

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie



Vliv dizocilpinu na behaviorální strategie potkanů v úloze aktivního vyhýbání se místu

Effect of Dizocilpine on Behavioral Strategies of Rats in
the Place Avoidance Task

Bc. Eliška Antošová

Praha 2013

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Valeš, PhD.

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. Na statistickém vyhodnocování se podílel MUDr. Daniel Klement, PhD.

V Praze dne 15. 8. 2013

Eliška Antošová

Poděkování:

Zde bych chtěla poděkovat především RNDr.,PhDr. Tereze Nekovářové, PhD. za veškerou pomoc, ochotu a trpělivost, dále bych chtěla poděkovat RNDr. Karlu Valešovi, PhD. a MUDr. Danielu Klementovi, PhD. za vstřícné rady a připomínky. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem členům oddělení Neurofyzologie paměti, především Markétě Chvojkové, Martinu Vodičkovi a Lence Kletečkové.

Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Abstrakt

Látky působící jako nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů mohou mít psychomimetický efekt – jsou schopné vyvolat u zdravých dobrovolníků chování podobné schizofrenii. Jednou z látek s těmito vlastnostmi je i dizocilpin (MK-801), který se často využívá k modelování chování podobného schizofrenii u experimentálních zvířat ve farmakologickém modelu schizofrenie.

Krom toho mají ale nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů prokazatelné antidepressivní účinky u pacientů trpících depresí.

Kognitivní deficit je v současnosti považován za jeden ze stěžejních symptomů schizofrenního onemocnění. Klíčovou roli by v kognitivním deficitu mohl hrát proces kognitivní koordinace, který se podílí na rozlišování mezi relevantními a irrelevantními stimuly. Užitečným nástrojem pro studium tohoto procesu by mohla být úloha aktivního vyhýbání se místu (AAPA), ve které experimentální zvíře musí rozlišovat mezi podstatnými a nepodstatnými stimuly ze dvou prostorových referenčních rámců.

Cílem této práce bylo studium

- 1) behaviorálních strategií laboratorních potkanů v úloze AAPA a
- 2) vlivu MK-801 na behaviorální strategie a kognitivní výkonnost potkanů v této úloze.

Během tohoto experimentu zaujali potkani v úloze AAPA dvě zcela odlišné behaviorální strategie. Potkani buď úlohu řešili aktivním vyhýbáním se averzivnímu sektoru, nebo zaujali pasivní strategii, vyvíjeli na aréně minimální pohyb a byli u nich pozorován „freezing“. Zdánlivě tak na řešení úlohy „rezignovali“.

Aplikace MK-801 působila odlišně na potkany s rozdílnou behaviorální strategií. Prokázali jsme schopnost látky MK-801 ovlivnit negativně kognitivní výkonnost zvířat v úloze AAPA, a modelovat tak schizofrenii podobné chování. Zároveň jsme však pozorovali antidepressivní účinky této látky na „pasivní“ potkany, u kterých se rozvinula naučená bezmocnost.

Klíčová slova: schizofrenii podobné chování, kognitivní funkce, animální model, AAPA, MK-801 (dizocilpin)

Abstract

Non-competitive antagonists of NMDA receptors can induce psychomimetic effects - they can cause schizophrenia-like behavior in healthy volunteers. MK-801 is such an agent. It is often used to model schizophrenia-like behavior in experimental animals.

On the other hand, non-competitive antagonists of NMDA receptors show antidepressant effects both in patients suffering from depression and in animal models.

Currently, cognitive deficit is considered to be a crucial symptom of the schizophrenia. Cognitive coordination is a process distinguishing irrelevant and relevant stimuli. A disruption of this process could play a pivotal role in cognitive deficit in schizophrenia. Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) could be a useful tool to study this phenomenon. In this task an animal has to distinguish between two spatial (reference) frames, whereas one of them is irrelevant and the other is relevant. The aims of my diploma thesis were: to study 1) behavioral strategies of laboratory rats in AAPA task and 2) effect of MK-801 on behavioral strategies and cognitive efficiency of rats in this task.

The rats demonstrated two different strategies in the AAPA task. The first strategy was an active avoidance of an aversive sector; the second one was “freezing” with minimal active movement on the arena.

Application of MK-801 affected rats with different behavioral strategies in different ways. We proved the ability of MK-801 to cause cognitive disturbances in rats in AAPA task. On contrast, we have demonstrated antidepressive effect of MK-801 on the rats with “passive” strategy, that had adopted learned helplessness.

Key words: schizophrenia like behavior; cognitive functions; animal model, AAPA, MK-801 (dizocilpine)

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah	6
Seznam zkratek	9
1 Glutamátergní systém v CNS	11
1.1 NMDA receptory	11
1.1.1 Struktura NMDA receptoru	11
1.1.2 Aktivace a modulace NMDA receptoru	12
1.1.3 Funkce NMDA receptoru	12
1.1.4 Hipokampus	14
1.1.5 MK-801 a NMDA receptor	16
2 Depresivní porucha	17
2.1 Neurobiologie deprese	18
2.2 Glutamátergní teorie deprese	19
2.3 Animální modely	20
2.3.1 Animální model deprese podobného chování	21
2.3.2 Naučená bezmocnost	21
2.3.3 Behaviorální testy	23
2.3.3.1 NMDA receptory v souvislosti s depresí	24
2.3.3.2 Souvislost mezi depresivním a schizofrenním onemocněním	25
3 Schizofrenie	26
3.1 Neurobiologie schizofrenie	27
3.2 Schizofrenie a kognitivní schopnosti.	28
3.2.1 Behaviorální flexibilita	29
3.2.2 Kognitivní koordinace	31
3.2.3 Senzorické a senzomotorické zpracování informací	33

3.3	Glutamátergní teorie schizofrenie	35
3.3.1	Animální modely schizofrenii podobného chování	36
3.3.1.1	Farmakologický animální model	38
3.4	Kognitivní schopnosti v animálním modelu schizofrenie	39
3.4.1	Senzorické a senzomotorické zpracování.....	39
3.4.2	Vizuální paměť	39
3.4.3	Prostorová orientace	40
3.4.4	Kognitivní koordinace	41
3.5	MK-801 (dizocilpin)	43
3.5.1	Vliv MK-801 na kognitivní schopnosti	44
3.5.1.1	Vliv MK-801 v MWM a bludišti karusel („Carousel maze“)	44
4	Cíle práce	50
5	Materiál a metody	51
5.1	Experimentální zvířata	51
5.2	Farmaka použitá během experimentu	51
5.3	Bludiště karusel („Carousel maze“)	51
5.4	Úloha AAPA	54
5.5	Manipulace se zvířaty	55
5.5.1	Aklimatizace a „handling“	55
5.5.2	Habituační na aréně	55
5.5.3	Trénink.....	55
5.6	Metodické postupy	56
5.6.1	Experiment 1: Vliv akutní aplikace MK-801 na vybavení	56
5.6.1.1	Experiment 1a: MK-801 dávka 0,15 mg/kg.....	57
5.6.1.2	Experiment 1b: MK-801 dávka 0,30 mg/kg.....	58
5.6.1.3	Experiment 1c: MK-801 dávka 0,20 mg/kg	59
5.6.2	Experiment 2: Vliv chronické aplikace MK-801 na učení	59

5.6.2.1	Experiment 2a: MK-801 dávka 0,15 mg/kg.....	59
5.6.2.2	Experiment 2b: MK-801 dávka 0,20 mg/kg.....	60
5.6.3	Statistika a analýza dat	61
6	Výsledky	62
6.1	Experiment 1: Vliv akutní aplikace MK-801 na vybavení.....	62
6.1.1	Experiment 1a.I,1b,1c: Aplikace látky MK-801 po 15 minutách od začátku úlohy AAPA	62
6.1.2	Experiment 1a.II: Látka MK-801 byla aplikována 30 minut před začátkem úlohy AAPA	70
6.2	Experiment 2: Vliv chronické aplikace MK-801 na učení.....	78
6.2.1	Experiment 2a, 2b.....	78
7	Diskuse	80
8	Závěr	87
9	Seznam použité literatury	89

Seznam zkratek

- AAPA – úloha aktivního se vyhýbání místu
- AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
- BDNF – brain derived neurotrophic factor
- BST – basolateral nucleus of stria terminalis
- CAMKII – Ca^{2+} /kalmomodulin dependentní protein kináza
- CNS – centrální nervový systém
- CRH – kortikotropin uvolňující hormon
- EEG – elektroencefalogram
- EMG – elektromyograf
- ERK – extracelulárním signálem regulovaná kináza
- fMRI – funkční magnetická rezonance
- FST – „forced swimming test“, test nuceného plavání
- GABA – γ -amino máselná kyselina
- HPA – hypothalamo-hypofyzární osa
- LTD – dlouhodobá deprese
- LTP – dlouhodobá potenciace
- LSD – diethylamid kyseliny lysergové
- MAO-I – inhibitory monoaminoxidázy
- MWM – „Morris water maze“
- NMDA – N-methyl-D-aspartát
- NORT – „novel objective recognition test“
- PET – pozitronová emisní tomografie
- PFC – prefrontální kortex
- PPI – prepulzní inhibice
- TST – „tail suspension test“
- WCST – Wisconsinský test třídění karet

Úvod

Glutamát je hlavní excitační neurotransmiter v centrálním nervovém systému savců (CNS). V oblasti psychiatrie je tomuto neuropřenašeči věnována pozornost v souvislosti se studiem řady neuropsychiatrických onemocnění, například Alzheimerovy choroby, schizofrenie afektivních poruch, zejména deprese a dalších.

