repeated (4 days) administration of buspirone (1 and 10 mg/kg) and tandospirone (0,05 mg/kg and 5 mg/kg) on protein expression of NMDA receptor subunits (NR1 and NR2A) in frontal cortex and hippocampus in intact rats and in MK-801 treated rats (0,1 mg/kg). Our results showed that repeated administration of 5-HT_{1A} receptor partial agonist significantly decreased the expression of NR1 subunit in frontal cortex and hippocampus. Application of MK-801 blocked the effect of 5-HT_{1A} receptor agonists. Partial agonist of 5-HT_{1A} receptor had no effect on NR2A subunit expression; however application of MK-801 decreased the expression of NR2A.

In conclusion, activation of 5-HT_{1A} receptor induced a decrease of NR1 subunit expression in frontal cortex and hippocampus and could induced disturbances in cognitive function as we published in previous studies.

Key words: NMDA receptor, MK-801, buspirone, tandospirone, expression, NR1, NR2A, subunit

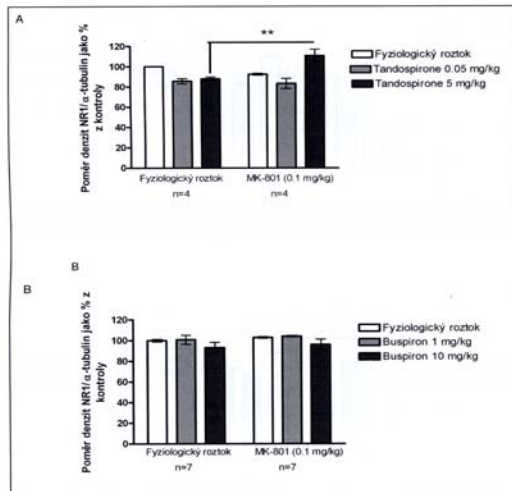
Bubeníková-Valešová V, Puškarčíková J, Vrajová M, Horáček J. Změny v expresi podjednotek N-methyl-D-aspartátového receptoru po podání parciálních agonistů serotoninových-1A receptorů (buspiron, tandospiron) v hipokampu a frontální kůře u potkana. *Psychiatrie* 2010; 14(Suppl. 2): 22-25.

Úvod

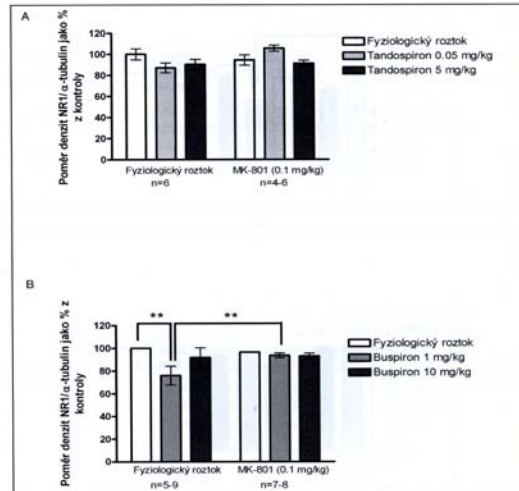
Interakce mezi serotoninovým-1A a N-methyl-D-aspartátovým receptorem

Serotoninové-1A (5-HT_{1A}) receptory jsou exprimované v rafeálních jádrech, kde regulují výdej serotoninu, a postsynapticky v oblastech, jako je frontální kůra, hipokampus a thalamus. Postsynaptické 5-HT_{1A} heteroreceptory jsou umístěny jak na pyramidových (glutamatergických) buňkách, tak na GABAergních interneuronech v kůře a hipokampu (de Almeida a Mengod, 2008). Aktivace těchto

receptorů vede přes G-proteiny k inhibici produkce cyklického AMP, a tím snižuje aktivitu pyramidových buněk a výdej glutamátu (Matsuyama et al., 1996). Navíc aktivace 5-HT_{1A} R snižuje aktivitu glutamátových ionotropních N-methyl-D-aspartátových (NMDA) receptorů přes regulační protein G-proteinové signalizace RGS4 (Gu et al., 2007). Jak RGS4, tak NMDA receptor a s ním spojené proteiny hrají důležitou roli v patofyziologii schizofrenie (Chowdari et al., 2002; Kristiansen et al., 2006). U pacientů se schizofrenií post mortem byla nalezena snížená exprese mRNA pro RGS4 v několika oblastech, jako je frontální kůra a temporální gyrus (Bowden et al., 2007; Mirnics et al., 2001). NMDA receptor je složen z několika podjednotek (NR1,



Obrázek 1: Vliv tandospironu/buspironu na expresi NR1 podjednotky NMDA receptoru ve frontální kůře. Two-way ANOVA prokázala významnou interakci mezi tandospironem a MK-801 ($p < 0,001$) a vliv tandospironu ($p < 0,01$). Post-hoc Newman-Keuls test ukázal zvýšení exprese NR1 podjednotky u skupiny tandospiron 5 mg/kg/MK-801 ve srovnání s tandospironem 5 mg/kg, část A. Buspiron neměl vliv na expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře.