Glutamátergní teorie schizofrenního onemocnění vznikla mimo jiné na základě pozorování, že látky působící jako nekompetitivní antagonisté glutamátergních NMDA receptorů mohou vyvolat u zdravých dobrovolníků schizofrenii podobné chování (Krystal et al., 1994). Experimentální studie ve výzkumu afektivních chorob zároveň ukázaly, že tyto látky mají prokazatelné antidepresivní účinky u pacientů trpících depresí (Skolnick et al., 2009).

Podrobnější studium mechanismů neurobiologické podstaty psychiatrických chorob a testování potenciálních léčiv umožňují animální modely. Aplikací nekompetitivních antagonistů NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptorů je možné u experimentálních zvířat vyvolat psychomimetické účinky, které se do jisté míry považují za analogické příznakům pozorovaných u pacientů se schizofrenií a to jak pozitivním, tak negativním, ale i kognitivním (Bubeníková – Valešová et al., 2008). Kognitivní deficit se v současnosti považuje za stěžejní složku symptomů schizofrenního onemocnění (O'Carroll, 2000). Z tohoto pohledu je věnována pozornost konceptu kognitivní koordinace. Tento proces by mohl hrát zásadní roli v rozlišování relevantních a irrelevantních informací a narušení kognitivní koordinace je tak spojováno s desorganizací myšlení projevující se u pacientů se schizofrenií (Phillips & Silverstein, 2003). Významným nástrojem pro studium kognitivní koordinace je i úloha aktivního vyhýbání se místu, kde je úkolem zvířete rozlišovat mezi dvěma referenčními rámci a rozlišovat tak mezi podstatnými a nepodstatnými informacemi z obou rámců (Wesierska et al., 2005).

V této diplomové práci se zaměřím především na studium behaviorálních strategií laboratorních potkanů v úloze aktivního vyhýbání se místu. Dále se pak soustředím na účinek dizocilpinu (MK-801) působícího jako nekompetitivní antagonisty NMDA receptorů - na tyto behaviorální strategie a kognitivní výkonnost potkanů při řešení úlohy aktivního vyhýbání se místu. Demonstruji rozdílný efekt MK-801 na potkany s různou behaviorální strategií v úloze a poukážu i na potenciální antidepresivní účinek této látky.

1 Glutamátergní systém v CNS

Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v CNS. Působí prostřednictvím glutamátergních receptorů ionotropních tj. AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolpropionát), NMDA, kainátové a metabotropních mGlu. Z hlediska glutamátergní teorie schizofrenie je pozornost výzkumu věnována nekompetitivním antagonistů NMDA receptorů, proto se v souvislosti s touto prací zaměřím pouze na popis a funkci NMDA receptorů.

1.1 NMDA receptory

NMDA receptory se hojně vyskytují a jsou distribuovány v celém savčím mozku, kde jsou aktivovány hlavním excitačním neurotransmiterem – glutamátem, jsou tudíž nezbytné pro normální funkci centrálního nervového systému. Hrají klíčovou roli při mnoha procesech probíhajících v CNS například při modulaci synaptické plasticity prostřednictvím procesu dlouhodobé potenciace (LTP) a deprese (LDP), považovaných za buněčný a (elektrofyzilogický) korelát mechanismu učení a paměti (Zito & Scheuss, 2009). Dále je jejich role významná ve zrání, přežívání a migraci neuronů (Zhou & Sheng, 2013).

Nezpochybnitelná je i jejich role v patologických stavech, neboť každé narušení homeostázy NMDA receptorů může vést k porušení signalizace v CNS. Uplatňují se zejména při iniciaci excitotoxicity, jejímž důsledkem je degenerace neuronů a tak možná příčina řady neurodegenerativních onemocnění (Chen & Lipton, 2006). Vzhledem k jejich distribuci a aktivaci hlavním excitačním neurotransmiterem, můžeme předpokládat jejich účast v řadě fyziologických procesů odehrávajících se v CNS od úrovně molekulární až k projevům na úrovni behaviorální.

1.1.1 Struktura NMDA receptoru

NMDA receptor je iontový kanál vyskytující se ve formě heterotetrameru složeného z podjednotek NR1 a NR2 a nebo i někdy NR3. Funkční heterotetramer je obvykle tvořen „dimerem dimerů“ a to dvěma podjednotkami NR1 a dvěma podjednotkami NR2 NR1 podjednotka je považována za esenciální při tvorbě komplexu oproti NR2 podjednotce, která může být zaměnitelná buď jednou nebo dvěma NR3 podjednotkami. Různé složení NMDA

receptoru může vést k odlišným vlastnostem, což je z hlediska fyziologického a farmakologického velmi významné (Lakhan et al., 2013).

1.1.2 Aktivace a modulace NMDA receptoru

NMDA receptor se specificky odlišuje ve své aktivaci od ostatních ionotropních (ligandem ovládaných) receptorů.

Pro jeho aktivaci je vyžadováno navázání dvou molekul už zmíněného hlavního excitačního neurotransmiteru CNS - glutamátu, který má vazebné místo na NR2 podjednotkách, ale také dvou molekul glycinu jako koagonisty majícího vazebné místo na NR1 podjednotkách. (Lakhan et al., 2013). Vazebné místo pro glycin se nalézá i na NR3 podjednotce a kromě glycinu se na NR1 a NR3 podjednotku váže také D-serin (Paoletti, 2011).

Avšak pouhé navázání těchto koagonistů - glutamátu a glycinu - k aktivaci NMDA receptoru nestačí. NMDA receptory jsou uvnitř iontového kanálu blokovány napětově závislým způsobem Mg^{2+} ionty, což znesnadňuje průnik ostatních iontů. K tomu, aby byl tento blok odstraněn je nutná depolarizace membrány neuronu, ta může být zprostředkována například aktivovanými glutamátergními AMPA receptory často se vyskytujícími společně s NMDA receptory (Dingledine et al., 1999).

Po splnění těchto podmínek dochází k otevření iontového kanálu selektivního pro kationty a průniku iontů Na^+ , K^+ a Ca^{2+} . Jedinečnost NMDA receptory spočívá právě v jeho vysoké permeabilitě pro ionty Ca^{2+} , která hraje významnou roli v buněčné signalizaci a v již zmíněné LTP a excitotoxicitě (Chen & Lipton, 2006).

Kromě uvedených vazebných míst pro koagonisty glutamát a glycin se na NMDA receptoru nacházejí další vazebná místa pro H^+ , Zn^{2+} , polyaminy, neurosteroidy a vazebná místa uvnitř iontového kanálu, jejichž vazba může alostericky modulovat funkci receptoru a z tohoto důvodu jsou v centru pozornosti farmakologické výzkumu (Chen & Lipton, 2006; Dingledine et al., 1999).

1.1.3 Funkce NMDA receptoru

Esenciální roli hrají NMDA receptory ve schopnosti mozku měnit odpověď vůči vnějším stimulům, jak je tomu při učení a paměti. Pozornost je v tomto ohledu především věnována jejich roli v hipokampu a roli NMDA receptorů indukcí LTP a LTD, uplatňující se

v synaptické plasticitě, která je chápána jako možnost měnit sílu (efektivitu) synaptického přenosu mezi neurony v závislosti na vlastní aktivitě. To je považováno za možný buněčný mechanismus učení a uchování paměťových stop (Zito & Scheuss, 2009).

LTP může být vysvětlena jako zvýšená transmise mezi presynaptickými a postsynaptickými neurony. Poprvé byla popsána na neuronech hipokampu v gyrus dentatus u králíka, kdy po vysokofrekvenčním dráždění presynaptického neuronu došlo k dlouhodobému zvýšení synaptických odpovědí postsynaptického neuronu (Bliss and Lømo (1973).

Jak již bylo uvedeno, aktivací NMDA receptorů dochází změnou konformace k otevření póru iontové kanálu a propustnosti kationtů Na^+ , K^+ a i Ca^{2+} . Významná je vysoká permeabilita receptoru pro Ca^{2+} , protože Ca^{2+} hraje v buněčné signalizaci zásadní roli.

Ionty Ca^{2+} jsou klíčové pro aktivaci kináz, významná je aktivace Ca^{2+} /kalmodulin dependentní protein kinázy II (CAMKII), která se autofosforyluje a nezávisle na přítomnosti Ca^{2+} zůstává aktivní, její přetrvávající činnost vede k fosforylaci AMPA receptorů, čímž je zvýšena jejich vodivost a k zabudování rezervních AMPA receptorů z cytosolu na membránu neuronu. Tento mechanismus slouží k udržení časné LTP.

Pozdní fáze LTP je oproti časné charakteristická delším trváním a závislostí na syntéze bílkovin. Zda hraje důležitou roli extracelulárním signálem regulovaná kináza (ERK), která je aktivovaná taktéž Ca^{2+} , i ona vykazuje dlouhodobější činnost, při které spouští kaskádu vedoucí k aktivaci transkripčních faktorů a následné syntéze proteinů, které udržují pozdní fázi LTP (Lynch, 2004).

Z hlediska synaptické plasticity jako možného mechanismu paměti je podstatná účast i LTD, která je oproti LTP vyvolána opakovanou stimulací o nižší frekvenci vedoucí naopak k zeslabení (komunikaci) synaptického přenosu mezi neurony a dochází při ní k aktivaci fosfatáz (Malenka & Bear, 2004, Zito & Scheuss, 2009).