Obrázek 2: Vliv tandospironu/buspironu na expresi NR1 podjednotky NMDA receptoru v hipokampu. Two-way ANOVA prokázala významnou interakci mezi buspironem ($p < 0,05$) /tandospironem ($p < 0,05$) a MK-801 a významný vliv buspironu ($p < 0,05$). Post-hoc Newman-Keuls test ukázal snížení exprese u skupiny buspiron 1 mg/kg ($p < 0,01$) ve srovnání s kontrolou. Toto snížení bylo inhibováno podáním MK-801 ($p < 0,01$), část B.

NR2A-2D, NR3A-B). Na podjednotku NR1 se váže glycin jako kognonista a na ostatní podjednotky glutamát. Tento receptor je spojen s řadou intracelulárních proteinů tvořících postsynaptickou denzitu, jako je Erb4, PSD-95 či disbindin-1. Právě polymorfizmy v genech pro tyto proteiny jsou spojovány se zvýšeným rizikem pro schizofrenii (Desbonnet et al., 2009).

Je tedy možné, že aktivace nebo inhibice 5-HT1A receptorů by mohla být novým farmakologickým přístupem v léčbě schizofrenie. Dále, objasnění mechanismu regulace exprese podjednotek NMDA receptorů pomocí aktivace/inhibice 5-HT1A receptoru ukáže úlohu tohoto receptoru v patofyziologii schizofrenie.

Parciální agonisté serotoninových-1A receptorů a jejich využití v léčbě schizofrenie

Buspiron a tandospiron jsou parciální agonisté 5-HT1A receptoru registrovaní pro léčbu generalizované úzkostné poruchy (tandospiron pouze v Japonsku a Číně). Parciální agonisté aktivují jiné podtypy Gi/Go proteinů na rozdíl od plných agonistů (serotonin, 8-OH-DPAT), a tedy jejich účinek je jiný. Parciální agonisté aktivují především autoreceptory v rafeálních jádrech (Albert et al., 1999). Navíc oba agonisté mají odlišný farmakologický profil. Tandospiron vykazuje 60% aktivitu plného agonisty 8-OH-DPAT na 5-HT1A receptoru, ale nemá výraznou afinitu k žádnému jinému receptoru (Hamik et al., 1990). Naproti tomu buspiron je také parciálním agonistou na 5-HT1A receptoru, ale inhibuje navíc dopaminové D2 receptory (Peroutka, 1985). Některé preklinické i klinické studie ukazují, že tyto látky také mají prokognitivní účinek v kombinaci s antipsychotiky (haloperidol) a antipsychotický profil v animálním modelu schizofrenie založeném na inhibici NMDA receptoru (Suzimiyoshi et al., 2000; 2007; 2008).

Cílem práce bylo zjistit, jestli buspiron a tandospiron mění expresi podjednotek (NR1, NR2A) ve frontální kůře a hipokampu, což jsou struktury důležité při řešení kognitivních úloh, a to jak u intaktních potkanů, tak u potkanů po podání NMDA antagonisty (MK-801). Opakované podání nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů vede ke specifickým změnám v chování, biochemických a morfolo-

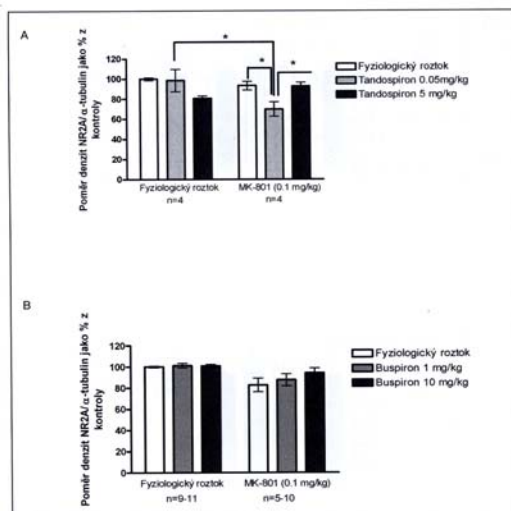
gických parametrů v centrální nervové soustavě, které jsou v mnoha ohledech podobné schizofrenii (Bubenikova-Valesova et al., 2008).