Vtokem Ca^{2+} do intracelulárního prostoru ovšem dochází i k patologickým stavům, jak je tomu při excitotoxicitě, kdy dochází k aktivaci mnoha enzymů včetně fosfolipáz, endonukleáz a proteáz (například calpain) a produkci volných radikálů narušující strukturu cytoskeletu, buněčných membrán a DNA, což následně vede k buněčné degeneraci (Chen & Lipton, 2006). NMDA receptory se také významně podílejí na mnoha dalších procesech odehrávajících se v plně vyvinuté CNS i během jejího vývoje. Studie poukazují na jejich účast v buněčné migraci, proliferaci a přežívání neuronů. Narušení vlastností NMDA

receptorů v určitých (kritických) období během vývoje mozku, tak může vyústit v poškození funkce CNS projevující se až v dospělosti (Constestabile, 2000).

Naskytá se také otázka, proč po vniknutí stejného iontu do buňky může docházet k tak protichůdným buněčným odpovědím jako jsou LTP a LTD či neuroprotektce a excitotoxicita. Jedním z možných vysvětlení by mohl být prostorový a časový model (prostorová a časová závislost) vtoku Ca^{2+} do buňky, kdy se spekuluje, že tok iontů Ca^{2+} do buňky synaptickými NMDA receptory spouští signální buněčnou kaskádu vedoucí k aktivaci neurotrofických faktorů např. „brain derived neurotrophic faktor“ (BDNF), zatímco vstup Ca^{2+} extrasynaptickými neurony vede naopak k inhibici exprese BDNF. (Zhou & Sheng, 2013; Zito & Scheuss, 2009)

Na základě experimentálních studií se nyní se výzkum hipokampálních NMDA receptorů zabývá i jejich úlohou v afektivních poruchách – úzkosti a zejména v depresi. Neboť experimenty poukazují, že jejich inhibice se projevuje anxiolytickými a antidepressivními účinky (Engin et al., 2009).

1.1.4 Hipokampus

Jak již bylo uvedeno, funkce hipokampu je dlouhou dobu studována z hlediska LTP, kde klíčovou roli hrají NMDA receptory. Tato funkce tak souvisí se schopnostmi jako je učení, paměť a prostorová orientace (Lynch, 2004).

V současné době je kladen větší důraz na funkční rozdělení hipokampu u potkana v jeho ventrální ose. Toto dělení se opírá o výsledky anatomických, behaviorálních i molekulárně biologických studií, které naznačují, že dorzální část hipokampu u hlodavců je podstatná pro kognitivní funkce, zatímco ventrální část hraje významnou roli ve zpracování emocí a stresových situací na což poukazuje (Fanselow & Dong, 2010).

Tento jev potvrzují studie, které ukázaly, že cytotoxické léze dorzálního hipokampu u hlodavců vedou k narušení prostorové orientace, ale neovlivňují úzkost. Oproti tomu ventrální hipokampální léze snížily míru úzkosti. Zvířata strávila více času v otevřených ramenech vyvýšeného křížového bludiště, což je považováno za behaviorální korelát snížené anxiety (Barkus et al., 2010).

Těmto odlišným vlastnostem hipokampálních oblastí odpovídá i jejich anatomické propojení (Fanselow & Dong, 2010). Z hlediska emociálního zpracování je podstatný Papežův okruh, jehož role je významná v kontrole emocí. Dále se ukazuje, že hipokampus vykonává

silnou kontrolu hypotalamo-hypofyzární osy (HPA) a hipokampální léze tak zhoršuje možnost zpracovat adekvátně stresové faktory. Na druhé straně zvýšení stresových hormonů vede k hipokampální dysfunkci jak u lidí, tak u hlodavců (Fanselow & Dong, 2010).

Ventrální část hipokampální oblasti CA1 a subikula jsou propojeny především s amygdalou, mediálním prefrontálním kortexem a jádrem nucleus accumbens. Ventrální CA1 a subikulum je dále úzce propojeny s lůžkovým jádrem stria terminalis tzv. „bad nucleus of stria terminalis“ (BST). Tato struktura vysílá přímou projekci a inervuje neuroendokrinní neurony v hypotalamických paraventrikulárních jádrech uvolňující kortikotropin uvolňující hormon („kortikotropin uvolňující hormon“ - CRH). Jádra BST hrají klíčovou roli pro hipokampální regulaci HPA osy v reakci na psychologický stres. Struktura BST se tak zdá být klíčová pro pochopení neuroendokrinní dysfunkce asociované s psychiatrickými chorobami (jako jsou deprese a úzkost; Fanselow & Dong, 2010).

Hipokampus se tedy podílí na zpracování informací souvisejících s kognicí, zároveň však hraje podstatnou roli v regulaci procesů souvisejících s emocemi. Jak již bylo zmíněno, pro funkci hipokampu jsou klíčové NMDA receptory a jak bude dále popsáno, i tyto receptory hrají klíčovou roli nejen v kognici, ale i v zpracování emotivních reakcí, s čímž souvisí i zpracování stresových podnětů (Fanselow & Dong, 2010).

Studie dokládají, že uvolnění glukokortikoidů v důsledku stresujících podnětů ovlivňuje glutamatergní neurotransmisi v prefrontálním kortexu (PFC) a v hipokampu, což může mít vliv na některé aspekty kognitivních procesů (Popoli et al., 2012).

Ukazuje se tak, že emoce a kognice spolu souvisí a právě v této souvislosti může klíčovou roli hrát hipokampus především jeho část gyrus dentatus a NMDA receptory (Eisch & Petrik, 2012). Studie navíc dokládají zmenšení objemu hipokampu u pacientů trpících depresí a opět je zde zmiňována role stresu, který prostřednictvím HPA osy spustí signální kaskádu vedoucí k snížení BDNF a s tím související snížení neurogeneze (Shelin, 2011).

V této práci nejdříve pojednám o NMDA antagonistovi MK-801 a následně krátce o roli glutamatergní neurotransmise v souvislosti s působením NMDA antagonistů v depresivním onemocnění. Posléze se podrobněji zaměřím na NMDA antagonisty v souvislosti se schizofrenním onemocněním s důrazem na kognici.

NMDA antagonisté jsou z tohoto pohledu velice podstatné pro studium mechanismů schizofrenie i afektivních poruch. Po jejich aplikaci je možné pozorovat u zdravých dobrovolníků schizofrenii podobnému chování (Krystal et al., 1994). Zároveň však tyto látky

mají prokazatelné antidepresivní účinky (Skolnick et al., 2009). Jednou z látek z těchto vlastností je dizocilpin (MK-801) působící jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů.

1.1.5 MK-801 a NMDA receptor

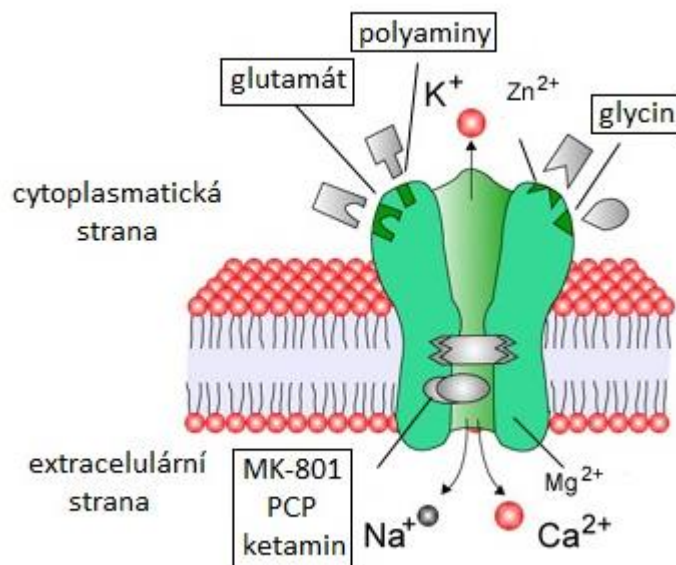
Látka MK-801 je sekundární amin (5R,10S)-[+]-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine). Byl syntetizován roku 1982 s cílem zabránit nadměrné aktivaci NMDA receptorů (Bubeníková et al., 2008; Olney et al., 1989, Kochlar et al., 1991, Kovacic & Somanathan, 2010).

MK-801 působí jako nekompetitivní antagonist, což znamená, že o vazebné místo nekompetuje s agonisty (glutamát, glycin popřípadě D-serin) NMDA receptoru, ale váže se na jiné místo na receptoru, čímž dochází k ovlivnění jeho aktivity (Kovacic & Somanathan, 2010).

Vazebné místo látky MK-801 se nachází uvnitř iontového kanálu NMDA receptoru (viz obr. 1) a receptor je inhibován napětově závislým způsobem. K tomu, aby se látka MK-801 mohla úspěšně navázat je totiž nutná předcházející aktivace a změna konformace NMDA receptoru a tím otevření iontového kanálu (Chen & Lipton, 2006).

Látka MK-801 má kladný náboj a váže se dovnitř jako Mg^{2+} , na rozdíl od něj je však silným a dlouhodobým blokátorem NMDA receptoru. Vykazuje vysokou afinitu k vazebnému místu NMDA receptoru uvnitř iontového kanálu (Kovacic & Somanathan, 2010), avšak její nevýhodou je velmi pomalé („off-rate“) opuštění póru NMDA receptoru, což postupně vede i k inhibici normálně se vyskytujících a následných funkcí zprostředkovaných NMDA receptory.