Metodika

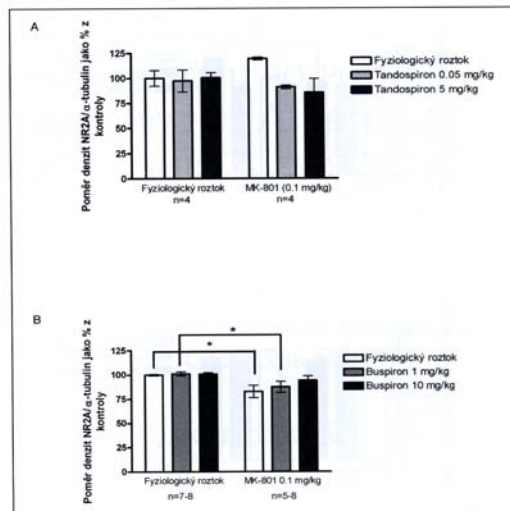
Zvířata: Experimenty byly prováděny na samcích potkanů kmene Wistar (Vělaz, Koleč, Česká republika) o hmotnosti 200–250 g. Potkani byli ustájeni po párech v plastových akváriích ve zvířinci s regulovanou teplotou (20–22 °C) a s pravidelným 12hod. cyklem světlo/tma. Zvířata měla neomezený přístup k potravě a vodě. Experimenty byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. LF UK a byly provedeny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

Aplikace látek: Buspiron (Sigma-Aldrich, Česká republika) byl aplikován s.c. v dávkách 1 a 10 mg/kg po dobu 4 dnů. Tandospiron (Dainippon Sumitomo Pharma, Japonsko) byl aplikován s.c. v dávkách 0,05 a 5 mg/kg po dobu 4 dnů. Společně s buspironem nebo tandospironem byl aplikován i.p. fyziologický roztok nebo MK-801 (Sigma-Aldrich, Česká republika) v dávce 0,1 mg/kg. 60 min. po poslední dávce byla zvířata dekapitována a následně jim byly odebrány hipokampy a frontální kůra.

Western blot: Tkáň hipokampů a frontální kůru jsme homogenizovali v ledovém roztoku obsahujícím 320 mM sacharózu, 10mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,2 mM EDTA, 2 mM fenylmethylsulfonyl-fluorid, 1 mM 2-merkaptoetanol a koktejl inhibitorů proteáz (Sigma-Aldrich, Česká republika). Po dvoustupňové centrifugaci jsme získali sediment obohacený synaptosómy (P_2 – frakce), který jsme resuspendovali v 500 ml ledové deionizované H_2O . Ke stanovení koncentrace proteinů jsme použili metodu dle Bradforda (Bradford 1976). P_2 – frakce jsme následně denaturovali ve vzorkovém pufru [10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfát (SDS), 5% 2-merkaptoetanol, 63 mM Tris-HCl (pH 6,8) a 0,01 % bromfenolová modř] při 95 °C po dobu 5 min. Rozdělení proteinů jsme provedli na 7,5% polyakrylamidovém gelu za použití Criterion Cell (Bio-Rad, USA). Proteiny byly následně přeneseny na nitrocelulóзовou membránu pomocí Criterion Blotter (Bio-Rad, USA). Po promytí v redestilované vodě byly membrány rozříznuty na dvě části obsahující proteiny našeho



Obrázek 3: Vliv tandospironu/buspironu na expresi NR2A podjednotky NMDA receptoru ve frontální kůře. Two-way ANOVA prokázala významnou interakci mezi buspironem ($p < 0,01$)/tandospironem ($p < 0,01$). Post-hoc Newman-Keuls test ukázal snížení exprese NR2A podjednotky u skupiny tandospiron 0,05 mg/kg/MK-801 ve srovnání s MK-801 ($p < 0,05$) a tandospiron 0,05 mg/kg, část A.



Obrázek 4: Vliv tandospironu/buspironu na expresi NR2A podjednotky NMDA receptoru v hipokampu. Two-way ANOVA prokázala významný vliv MK-801 ($p < 0,001$). Post-hoc Newman-Keuls test ukázal, že buspiron 1 mg/kg v kombinaci s MK-801 snižoval expresi NR2A podjednotky ve srovnání s buspironem 1 mg/kg, část B.

zájmu (120 kDa NR1 nebo 170 kDa pro NR2A a kontrolní protein 50 kDa α -tubulin). Membrány byly inkubovány v blokovacím PBS spolu s 0,1% Tween a 3% odtučněným sušeným mlékem. Následovaly inkubace s primárními protilátkami: přes noc pro anti-NMDAR1 (1:500, Millipore, USA) nebo 2 hod. při pokojové teplotě pro anti-NMDAR2A (1:500; Millipore, USA), 1 hod. při pokojové teplotě (anti- α -tubulin; 1:1000; Exbio; Česká republika). Po trojím opláchnutí v PBS pufru byly přidány sekundární protilátky konjugované s křemenovou peroxidázou (1 hod., 1:3000, Dako, Dánsko). Po inkubaci s roztokem SuperSignal (Pierce, USA) bylo možné po přiložení na film vizualizovat imunopozitivní bendy, tyto byly následně hodnoceny pomocí Gel Doc Analysis System (Bio-Rad, USA). Výsledky jsou zobrazeny jako poměr denzit pro NR1/NR2A podjednotku a α -tubulin a vyjádřeny v % vůči kontrole.