Tyto vlastnosti MK-801 mohou být zodpovědné za její nežádoucí účinky. Po aplikaci MK-801 jsou u experimentálních zvířat pozorovány psychomimetické projevy chování (Bubeníková et al., 2008), dochází k možnému vzniku komatu a k neurotoxickému účinku vedoucímu k degeneraci neuronů, tzv. Olneyho léze (Olney et al., 1989). Tím je znemožněno použití MK-801 v klinické praxi (Chen & Lipton, 2006). Experimentálních studie dokládají i anxiolytické a antidepresivní působení MK-801 (Engin et al., 2009).



Obrázek 1: Struktura NMDA receptoru. Na obrázku jsou názorně vidět vazebná místa na receptoru. Nekompetitivní antagonist MK-801 se váže dovnitř iontového kanálu (upraveno podle <http://neur2201.unsw.wikispaces.net/Aspartame+-+The+Sweet+Killer>).

2 Depresivní porucha

Deprese je neuropsychiatrické onemocnění spadající do skupiny afektivních poruch neboli poruch nálad. Deprese je stav charakterizovaný mimo jiné smutkem, beznadějí, pocity viny, vlastní špatností, somatickými a vegetativními obtížemi. Depresivní člověk není schopen obvyklým emocionálním způsobem reagovat na okolní situace, což může vést až ke stavu beznaděje, bezmoci a zoufalství. Příčina tohoto onemocnění není přesně známa, předpokládá se multifaktoriální podmínění, kde svou roli hrají dispozice genetické, změny vývojově podmíněné i zátěžové faktory prostředí (především stresové situace). Ovšem přesný podíl jednotlivých faktorů na propuknutí onemocnění není zcela objasněn (Hoschl, 2004; Mysliveček et al., 2009).

U pacientů trpících depresí se projevují symptomy je ztráta zájmu a potěšení z aktivit, které předtím pacienta těšily. Objevuje se snížená chuť k jídlu vedoucí ke ztrátě hmotnosti, nebo naopak výrazná chuť k jídlu, nadměrný spánek, či naopak zhoršená schopnost spaní. Anhedonie, neboli neschopnost prožívat radost, psychomotorická agitace (chorobný neklid), nebo retardace. Dále se objevuje pocit ztráty energie, bezcennosti a viny, neschopnost se

plně koncentrovat a přemýšlet, nerozhodnost, úzkost, nezáměr, pocit tíže, sebevražedné myšlenky a další (Hoschl, 2004; Mysliveček et al., 2009; Skolnick et al., 2009).

Deprese během života postihuje až 20% populace (přesná hodnota se liší u jednotlivých autorů podle kritérií depresivního onemocnění a podle sledované populace). I když byl zaznamenán v léčbě deprese obrovský pokrok, stále není léčba zcela uspokojivá (Hashimoto, 2011; Skolnick et al., 2009). Předepisovány jsou především léčiva ovlivňující hladinu biogenních aminů v mozku především serotoninu a norepinefrinu. Ovšem tato terapie je účinná pouze u 60-65% pacientů a navíc je pro ni typický pomalý nástup účinku. Zlepšení příznaků je pozorováno nejdříve za dva, nebo dokonce až za čtyři týdny a během této doby nedochází k žádnému subjektivnímu zlepšení, což může vyústit například i v pokus o sebevraždu pacienta (Skolnick et al. 2009).

2.1 Neurobiologie deprese

Dlouhou dobu byla za příčinu deprese považována disbalance v hladině monoaminů jako je dopamin, noradrenalin a především serotonin v CNS. Tyto názory vznikly na základě pozorování látek ovlivňující hladiny monoaminů v CNS, které měly antidepressivní účinky působících antidepressivně a zároveň ovlivňujících hladiny těchto monoaminů v CNS. Jednou z takových substancí je látka iproniazid, které působí jako inhibitor monoaminoxidázy, což je enzym degradující monoaminy. Původním cílem podání této látky byla léčba tuberkulózy, avšak bylo pozorováno, že vykazuje i antidepressivní účinky (Dally, 1958). Další zajímavou látkou přispívající k pochopení monoaminergního systému v CNS je látka reserpin. Tato látka způsobuje v nervovém zakončení depleci v monoaminu. Pacientům byla předepisována jako lék na snížený krevního tlaku, ale často se po této léčbě vyskytly u pacientů negativní vedlejší účinky, které se projeví depresivním stavem pacienta a případně i jeho sebevraždou (Vinař, 2010).

V souladu s těmito nálezy se tak směr výzkumu farmaceutického průmyslu soustředil na rozvoj látek ovlivňujících hladiny monoaminů v CNS jako potenciální léčbu u pacientů trpících depresivní poruchou. Tyto látky působí jako inhibitory monoaminoxidázy (MAO-I) a inhibitory zpětného vychytávání serotoninu nebo noradrenalinu ze synaptické štěrbin (Hashimoto et al., 2009). Avšak léčba pomocí těchto látek není zcela uspokojivá, neboť nástup účinku těchto látek je pozorován nejdříve za více jak dva týdny od podání látky.

V souvislosti s depresivním onemocněním se uvažuje, že zásadní roli zde může hrát disbalance ve funkci HPA osy, která vede k produkci glukokortikoidů působících prostřednictvím glukokortikoidních receptorů na glutamatergní neurony, což vede k nadměrnému výlevu glutamátu, excitotoxickému působení a nerodegeneraci neuronů (Popoli et al., 2011; Eisch & Petrik, 2012).

Dlouhodobé podávání antidepresiv vede k expresi BDNF, což má za následek neurogenezi a působí tak proti neurotoxickému účinku kortikosteroidů. Z tohoto důvodu se, ale nástup antidepresivního efektu projeví nejdříve až za tři týdny (Hoschl, 2004).

Nyní je v souvislosti s urychlením nástupu terapeutického efektu antidepresiv věnována pozornost studiím, kde aplikace látek ovlivňujících glutamatergní systém vyvolává rychlý nástup antidepresivního účinku u pacientu trpících depresí (Skolnick et al. 2009).

2.2 Glutamatergní teorie deprese

Mnoho nedávno provedených studií odkazuje na významnou roli glutamatergní transmise v depresivním onemocnění, a tak na novou příležitost léčby této choroby (Hashimoto 2009, 2011; Salvatore & Singh, 2013).

V této souvislosti je významný ketamin, což je látka původně používaná jako anestetikum od roku 1970. Kvůli psychomimetickým vedlejším účinkům bylo však jeho užívání jako anestetika v humánní medicíně zastaveno, nadále se však používá ve veterinární medicíně. Ve studiích provedených u pacientů s depresivní poruchou, kterým byla infuzně aplikována subanestetická dávka ketaminu byl následně pozorován antidepresivní účinek (Salvatore & Singh, 2013).

Ve dvojitě slepé, randomizované, placebem kontrolované studii provedené u pacientů s unipolární a bipolární depresí (a zároveň rezistentními na léčbu běžnými antidepresivy) se po podání ketaminu v jedné dávce 0,5 mg/kg v průběhu 40 minut signifikantně zlepšily depresivní symptomy. Toto zlepšení bylo pozorováno v průběhu 72 hodin (Berman et al., 2000).

V další studii, také dvojitě slepě randomizované, provedené u pacientů s unipolární depresí byl také pozorován antidepresivní vliv ketaminu. V této studii byl zaznamenán výrazně rychlý (během 2 hod.) nástup antidepresivního účinku ketaminu. Infuze ketaminu byla opět aplikována v dávce 0,5 mg/kg v průběhu 40 minut pacientům, kteří stejně jako

v předchozí studii neodpovídali na léčbu konvenčními antidepresivy. V této studii se podařilo zaznamenat zlepšení u 71% pacientů po jednom dni. U některých byl pozitivní vliv pozorován i po delší dobu než jeden týden (Zarate et al., 2006).

I další studie poukazují na pozitivní vliv ketaminu u pacientů trpících depresivní poruchou. Hlavní výhodou antidepresivního působení ketaminu spočívá v jeho rychlém nástupu účinku, který je pozorovaný už v řádu hodin, oproti několikátýdennímu nástupu běžně předepisovaných antidepresiv např. MAO-I a inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. Dalším důležitým zjištěním je, že tato látka je schopná vyvolat antidepresivní účinek i u pacientů, kteří jsou na konvenční léčbu antidepresivy rezistentní (Hashimoto, 2009; Skolnick et al., 2009).

Jak již ale bylo zmíněno, nevýhodou podání této látky jsou její pozorované vedlejší účinky, kdy bylo zjištěno, že tato látka vyvolává u zdravých dobrovolníků chování podobné psychóze (Krystal et al., 1994). Ketamin se dokonce k modelování psychózy, konkrétně schizofrenie, v experimentech používá. Při vyvolání psychózy je mírně odlišný způsob aplikace látky. Podává se jednorázová infuze, typicky 0,23 – 0,26 mg/kg v průběhu 1-2 minut. Tato infuze je následována infuzí v dávce 0,40 – 0,60 mg/kg v průběhu jedné hodiny (Salvadore & Singh, 2013).