Statistika

Interakce mezi buspironem/tandospironem a MK-801 byly porovnány pomocí dvojčestné analýzy variance (two-way ANOVA). Rozdíly mezi skupinami pak pomocí one-way ANOVA s Newman-Keuls post hoc testem. Pro statistické hodnocení jsme použili software GraphPad 4, USA.

Výsledky

Vliv buspironu/tandospironu a MK-801 na expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře a hipokampu

Two-way ANOVA neprokázala žádný vliv na expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře po aplikaci buspironu ani MK-801. Významná nebyla ani interakce mezi buspironem a MK-801, obrázek 1B. Naproti tomu two-way ANOVA ukázala vliv tandospironu $F(2,18) = 9,94$; $p < 0,01$ a interakce mezi tandospironem a MK-801 $F(2,18) = 10,64$; $p < 0,001$, ale žádný vliv MK-801 na expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře. Následná one-way ANOVA s Newman-Keuls post hoc testem ukázala zvýšení exprese NR1 podjednotky po podání tandospironu 5 mg/kg a MK-801 ve srovnání s tandospironem 5 mg/kg, obrázek 1A.

Two-way ANOVA prokázala vliv buspironu $F(2,38) = 4,92$; $p < 0,05$ a interakce mezi buspironem a MK-801 $F(2,38) = 3,34$; $p < 0,05$, ale žádný vliv MK-801 na expresi NR1 podjednotky v hipokampu. Následná one-way ANOVA s Newman-Keuls post hoc testem ukázala snížení exprese NR1 podjednotky v hipokampu po podání buspironu 1 mg/kg, ale žádný vliv vyšší dávky buspironu. Podání MK-801 k buspironu 1 mg/kg zvyšovalo expresi NR1 ve srovnání s buspironem 1 mg/kg, obrázek 2B. Two-way ANOVA ukázala vliv pouze na interakce mezi tandospironem a MK-801 na expresi NR1 podjednotky v hipokampu $F(2,28) = 4,05$; $p < 0,05$. Následná one-way ANOVA neukázala statisticky významný rozdíl mezi skupinami, obrázek 2A.

Vliv buspironu/tandospironu a MK-801 na expresi NR2A podjednotky ve frontální kůře a hipokampu

Two-way ANOVA ukázala vliv interakce buspironu s MK-801 na expresi NR2A podjednotky ve frontální kůře $F(2,46) = 5,77$; $p < 0,01$, ale žádný vliv buspironu nebo MK-801. One-way ANOVA ukázala významný rozdíl mezi skupinami, ale Newman-Keuls post hoc test neprokázal žádný statistický významný rozdíl, obrázek 3B. Two-way ANOVA ukázala významný vliv interakce mezi tandospironem a MK-801 na expresi NR2A podjednotky ve frontální kůře $F(2,18) = 5,765$; $p < 0,01$, ale žádný vliv tandospironu nebo MK-801. Následná one-way ANOVA s Newman-Keuls post hoc testem prokázala snížení exprese NR2A podjednotky po podání tandospironu 0,05 mg/kg spolu s MK-801 ve srovnání se skupinou MK-801 i tandospiron 0,05 mg/kg, obrázek 3A.

Two-way ANOVA prokázala vliv MK-801 $F(2,35) = 15,15$; $p < 0,001$, ale žádný vliv buspironu nebo interakce mezi MK-801 a buspironem na expresi NR2A podjednotky v hipokampu. Následná one-way ANOVA s post-hoc Newman-Keuls testem ukázala snížení exprese NR2A podjednotky po podání MK-801 ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou. Buspiron 1 mg/kg v kombinaci s MK-801 snižoval expresi NR2A podjednotky ve srovnání s buspironem 1 mg/kg ($p < 0,05$); obrázek 4B. Tandospiron sám ani v kombinaci s MK-801 neměl statistický významný vliv na expresi NR2A podjednotky v hipokampu, obrázek 4A.

Diskuze

Naše výsledky ukázaly, že oba parciální agonisté interagovali s NR1 i NR2A podjednotkami NMDA receptorů. Buspiron více snižoval expresi NR1 v hipokampu a tandospiron ve frontální kůře u potkanů bez podání MK-801 (inhibitor NMDA receptoru). Toto snížení bylo zablokováno podáním MK-801. Samotné podání MK-801 ale nemělo vliv na expresi NR1 podjednotky. Je zde tedy patrná silná interakce mezi 5-HT1A receptorem a NR1 podjednotkou NMDA receptoru. Z literatury je pouze známo, že agonista 5-HT1A receptoru (8-OH-DPAT) snižuje fosforylaci NR1 podjednotky po celkové ischemii u potkana, ale bez změny v expresi NR1 podjednotky (Salazar-Colocho et al., 2007). Naše nepublikované výsledky s tímto agonistou ukazují na podobný účinek 8-OH-DPAT. Pravděpodobně parciální agonisté 5-HT1A receptoru mají rozdílný účinek na expresi podjednotek NMDA receptoru než plný agonista. Nadměrná aktivace NMDA receptorů vede k excitotoxickému poškození buněk způsobenému zvýšenou intracelulární hladinou vápenatých iontů (Szydłowska a Tymianski, 2010). Je známo, že aktivace postsynaptických 5-HT1A receptorů snižují funkci NMDA receptorů (Gu et al., 2007), čímž lze vysvětlit i neuroprotektivní účinek. Protože přítomnost NR1 podjednotky je nutná pro funkci NMDA receptoru, je možné, že snížení expresi NR1 podjednotky indukované 5-HT1A agonisty vede právě ke snížení funkce NMDA receptoru. Antagonista NMDA receptoru (MK-801) blokoval účinek agonisté 5-HT1A receptoru na expresi NR1 podjednotky, ale sám neovlivnil expresi této podjednotky. Studie s podobným antagonistou NMDA receptoru (fencyklidinem) ukázaly buď snížení expresi NR1 ve frontální kůře (Lindahl a Keifer, 2004), nebo žádné změny v expresi této podjednotky (Gu et al., 2007; Wang et al., 1999).

Glutamat se váže na NR2 podjednotky NMDA receptoru. V naší studii jsme stanovili expresi NR2A podjednotky ve frontální kůře a hipokampu. Aplikace parciálních agonisté 5-HT1A receptoru

neměla vliv na expresi NR2A podjednotky. Podání MK-801 samotné nebo v kombinaci s agonisty 5-HT1A receptoru snižovalo expresi NR2A podjednotky. Snižování expresi NR2A podjednotky po podání MK-801 bylo již dokumentováno na úrovni mRNA (Oh et al., 2001).

Naše výsledky ukázaly, že opakovaná aplikace parciálních agonisté významně snižuje expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře a hipokampu. Aktivace 5-HT1A receptoru vede u potkanů ke zhoršení kognitivních funkcí a zpracování senzomotorických informací (Bubenikova-Valesova et al., 2010; Elvander-Tottie et al., 2009). Je možné, že porucha kognitivních funkcí souvisí se snížením expresi NR1 podjednotky ve strukturách, které jsou pro tyto funkce důležité. Snížení expresi NR1 podjednotky vede také u myši k schizofrenii podobnému chování včetně poruchy kognice (Mohn et al., 1999). Podání antagonistů NMDA receptoru ruší účinek 5-HT1A agonisté vzhledem ke změně v expresi NMDA podjednotek, což opět ukazuje na vzájemnou interakci mezi 5-HT1A a NMDA receptory. Tento výsledek je ale v rozporu s našimi behaviorálními výsledky, kdy naopak tandospiron potencioval účinek NMDA antagonisty v testu na zpracování senzomotorických informací (Bubenikova-Valesova et al., 2010).

Závěrem lze říci, že aktivaci 5-HT1A R můžeme snížit expresi NR1 podjednotky ve frontální kůře a hipokampu a navodit poškození kognitivních funkcí, které jsme potvrdili už v předešlých studiích.

Práce byla podpořena projektem MŠMT ČR 1M0517.

RNDr. Věra Bubeniková-Valešová, PhD.
Psychiatrické centrum Praha
Ústavní 91
181 03 Praha 8
E-mail: bubenikova@pcp.lf3.cuni.cz