2.3 Animální modely

Animální modely jsou klíčové pro modelování různých chorob, neboť umožňují podrobnější zkoumání příčin projevů dané choroby a možnost testování potenciálních léčiv. Cílem animálních modelů není plně reflektovat patofyziologii daného onemocnění, ale najít určité shody mezi změnami od úrovně molekulární až po úroveň behaviorální projevující se u zvířat a příznaky vyskytujícími se u pacientů trpících danou chorobou (Geyer & Moghaddam 2002).

Animální modely lze vytvářet v širokém spektru prostřednictvím genetické, vývojové, farmakologické i behaviorální manipulace s experimentálními zvířaty či ovlivněním jejich prostředí. Animální modely se tak dělí na genetické, vývojové, farmakologické a behaviorální (Lipska & Weinberger., 2000; Marcotte et al., 2001).

Výzkum se může zaměřit na pozorování a ovlivnění pouze jednoho faktoru, či sledovat výsledný projev při kombinaci více činitelů. Hodnocení animálních modelů probíhá

z hlediska konstrukční, fenomenologické a predikční validity. Konstrukční validita je posuzována podle úspěšnosti modelu reprodukovat teorii a hypotézy etiopatogeneze daného choroby. Fenomenologická validita udává míru podobnosti mezi projevy chování zvířete a symptomy pozorovanými při daném onemocnění. Prediktivní validita je hodnocena podle schopnosti modelu reagovat na léčení modelovaných příznaků podobně jako odpovídají na léčbu pacienti trpící danou nemocí (Lipska & Weinberger., 2000; Marcotte et al., 2001; Yan et al., 2010).

2.3.1 Animální model depresi podobného chování

Současné animální model depresi podobného chování jsou hodnoceny především podle působení známých antidepressivních látek a projevujících se reakcí na stresující podmínky. Nejčastěji používané behaviorální animální modely deprese jsou chronický mírný stres, kdy je zvíře po delší dobu vystaveno nějakému nepředvídatelnému sledu stresorům např. nepříjemnému zvuku, imobilizaci, narušení světelného cyklu a další. Pak je také hojně využíván model sociální porážky („social defeat“), kdy je jedinec v cizím prostředí vystaven konfliktu s jiným jedincem, který toto prostředí obývá. Zajímavým modelem depresi podobného chování je model naučené bezmocnosti, tento stav je vyvolán stresorem, který jedinec nemůže předvídat, kontrolovat a ani před ním uniknout, často se používají slabé elektrické ranky. O tomto modelu následně podrobněji pojednán (Yan et al., 2010).

2.3.2 Naučená bezmocnost

Jedním z nejvíce diskutovaných animálních modelů depresi podobného chování je animální model naučené bezmocnosti.

Tento fenomén byl poprvé popsán na základě studie Seligmana a Overniera roku 1967. V této studii byla zkoumána souvislost mezi klasickým podmiňováním a operantním podmiňováním. Autoři zde rozdělili psy do třech skupin. První skupina byla umístěna do popruhů („pavlovian harness“) na určitou dobu a posléze uvolněna. Druhá skupina skupina psů navíc obdržela averzivní stimuly v podobě elektrické ranky, ale tyto podněty mohla ukončit pomocí páčky. Třetí skupina psů také obdržela elektrické stimuly stejné intenzity a trvání, ty však nikdy nemohla ukončit svou vlastní aktivitou. Následně tyto skupiny psů byly umístěny do „shuttle boxu“ sloužícímu k operantnímu podmiňování, kde se mohly vyhnout

šoku přeskočením bariéry. Většina psů z této třetí skupiny, nebyla schopna žádné reakce a pasivně přijímala averzivní podněty, oproti psům z ostatních skupin, kteří byli schopni se úlohu naučit. Zdá se, že předchozí zkušenost jedince s nepředvídatelnými averzivními stimuly, kterým se nemůže vyhnout vlastní aktivitou, interferuje s jeho schopností se následně naučit těmto stimulům vyhnout, ikdyž už je to možné. Tito psy ze třetí skupiny byli takzvaně naučeně bezmocní. Pokud se tedy zvíře naučí, že nemůže kontrolovat averzivní podněty (vyhnoutí se elektrické rance) upadá do stavu bezmoci a demotivace (Maier & Seligman, 1976).

S termínem naučené bezmocnosti se pracuje i v lidské psychologii. Předpokládá se, že naučená bezmocnost se rozvine, pokud jedinec dospěje k přesvědčení, že jeho činnost nemá vliv na důsledky událostí. Jedinec nemá kontrolu nad výsledky svého jednání a to ani v situaci, kdyby tati kontrola byla možná. Nevytvoří se spojení mezi činností a důsledkem v kontrolované situaci. Jedinec nedokáže ovlivnit zdroj stresu (Maier & Seligman, 1976).

Často tomu je tak, když se mění pravidla za pochodu (v průběhu pokusu), například pokud jednou je stejná odpověď potrestána (neodměněna) a pak následně netrestána (odměněna), nebo když se jedinci podaří vykonat správnou odpověď, ale nedokáže ji pak už zopakovat. Jedinec se tak naučí, že se nelze nic naučit a rezignuje na vykonání jakékoliv činnosti (Maier & Seligman, 1976).

Tento fenomén je pozorován i u hlodavců jako tzv. „freezing“ (Seligman & Beagley, 1975).

Naučená bezmocnost souvisí s dalšími psychologickými procesy jako motivace, kognice a emoce, které jsou po předchozí zkušenosti s nekontrolovatelnou událostí narušeny. Kognice se týká aspektu, kdy je jedinec vystaven nekontrolovatelné události, která interferuje s jeho tendencí vnímat podmíněný vztah mezi jeho chováním a výsledkem dané situace (Maier & Seligman, 1976).

Myšlenkou naučené bezmocnosti je představa, že všechna zvířata včetně lidí jsou schopna se naučit, že vnější vlivy jsou neovlivnitelné. To představuje zásadní změnu v porovnání s předchozími studiemi týkajícími se učení, které se zaměřovaly na učení v ovlivnitelných situacích (Maier & Seligman, 1976).

U zvířat nacházejících se v tomto stavu je pozorována snížená hmotnost, narušené sexuální chování, zvýšená hladina kortikotropin růstového faktoru a kortikosteronu.

Model naučené bezmocnosti představuje významnou fenomenologickou a predikční validitu (Yan et al., 2010).

Teorii naučené bezmocnosti doplňuje ještě studie Weiss et al., 1975.

Během studie Seligmana a Overniera bylo pozorováno, že psi, kteří projdou procesem, kdy obdrží nekontrolovatelné averzivní stimuly, nejsou schopni se pak naučit vyhýbat averzivnímu stimulu pokud jsou testováni po 24 hodinách. Pokud však jsou poprvé testováni až za 48 hodin, není tato neschopnost u nich pozorována. Ukázalo se, že tato skutečnost souvisí s hladinou noradrenalinu v CNS, která je nejnižší po vystavení nekontrolovatelného stresoru, avšak po 48 hodinách je už opět navrácena do normálních hodnot. Také se ukázalo, že chronické vystavení potkanů nekontrolovatelnému šoku vedlo nakonec k naučení se vyhýbat averzivnímu podnětu. Opět to zřejmě souvisí obnovou hladinou noradrenalinu (Weiss et al., 1975). U zvířat, která mají kontrolu nad averzivními podněty nedochází k deficitu noradrenalinu (Maier & Seligman, 1976).

2.3.3 Behaviorální testy

Mezi velice rozšířené behaviorální testy používané k rychlému screeningu potenciálních antidepresivních látek patří test nuceného plavání („Forced swimming test“-FST) a „Tail suspension test“ (TST).

Ve FST jsou zvířata umístěna do válce naplněného vodou, tak aby nedosáhla na dno. Zvíře může mít různé behaviorální strategie: aktivní plavání (popřípadě šplhání), nebo pasivní splývání („floating“). Měří se poměr doby, kdy zvíře plave a je aktivní a doby, kdy pasivně splývá. Podání běžných antidepresiv zvyšuje u zvířat dobu strávenou plaváním, oproti zvířatům, kterým antidepresiva podána nebyla a u kterých je ve výše míře pozorována nehybnost projevující se splýváním na hladině a tak snížená snaha o únik (Yan et al., 2010).

Na podobném principu je i TST prováděn především u myší, které jsou zavěšeny za ocásek. Opět je zde měřena doba, kdy je zvíře aktivní a snaží se o únik versus jeho imobilita.

Podání antidepresiv opět zvyšuje dobu, po kterou je zvíře aktivní.(Yan et al., 2010). Výhoda TST oproti FST je například v souvislosti s hypotermií a motorickou dysfunkcí zvířete.

Výhoda obou testů je v poměrně malých nákladech, rychlém „screeningu“ mnoha potenciálních antidepresivních látek, neboť tyto modely mají velmi silnou predikční validitu. Nevýhodou je však nízká konstrukční a fenomenologická validita. Kromě toho podání antidepresiv zvířatům v těchto testech neodpovídá časovému průběhu klinického počátku účinku u lidí (Yan et al., 2010).

2.3.3.1 NMDA receptory v souvislosti s depresí

Studie ukazují, že podání látek, které mají vlastnosti nekompetitivních NMDA antagonistů MK-801 a ketaminu, signifikantně snížily ve FST imobilitu a zvýšily dobu strávenou plaváním, podobně jako standardní antidepresivum fluoxetin. Látka MK-801 v dávce 0,02 mg/kg sice zvýšila i dráhu zvířete v otevřené aréně (test „open field“), avšak v dávce 0,06 mg/kg, tomu tak nebylo. Ketamin prokázal antidepresivní účinek, aniž by zvýšil u zvířat lokomoci (Engin et al., 2009).