LITERATURA

- Albert PR, Sajedi N, Lemonde S, Ghahremani MH. Constitutive G(i2)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT1A receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *J Biol Chem* 1999;274:35469-35474.
- Bowden NA, Scott RJ, Tooney PA. Altered expression of regulator of G-protein signalling 4 (RGS4) mRNA in the superior temporal gyrus in schizophrenia. *Schizophr Res* 2007;89:165-168.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Vrajova M, Hoschl C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2008;32:1014-1023.
- Bubenikova-Valesova V, Svoboda J, Horacek J, Sumiyoshi T. Effect of tandospirone, a serotonin-1A receptor partial agonist, on information processing and locomotion in dizocilpine-treated rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2010;212:267-276.
- Chowdari KV, Mirmics K, Semwal P, Wood J, Lawrence E, Bhatia T, Deshpande SN, B K T, Ferrell RE, Middleton FA, Devlin B, Levitt P, Lewis DA, Nimgaonkar VL. Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 2002;11:1373-1380.
- de Almeida J, Mengod G. Serotonin 1A receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment. *J Neurochem* 2008;107:488-496.
- Desbonnet L, Waddington JL, Tuathaigh CM. Mice mutant for genes associated with schizophrenia: common phenotype or distinct endophenotypes? *Behav Brain Res* 2009;204:258-273.
- Elvander-Tottie E, Eriksson TM, Sandin J, Ogren SO. 5-HT(1A) and NMDA receptors interact in the rat medial septum and modulate hippocampal-dependent spatial learning. *Hippocampus* 2009;19:1187-1198.
- Gu Z, Jiang Q, Yan Z. RGS4 modulates serotonin signaling in prefrontal cortex and links to serotonin dysfunction in a rat model of schizophrenia. *Mol Pharmacol* 2007;71:1030-1039.
- Hamik A, Oksenberg D, Fischette C, Peroutka SJ. Analysis of tandospirone (SM-3997) interactions with neurotransmitter receptor binding sites. *Biol Psychiatry* 1990;28:99-109.
- Kristiansen LV, Benetto M, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Changes in NMDA receptor subunits and interacting PSD proteins in dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex indicate abnormal regional expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006;11:737-47, 705.
- Lindahl JS, Keifer J. Glutamate receptor subunits are altered in forebrain and cerebellum in rats chronically exposed to the NMDA receptor antagonist phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:2065-2073.
- Matsuyama S, Nei K, Tanaka C. Regulation of glutamate release via NMDA and 5-HT1A receptors in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 1996;728:175-180.
- Mirmics K, Middleton FA, Stanwood GD, Lewis DA, Levitt P. Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001;6:293-301.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999;98:427-436.
- Oh S, Kim YH, Hann HJ, Lee HL, Choi HS, Kim HS, Ho IK. Modulation of the levels of NMDA receptor subunit mRNA and the bindings of [³H]MK-801 in rat brain by chronic infusion of subtoxic dose of MK-801. *Neurochem Res* 2001;26:559-565.
- Peroutka SJ. Selective interaction of novel anxiolytics with 5-hydroxytryptamine 1A receptors. *Biol Psychiatry* 1985;20:971-979.
- Salazar-Colocho P, Del Rio J, Frechilla D. Serotonin 5-HT1A receptor activation prevents phosphorylation of NMDA receptor NR1 subunit in cerebral ischemia. *J Physiol Biochem* 2007;63:203-211.
- Sumiyoshi T, Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Bert B. Serotonin 1A receptors in the pathophysiology of schizophrenia: development of novel cognition-enhancing therapeutics. *Adv Ther* 2008;25:1037-1056.
- Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Uehara T, Kurachi M, Meltzer HY. Effect of adjunctive treatment with serotonin-1A agonist tandospirone on memory functions in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2000;20:386-388.
- Sumiyoshi T, Park S, Jayatilake K, Roy A, Ertugrul A, Meltzer HY. Effect of buspiron, a serotonin 1A partial agonist, on cognitive function in schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Schizophr Res* 2007;95:158-168.
- Szydłowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 2010;47:122-129.
- Wang C, Showalter VM, Hillman GR, Johnson KM. Chronic phencyclidine increases NMDA receptor NR1 subunit mRNA in rat forebrain. *J Neurosci Res* 1999;55:762-769.

ÚČINEK AGONISTŮ SEROTONINOVÝCH-1A RECEPTORŮ NA EXPRESI N-METHYL-D-ASPARTÁTOVÝCH (NMDA) RECEPTORŮ U POTKANA

Puskarčíková J., Vrajová M., Bubeníková-Valešová V.

Psychiatrické centrum Praha, Česká republika

Na základě našich předchozích behaviorálních studií (Bubenikova-Valesova et al., 2010) předpokládáme, že existuje přímá interakce mezi 5-HT_{1A} a NMDA receptory. NMDA receptor je složen z několika podjednotek (NR1;NR2A-2D). V hipokampu a frontální kůře se vyskytují především NR1, NR2A a NR2B podjednotky.

V naší studii jsme stanovili expresi podjednotek NMDA receptorů po 4denní aplikaci agonisty 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT: 0,025 a 0,1 mg/kg; buspiron 1 a 10 mg/kg) ve frontální kůře a hipokampu potkana.

Zjistili jsme, že subchronické podání plného agonisty 8-OH-DPAT nemění expresi NR1, NR2A, NR2B podjednotky NMDA receptorů ve frontální kůře a hipokampu potkana. Naopak podání buspironu 1 mg/kg vede ke snížení exprese NR2A ve frontální kůře a NR1 v hipokampu. Podávání vysoké dávky 10 mg/kg vede ke zvýšení exprese NR2B v hipokampu a ke snížení exprese NR1 ve frontální kůře a hipokampu a NR2A ve frontální kůře. Naše výsledky ukazují, že parciální agonista 5-HT_{1A} receptorů interaguje s NMDA receptorem na rozdíl od plného agonisty 8-OH-DPAT. Buspiron je registrován k léčbě úzkostných poruch, ale je studie, kdy podání buspironu k atypickým antipsychotikům zlepšuje pozornost (Sumiyoshi et al., 2007). Rozdíl mezi působením úplného a částečného agonisty je zřejmě v tom, že buspiron se také váže na dopaminové D₂ receptory, které mohou ovlivňovat expresi NMDA receptorů (Peroutka, 1982).

Práce byla podpořena projektem MŠMT ČR 1M0517.



ČESKÁ NEUROPSYCHOFARMAKOLOGICKÁ SPOLEČNOST o.s.

CENA ČNPS

za nejlepší poster v oblasti preklinického výzkumu

Puskarčíková J., Bubeníková-Valešová V.

**Efekt agonistů 5-HT_{1a} receptoru na expresi
podjednotek NMDA receptoru**

53. ČESKO-SLOVENSKÁ
PSYCHOFARMAKOLOGICKÁ KONFERENCE
V LÁZNÍCH JESENÍK VE DNECH 5. - 9. LEDNA 2011

doc. MUDr. Pavel Mohr, Ph.D.
předseda ČNPS

Účinek agonistů serotoninových-1A receptorů na expresi N-methyl-D-aspartátových receptorů ve zvířecím modelu schizofrenie.

Jana Puskarčíková, Monika Vrajová, Věra Bubeníková-Valešová

Psychiatrické centrum Praha

jana.puskarcikova@seznam.cz



ÚVOD

Schizofrenie je komplexní duševní porucha charakterizovaná kognitivním deficitem. Změny serotonergního a glutamatergního neurotransmitterového systému přispívají k horšímu učení a paměti u schizofrenie. V rámci těchto dvou systémů hrají ústřední roli serotonin-1A receptory (5-HT_{1A} R) a N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA R). Předchozí preklinické a klinické studie ukazují, že nízké až střední aktivace 5-HT_{1A} R zlepšují kognitivní funkce jak v animálním modelu schizofrenie, tak u pacientů se schizofrenií.

CÍL

Cílem studie bylo měření exprese NMDA R podjednotek (NR1, NR2A) po subchronické (4 dny) léčbě se současným podáváním plného 5-HT_{1A} R agonisty (8-OH DPAT 0,025 a 1 mg/kg s.c.) nebo částečného agonisty z 5-HT_{1A} R (tandospiron 0,05 a 5 mg/kg s.c. samostatně nebo společně s MK-801 (0,1 mg/kg i.p.) ve frontální kůře a hipokampu.

METODIKA

Příprava tkáně a membránové frakce:

Tkáň jsme homogenizovali v 10mM Tris HCl, 0,2 mM PMSF, 1mM mercaptoethanol, 2mM EDTA, 320 mM sacharóza, koktejl inhibitorů proteináz (Sigma). Vzorky jsme zcentrifugovali při 1000 rpm 20min. Supernatant jsme přepipetovali do nových ependorfelek a centrifugovali na 12000 rpm 20min. Pelet jsme resuspendovali v 0,5ml redestilované vody. Množství bílkovin bylo stanoveno Bradfordovou metodou.

Western blotting

15µg vzorku jsme naředili na 1mg/ml a dělili na 7,5% Tris-HCl SDS-polyacrylamidovém gelu. Vzorky jsme přenesli na nitrocelulózoovou membránu. Membrány byly blokovány v 3% mléku, následovala inkubace ve 4°C, přes noc, s primární protilátkou na NR1 (1:500, Millipore) nebo 2 hodiny, při pokojové teplotě s primární protilátkou na NR2A (1:500, Millipore). Následovalo promytí v PBS+0,1% Tween 20, membrány se dále inkubují s křenovou peroxidázou konjugovanou se sekundární protilátkou (1:3000) 1 hodinu při pokojové teplotě, následovala chemiluminiscentní detekce Pierce Protein, ThermoScientific, proužky byly naskenovány a densitometricky analyzovány za využití GelDoc analysis systém (Biorad). Všechny kvantitativní analýzy byly porovnávány s α tubulinem.

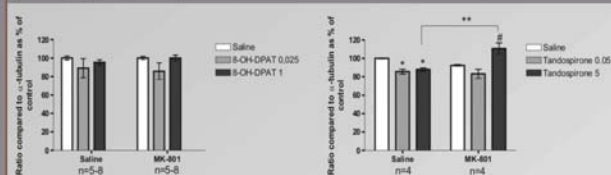
Analýza dat:

Data pro každý parametr byla statisticky hodnocena obousměrnou analýzou rozptylu (ANOVA) s léčivem jako jedním faktorem a MK-801 jako faktorem druhým. Za signifikantně významná data byla považována ta, kde $p < 0,05$ za použití Student-Newmans-Keuls Metody post-hoc test (SigmaStat).