Ukazuje se, že akutní stres vyvolá prostřednictvím kortikosteronu působícího na glukokortikoidní receptory zvýšený výlev glutamátu v PFC a frontální kůře (Popoli et al., 2012). Tento jev je spojován s modelem naučené bezmocnosti, kdy vystavení jedince nekontrolovatelným averzivním stimulům nadměrně zvýší hladinu glutamátu v PFC. Nadměrný výlev glutamátu v PFC během nekontrolovatelných averzivních podnětů tak může vést k deficitu únikové reakce u zvířat, která je pozorována v modelu naučené bezmocnosti. Předpokládá se, že inhibice NMDA receptorů ve frontální kůře během nekontrolovatelných averzivních stimulů zabraňuje deficitu v únikové reakci. Inhibice NMDA receptorů může tak může zabránit nadměrné aktivaci a senzitivizaci NMDA receptorů během pretréninku, kdy jsou zvířata vystavena nekontrolovatelným stresorům (Hunter et al., 2003).

Další studie toto tvrzení potvrzuje. Akutní stres („foot shock“) zvýšil depolarizaci, která vedla k signifikantnímu výlevu glutamátu v prefrontální a frontální kortex. Potvrdila se signalizační kaskáda vedoucí od akutního stresu přes zvýšenou hladinu kortikosteronu, aktivaci glukokortikoidních receptorů a akumulaci presynaptických SNARE komplexů v synaptické membráně. Zvýšená depolarizace tak vyvolala uvolnění glutamátu v prefrontální a frontální kůře. Tato studie dále ukázala, že zvýšenému výlevu glutamátu bylo zabráněno předchozím podáním antidepresivních léčiv (Musazzi et al., 2010). I další studie toto tvrzení potvrzuje a naznačuje, že zvýšená hladina glutamátu během modelu naučené bezmocnosti by mohla souviset se sníženým vychytáváním glutamátu astroglie (Zink et al., 2009).

Ve studii, kde byl použit model naučené bezmocnosti, byla MK-801 podána akutně 30 minut před nekontrolovatelným averzivním stimulem zvířatům u nichž se rozvinula naučená bezmocnost. Tato zvířata se po aplikaci MK-801 chovala podobně jako intaktní zvířata během testovacího sezení, kdy mohla averzivnímu podnětu uniknout. Ukázalo se také, že koaplikace tricyklického antidepresiva imipraminu a MK-801 vedla k antagonistickému působení MK-801 na účinek imipraminu v modelu naučené bezmocnosti.

To mohlo být způsobeno negativní interakcí mezi MK-801 a imipraminem, která ve výsledku vede odstranění antidepresivního účinku obou těchto látek a poukazuje, že blokáda NMDA receptorů antagonizuje antidepresivní efekt imipraminu (Meloni et al., 1993).

Ve studii, kde zvířata prošla mírným chronickým stresem, byla u těchto zvířat pozorována snížená spotřeba cukernatého roztoku (1%), který je obvykle preferován. Tento projev se považuje za model anhedonie, neboli neschopnosti prožívat radost, což jeden ze základních příznaků depresivního onemocnění. Model chronického mírného stresu vede u zvířat ke snížené reakci na podněty přinášející odměnu. Pozorovaný fenomén může být u zvířat zvrácen chronickým podáváním antidepresiv. V této studii se opět prokázaly antidepresivní vlastnosti nekompetitivního antagonisty MK-801. Tato látka byla podávána chronicky intraperitoneálně a ke zlepšení došlo postupně během 4-5 týdnů. Účinek MK-801 byl srovnatelný s výsledkem pozorovaným po podání tricyklického antidepresiva imipraminu podávaného stejným způsobem (Papp & Moryl, 1994).

Ve studii, kde byl použit FST, aplikace MK-801 zvýšila aktivitu zvířat ve snaze o únik. Opět se tak podle kritérií tohoto testu prokázal antidepresivní účinek MK-801 (Maj et al., 1992a). I v další studii se ukázal tento antidepresivní účinek MK-801 v FST (Mantovani et al., 1999).

2.3.3.2 Souvislost mezi depresivním a schizofrenním onemocněním

Výše zmíněné studie naznačují, že látky působící jako NMDA antagonisté mají prokazatelné antidepresivní účinky. Jak, ale bude podrobně zmíněno níže, tyto látky jsou zároveň schopné vyvolat psychomimetické účinky. Toto ukazuje na roli glutamatergního systému v obou těchto onemocněních. Na roli NMDA receptorů v depresivním onemocnění ukazují i studie, kdy antidepresiva působí prostřednictvím ovlivnění NMDA receptorů, ovšem není přesné zřejmé jakým způsobem. Studie naznačují, že tricyklická antidepresiva se nejspíše vážou dovnitř iontového kanálu NMDA receptorů (White et al., 1990), kde mohou interagovat s vazebným místem pro fencyklidin (PCP) (Sills & Loo, 1989), nebo se váží mimo iontový kanál receptorového komplexu a interagují s vazebným místem Zn^{2+} (Reynold et al., 1988).

Dále se ukazuje souvislost mezi depresivním a schizofrenním onemocněním i na molekulární úrovni související s neurogenézí a BDNF. S tím souvisí role stresové osy HPA, kdy stres snižuje BDNF, což může ve výsledku přispět ke snížení hipokampálního objemu

(Angelucci et al., 2005). Jak bylo zmíněno výše, disbalance v této regulaci vede k produkci glukokortikoidů působících na glutamatergní neurony spouštějící nadměrný výlev glutamátu, který tak může vést k excitotoxickému působení v PFC a hipokampu (Popoli et al., 2011; Eisch & Petrik, 2012). Tyto struktury jsou pro schizofrenii a afektivní poruchy klíčové a uvažuje se, že hipokampus hraje ústřední roli v procesu kontrole emocí a v separaci okolních podnětů, které současně ovlivňují kognici (Eisch & Petrik, 2012).

3 Schizofrenie

Schizofrenie je komplexní neuropsychiatrické onemocnění dosud neznáme etiologie projevující se obvykle mezi 15-30 rokem života, které postihuje přibližně 1% světové populace (Laruelle et al., 2003).

Zdá se, že na jejím propuknutí se účastní komplex více faktorů a nepochybně tu svou roli hraje jak genetika, tak i vnější prostředí, ovšem o míře vztahu mezi těmito vlivy můžeme jen spekulovat (Höschl et al., 2004; Mysliveček et al., 2009).

Schizofrenie je laickou veřejností mylně chápána jako rozdvojení osobnosti. Termín schizofrenie ve skutečnosti znamená „rozštěpení mysli“. Tento termín poprvé ho použil v roce 1911 Eugen Bleuler a má vystihovat rozštěpení a fragmentaci mezi různými mentálními funkcemi, například mezi myšlenkovým obsahem a projevem emocí, kdy kupříkladu pacient se schizofrenií vypráví nějaký hrůzostrašný příběh bez odpovídajícího projevu emocí (Höschl et al., 2004).

Schizofrenie je skupina závažných duševních poruch projevující se narušením integrity psychických projevů. Jsou pozorovány poruchy vnímání, myšlení, afektivity, které nakonec ve svém důsledku postihují osobnost jako celek (Höschl et al., 2004; Mysliveček et al., 2009).

Zdá se, že během schizofrenie mozek chybně odečítá realitu a dochází tak narušenému zpracování informací. Schizofrenie se u pacientů projevuje poruchou myšlení, jednání, zpracování informací, vnímání, poruchami emocí a vůle, což ve výsledku vede k omezené schopnosti pacienta srozumitelně jednat a chovat se v souladu s okolnostmi (Höschl et al., 2004; Keefe & Harvey., 2012, Mysliveček et al., 2009).

Příznaky schizofrenie je možné dělit na pozitivní, negativní a kognitivní. Pojem „pozitivní“ vznikl ve smyslu vnímání něčeho navíc oproti stavu při normálním fungování CNS. Při pozitivních příznacích pacient může prožívat halucinace, bludy, iluze a není tak schopen

rozlišit vnější realitu. Příznaky negativní jsou definovány naopak jako ochuzení od normálního fungování organismu. Tyto příznaky jsou charakterizovány slabým projevem emocí, nedostatkem spontaneity, neschopností prožívat radost a zmobilizovat vůli. Narušení kognitivních schopností se týká takových oblastí jako deficitu v pozornosti, pracovní paměti, učení, zpracování informací, sociální kognici a dalších (Höschl et al., 2004).

3.1 Neurobiologie schizofrenie

Jak již bylo zmíněno, o přesné příčině schizofrenie můžeme doposud jen diskutovat. Ovšem svou pozornost si v této problematice získaly neurotransmitery, neboť ovlivnění jejich homeostázy v mozku vede k projevům chování, které je do určité míry podobné příznakům vyskytujícím se u schizofrenie.