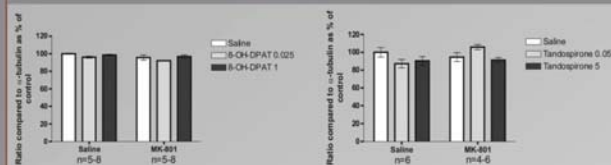
Zjistili jsme, že subchronické podání parciálního agonisty 5-HT_{1A} R, tandospironu, snižuje expresi NR1 a NR2A podjednotky NMDA R ve frontální kůře. Nicméně, vysoké dávky tandospironu v kombinaci s MK-801 zvyšují expresi NR1 podjednotky v frontální kůře. Plný agonista 5-HT_{1A} receptoru, 8-OH-DPAT, nemá významný vliv na expresi podjednotek NMDA R.

Tandospiron je metabolizován na aktivní metabolit 1-(2-pyrimidinyl)-piperazin (1-PP) u lidí a je antagonistou α (2A)-adrenoreceptorů. Rozdíl mezi vlivem částečného a plného agonisty je pravděpodobně v metabolismu tandospironu na 1-PP.

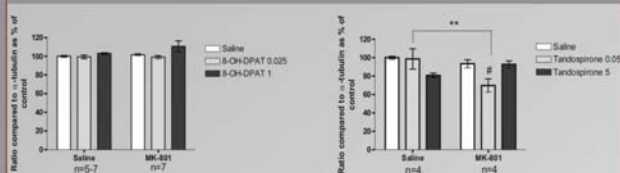
Obrázek 1: Expres NR1 podjednotky ve frontální kůře po podání plného agonisty 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT) a částečného agonisty 5-HT_{1A} R (tandospiron). Tandospiron - obě dávky – snížily expresi podjednotky NR1 (* $p < 0,05$). Tandospiron 5mg/kg v kombinaci s MK-801 (0,1 mg/kg) zvýšil expresi NR1 ve srovnání s MK-801 skupinou.



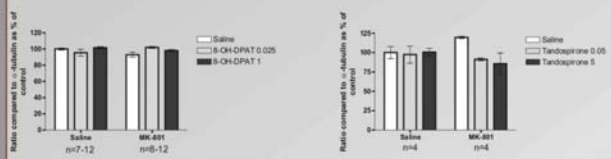
Obrázek 2: Expres NR1 podjednotky v hipokampu po podání plného agonisty 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT) a částečného agonisty 5-HT_{1A} R (tandospiron). Změna nebyla signifikantní.



Obrázek 3: Expres NR2A podjednotky ve frontální kůře po podání plného agonisty 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT) a částečného agonisty 5-HT_{1A} R (tandospiron). Tandospiron při nízkých dávkách v kombinaci s MK-801 snížil expresi NR2A podjednotky ve srovnání se skupinou na MK-801 a ve srovnání s tandospironem 0,05mg/kg.



Obrázek 4: Expres NR2A podjednotky v hipokampu po podání plného agonisty 5-HT_{1A} receptorů (8-OH-DPAT) a částečného agonisty 5-HT_{1A} R (tandospiron). Změna nebyla signifikantní.





P-11-012: The effect of early postnatal inhibition of NMDA receptors and social isolation during puberty on expression of NMDA receptor subunits and social recognition

Session

P-11: Brain Function I

Tuesday, May 31, 2011, 12:30 - 14:00, Congress Hall Foyer A

Authors

Vera Bubenikova-Valesova

Prague Psychiatric Center

Co-Author(s)

Jana Puskarcikova

Objective

Subchronic treatment with a non-competitive glutamate NMDA receptor antagonist (MK-801) or social isolation from weaning (28 PND) to adulthood produce deficit similar to some of symptoms of schizophrenia (Simpson et al., 2010).

Method

In our study we evaluated this model on rats, which were treated with MK-801 (0.1 mg/kg; 7-11 PND) or saline. After weaning (28 PND) we induced social isolation in half of rats until adulthood. During this period we investigated behavior in open field during puberty (35.PND) and after social isolation (56-58.PND) we measured social recognition. Furthermore, we measured the effect these two hits on expression of NR1, NR2A and NR2B subunits in frontal cortex and hippocampus.

Results

We found that NR2A and NR2B, but not NR1 was decreased immediately after early administration of MK-801. In adulthood, the expression of NR2B subunit was decreased in grouped or social isolated rats after early administration of MK-801 in hippocampus. On the other hand, the expression of NR2A subunit was increased in a hippocampus after early administration of MK-801 in social isolated rats. In puberty, rats with combination of MK-801 administration and social isolation increased explorative behavior (less time spent in immobility and higher frequency of rearing). In adulthood only rat social-isolated during puberty decreased the recognition memory, without influence of the early administration of MK-801 on this task.

Conclusion

Early administration of MK-801 changed the expression of subunits of NMDA receptor and had no effect on social recognition task in adult rats. The social isolation significantly influenced social recognition memory and had additive effect to early MK-801 administration on explorative behavior.