Nejstarší teorií schizofrenie je z tohoto pohledu hypotéza dopaminergní (Seeman, 1987). Tato hypotéza vznikla na základě pozorování, že látky stimulující výlev neuropřenašeče dopaminu mohou vyvolat psychózu a že látky působící jako antipsychotika působí prostřednictvím antagonismu D2 receptorů (Coyle et al., 2003). Tuto hypotézu také podporují pozorování, kdy se po požití amfetaminu a podobných látek objevily u zdravých dobrovolníků psychotické příznaky. Dále tuto teorii podporují také studie, kde byl podán amfetamin schizofrenním pacientům, čímž u nich došlo ke zhoršení psychotických příznaků oproti kontrolám, u kterých stejná dávka nevedla k vyvolání psychózy (Marcotte et al., 2001). Podle dopaminergní hypotézy by některé příznaky schizofrenie mohly souviset s nadměrnou stimulací dopaminových D2 receptorů ve striatu a naopak sníženou aktivitou dopaminových D1 receptorů v prefrontální oblasti (Laruelle et al., 2003).

Tato teorie byla také podpořena produkcí antipsychotik první generace účinkující jako antagonisté dopaminových D2 receptorů, mezi nejznámější patří například haloperidol. Z dnešního pohledu jsou tato antipsychotika účinná v léčbě pozitivních příznaků, avšak v ostatních oblastech symptomatologie schizofrenie jsou bohužel neúčinná, zároveň se při jejich užívání objevují u pacientů negativní vedlejší účinky projevující se jako extrapyramidové příznaky (Ohno, 2011).

Výzkum postupoval dál a svou pozornost si dále získaly i další neurotransmitery jako hl. inhibiční neurotransmitter kyselina γ -amino máselná (GABA), kde mnoho post-mortem studií poukazují na vzniklé abnormality v GABAergní neurotransmisi v mozcích pacientů

trpících schizofrenií. (Neill et al., 2010). GABAergní signalizace by také mohla být významná z hlediska thalamické kontroly vnějších podnětů. Tento systém je pod GABAergní kontrolou striata, které je zase pod glutamatergní kontrolou prostřednictvím NMDA receptorů mozkové kůry. Které jsou pak pod kontrolou dalších monoaminergních systémů. Dále se NMDA receptory vyskytují na GABAergních interneuronech (Hoschl, 2004).

Dále je v této oblasti pozoruhodná role serotonergního přenosu, neb po požití halucinogenních látek například drogy LSD (diethyl amid kyseliny lysergové), je pozorováno zkreslení zrakového vnímání, vznik zrakových halucinací a emoční labilita podobající se příznakům pozorovaným v prvních stádiích psychózy jako u schizofrenie. Předpokládá se, že halucinogeny působí především jako agonisté serotonergních 5HT_{2A} receptorů. Halucinace vyvolané po požití látky LSD jsou ovšem vizuální, nikoliv sluchové, které jsou charakteristické pro schizofrenii. I přes tyto nejasnosti relevanci tohoto modelu podporují současná novější atypická antipsychotika působící jako antagonisté 5HT_{2A} receptorů (Geyer & Moghaddam., 2002).

V současnosti je pozornost výzkumu směřována také na možnou roli glutamátu. Tato myšlenka se objevila v roce 1950, kdy se ukázalo, že podání anestetika PCP, který působí jako nekompetitivní antagonist glutamátových NMDA receptorů, může vyvolat u lidí psychotický stav s podobnými příznaky, které se vyskytují během schizofrenie (Neill et al., 2010). Tuto teorii potvrdily i další studie zkoumající účinek nekompetitivních antagonistů glutamátových NMDA receptorů - PCP a ketaminu, které také prokázaly, že akutní podání těchto látek vyvolává u zdravých dobrovolníků hyperaktivitu, paranoi, halucinace a oproti předchozím uvedeným účinkům neurotransmitterů navíc i narušení kognitivních schopností (Neill et al., 2010). Proto je nyní tomuto neurotransmitteru věnována významná pozornost ohledně modelování schizofrenii podobným příznakům u lidí i v animálních modelech.

3.2 Schizofrenie a kognitivní schopnosti.

V posledních letech se výzkum schizofrenie zaměřil na léčbu kognitivních schopností, které nám umožňují orientovat se a neustále se přizpůsobovat měnícímu se okolnímu prostředí. V současnosti se uvažuje o kognitivním deficitu jako o stěžejném postižení u schizofrenie. U pacientů se schizofrenií jsou především narušeny takové oblasti kognice jako je pozornost, deklarativní paměť (sémantická i epizodická), verbální plynulost, učení

a paměť, vizuální učení a paměť, pracovní paměť, rychlost zpracování informací a sociální kognice. Narušeny jsou také exekutivní funkce, které lze chápat jako vůli, plánování, organizování a řešení problémů a emocionální seberegulaci, jež jsou nezbytné pro účelné a cílené chování (Bowie & Havey., 2006; Keefe & Harvey., 2012; Kuperberg & Heckers., 2000; O'Carroll, 2000).

Právě proto narušení kognitivních funkcí u pacientů se schizofrenií velmi omezuje celkovou kvalitu jejich života - schopnost udržet si zaměstnání, založit rodinu, komunikovat s lidmi, nezávislost na okolí a další, a je tak omezený jejich každodenní výkon a fungování ve světě (Keefe & Harvey., 2012).

Narušení kognitivních schopností je tak považováno za jeden ze základních rysů určující projev schizofrenního onemocnění, neboť se u pacientů se schizofrenií vyskytuje velmi často, kdy u více jak 75 % pacientů byl kognitivní deficit diagnostikován (O'Carroll, 2000). Kognitivní deficit je poměrně stabilní v průběhu celého onemocnění a je relativně nezávislý na dalších příznacích schizofrenního onemocnění (Gold., 2004). Kromě toho studie ukazují, že narušení kognitivních schopností se objevuje již u dětí a adolescentů, u nichž později dojde k rozvoji schizofrenního onemocnění (Keefe & Harvey., 2012; Kuperberg & Heckers.,2000; O'Carroll, 2000) a také u pacientů se schizofrenií ještě před projevem pozitivních symptomů (Davidson et al., 1999; Kuperberg & Heckers., 2000). Dále se ukazuje, že narušení kognitivních schopností se projevuje i u příbuzných pacientů se schizofrenií, což tak opět poukazuje na to, že záleží na genetickém pozadí v souvislosti s propuknutím tohoto onemocnění (Hamaoui et al., 2006; Scale et al., 2012).

3.2.1 Behaviorální flexibilita

Exekutivní funkce ve výsledku umožňují přizpůsobit chováním novým situacím a jsou tak nezbytné k zvládnání každodenních situací. Důležitou komponentou exekutivních funkcí je pojem behaviorální flexibilita. Behaviorální flexibilita je mimo jiné definována jako schopnost přizpůsobit své chování, myšlení nebo pozornost měnícím se podmínkám prostředí či na základě zpětné vazby. Je tedy třeba opustit dosud známou strategii chování a nahradit ji novou dle požadavků okolí (Miyake et al., 2000).

Při snímání aktivity mozku funkční magnetickou rezonancí (fMRI) se v úloze zaměřené na behaviorální flexibilitu projevila aktivita v částech mozku jako v PFC, bazálních gangliích, anteriorní cingulární kůře, and posteriorní parietální kůře.

(Leber et al., 2008). Schopnost behaviorální flexibility je hodnocena podle řady testů. Mezi nejznámější patří Wisconsinský test třídění karet (WCST) dále pak například Stroopův test nebo Hanojská věž jak uvádějí následující studie.

V testu WCST účastníci třídí karty podle barvy, tvaru nebo počtu obrazců na kartě. Účastníci nevědí, podle jakého kritéria mají karty třídít, ale je jim vždy dána zpětná vazba, zda byla jejich volba správná či nikoliv (Bear, 2007,). Tento test je citlivý mimo jiné především na funkci PFC (Berman et al., 1995).

Ukazuje se, že pacienti se schizofrenií projevují obtíže při řešení této úlohy. To dokládá i studie, kde pacienti se schizofrenií oproti kontrolním jedincům výrazně déle setrvali ve zvolené strategii třídění karet a nebyli schopni na základě zpětné vazby přejít na strategii novou, což naznačuje narušení funkce PFC účastníci se v exekutivních funkcích u pacientů se schizofrenií (Wobrock et al., 2009).

Ve studii, kde WCST řešili nejen pacientu se schizofrenií, ale i jejich zdraví příbuzní, byla výkonost pacientů se schizofrenií opět prokazatelně nejhorší v porovnání s příbuznými i kontrolami. Avšak příbuzní v tomto testu měli signifikantně nižší výkon oproti kontrolám. Tato skutečnost tak naznačuje, že výkonost v WCST by se mohla považovat za marker vulnerability k schizofrennímu onemocnění (Hamaoui et al., 2006).

Dalším široce používaným testem zaměřeným na hodnocení kognitivních funkcí je Stroopův test. Účastníkům jsou prezentována slova, která jsou však vytištěna odlišnou barvou, než je jejich význam. Účastníci tak musí potlačit dokonale naučenou a automaticky prováděnou činnost jako je čtení slov a pojmenovat slova podle jejich barvy a ne podle jejich obsahu (Plháková, 2005).

Předpokládá se, že tento test hodnotí schopnost selektivní pozornosti, kognitivní flexibility a rychlost zpracování. Jak Stroopův test, tak WCST vyžadují inhibici doposud zavedené strategie odpovědí a vytvoření strategie nové. Studie zkoumající vztah mezi výkonem v Stroopově testu a WCST u pacientů se schizofrenií, ukázala významnou korelaci mezi perseverací ve WCST a časem strávený nad vykonáním Stroopova testu (Rossi et al., 1997).

Studie posuzující kognitivní funkce pomocí řady testů u příbuzných pacientů se schizofrenií, demonstrovala signifikantní zhoršení v úlohách WCST a v testu verbální fluence oproti zdravým jedincům, což poukazuje na zhoršenou schopnost utváření konceptů a mentální flexibility, které se tak zdají být jako potenciální fenotypické markery vulnerability

k rozvoji schizofrenního onemocnění a opět poukazují na roli genetické predispozice v příčině tohoto onemocnění (Scale et al., 2012).

Dalším testem, který je opět zaměřen na exekutivní funkce, je test hanojské věže, kdy účastníci podle určitého pravidla musí přemístit kotouče z jedné tyče na druhou. Ukázalo se, že řešení tohoto testu opět souvisí se stimulací mediální části frontálního kortexu a u pacientů se schizofrenií byl při měření na pozitronové emisní tomografii (PET) pozorován snížený metabolismus v této oblasti (Andreasen et al., 1992).

Ukazuje se také, že pacienti se schizofrenií mají problém s myšlením v kontextu, což je koncipováno jako exekutivní funkce související s pozorností a pracovní pamětí. Zhoršení této schopnosti, tak u pacientů narušuje schopnost prezentovat a udržovat kontext informací. Studie naznačují dysfunkci či abnormální aktivitu ve frontální kůře u pacientů se schizofrenií měřenou fMRI v porovnání s kontrolami, která souvisí se zpracováním kontextu. Zpracování kontextu je zde definováno jako reprezentovat a aktivně udržovat informace požadované k selekci a plnění exekutivního úkolu, a tak zvolení vhodné strategie chování (Holmes et al., 2005; MacDonald et al., 2005).

3.2.2 Kognitivní koordinace

V poslední době je z pohledu kognitivního deficitu věnována pozornost konceptu kognitivní koordinace respektive kognitivní desorganizaci a její narušení by mohlo být jednou ze stěžejních příčin desorganizace myšlení projevující se u pacientů se schizofrenií (Phillips & Silverstein, 2003, Olypher et al., 2006).

Uvažuje se, že kognitivní koordinace se podílí na schopnosti rozlišovat mezi relevantními a irrelevantními stimuly a na seskupení těchto relevantních stimulů do koherentního vjemu podle kontextuálních požadavků. Toto názorně demonstruje příklad (viz obr. 2)

Pokud bude úkolem přečíst slovo, pravděpodobně dojde k segregaci relevantních informací (písmen) od irrelevantních (čísla) a přiřazení centrálního symbolu skupině písmen, což dohromady vytvoří slovo „cabel“. K tomuto seskupení relevantních podnětů dochází prostřednictvím rozlišení relevantních od irrelevantních stimulů a selekcí na základě asociací mezi relevantními stimuly. Význam centrálního symbolu jako čísla nebo písmena je určeno podle kontextu, v kterém jsou symboly interpretovány (Olypher et al., 2006).

12 CABLE 14

Obr 2: Ilustruje vytvoření podskupiny relevantních stimulů a kontextuální modulaci. Pokud je cílem identifikovat slovo, dochází k segregaci irelevantních čísel 12 a 14 od ostatních symbolů. A tak vytvoření skupiny relevantních písmen s centrálním symbolem interpretovaným jako B, což vede k vytvoření slova cable. Význam centrálního symbolu jako čísla nebo písmena je určeno podle kontextu, v kterém jsou symboly interpretovány (Upraveno podle Olypher et al., 2006).

U pacientů se schizofrenií se setkáváme s odlišnými výsledky v úlohách založených na tomto principu od jedinců netrpících touto chorobou. Toto potvrzuje i studie, kdy pacienti s desorganizovaným myšlením vykazovali odlišné výsledky ve vizuálních úlohách založených na „gestalt principu“, kdy se předpokládá, že výsledný vjem je ovlivněn okolním kontextem. Zdá se tedy, že pacienti s desorganizovaným myšlením mají sníženou citlivost při vnímání kontextu. Autoři opět poukazují na možnou roli procesu kognitivní koordinace, která by se tak mohla podílet na kontextuální integraci (Uhlhaas et al., 2006).

Kognitivní koordinace je také definována jako soubor neurálních procesů, které kontrolují načasování aktivity a signalizace mezi nervovými buňkami. Uvažuje se, že tímto způsobem by mohlo být umožněno v CNS selektivně aktivovat určité reprezentace, a naopak potlačit prezentace nesouvisející (Phillips & Silverstein, 2003).

Tato časová synchronizace aktivity neuronů má podporu i z oblasti elektrofyziologie. Díky moderním technologiím byla zaznamenána frekvenční aktivita mozku okolo 40 Hz také nazývané jako gama vlny. Později se ukázalo, že tato neurální synchronizace se vyskytuje během vzrušení, vnímání, integrace, selektivní pozornosti a při zapojení pracovní paměti. V současnosti někteří autoři nahlíží na časovou synchronizaci neuronů jako na klíčový proces hrající roli v uvědomění.

Jedním z možných mechanismů segregace by tak mohla být časová desynchronizace gama oscilace (Engel et al., 1999; Engel & Singer, 2001). Toto tvrzení podporuje i studie, kdy aplikace tetrodoxinu do hipokampu vyvolala maximální odpověď v gama periodě. Zdá se, že aktivace i slabě asociovaných buněk, by tak mohla narušit selektivní aktivaci a inhibici prostorově uložené reprezentace (Olypher et al., 2006).

Studie provedené u pacientů se schizofrenií poukazují na abnormality v oscilaci gama frekvence především okolo 40 Hz, při řešení kognitivní úlohy založené na principu gestalt psychologie (Spencer et al., 2003).

Jsou zde domněnky, že zásadní roli v kognitivní koordinaci by z hlediska vlastností a distribuce mohly hrát opět NMDA receptory. Jak již bylo zmíněno NMDA receptory jsou hojně rozšířeny v kortikálních oblastech a jejich vysoká hustota je patrná především v takových oblastech jako hipokampus, bazální ganglia, PFC. Dále se vyskytují nejen na pyramidových buňkách, ale i na inhibičních interneuronech, přičemž na pyramidových buňkách se vyskytují především na distálních dendritech. NMDA receptory mají několik specifických vlastností. Jejich aktivace je napětově závislá, umožňují průchod Ca^{2+} iontů a vyskytuje se u nich pomalé avšak dlouhodobé otevření iontového kanálu. Proto se předpokládá, že vzhledem k těmto vlastnostem by mohly hrát stěžejní úlohu v kontrole jednotlivých procesů probíhajících v CNS a tak se významně podílet na procesu kognitivní koordinaci. Konkrétně by toto narušení kognitivní koordinace mohlo souviset se sníženým tokem iontů NMDA receptorů (Phillips & Silverstein, 2003).

3.2.3 Senzorické a senzomotorické zpracování informací

Podstatnou součástí kognice a orientace se ve světě je příjem, zpracování a třídění informací z vnějšího okolí. Tento proces probíhá pomocí takzvaného senzorkého „gatingu“ (hradlování), kdy dochází k filtrování nadbytečných a v daném okamžiku nepodstatných stimulů přicházejících z vnějšího okolí. Tento neurobiologický proces tak zabraňuje před přehlcením CNS irrelevantními informacemi ve vyšších kortikálních oblastech.

Pomocí senzorkého gatingu je tak naše pozornost orientována pouze na důležité podněty a bezvýznamné stimuly jsou ignorovány, což ve výsledku vede k lepší orientaci v okolním světě. Zdá, že za narušení vnímání, pozornosti a zpracování informací pozorovaných u pacientů se schizofrenií by mohl být zodpovědný deficit v tomto senzorkém gatingu, který je tak spojováno s psychiatrickými symptomy,

neuropsychologickými deficity a narušením myšlení. Předpokládá se, že pacienti se schizofrenií nejsou schopni odfiltrovat irrelevantní stimuly a jsou tak přehlcneni smyslovými podněty přicházejícími z okolí což vede k sensorickému přetížení, kognitivní fragmentaci a poruchám myšlení (snížení kognitivních funkcí).

Předpokládá se, že mechanismus zpracování informací založen na této teorii by mohl být měřitelný pomocí dvou hlavních metod, jakými jsou stanovení vlny P50 a PPI (prepulzní inhibice úlekové reakce) (Braff., 1993; Light & Braff., 1999).

Při metodě stanovení vlny P50 se zaznamenávají prostřednictvím elektroencefalogramu (EEG) evokované potenciály, což jsou bioelektrické projevy zpracování a odpovědi mozku na zevní podnět.

Během tohoto měření jsou prezentovány dva sluchové podněty (kliknutí) podmíněný a testovací přibližně 500ms od sebe. U zdravých jedinců první podnět „přednastaví“ inhibiční funkci organismu a odpověď na druhý podnět je následně potlačena oproti reakci na první podnět. U pacientů se schizofrenií je tato následná odpověď na druhý stimul potlačena méně (Freedman et al., 1987; Light & Braff., 1999).

Deficit ve zpracování informací měřených pomocí evokovaných potenciálů vlny P50 je dokumentován nejen pacientů se schizofrenií (Clements et al., 1997; Judd et al., 1992), ale i u jejich příbuzných, což opět poukazuje na roli genetiky v patofyziologii schizofrenie (Clementz et al., 1998; Siegel et al., 1984).

Na úlohu PPI je pohlíženo jako na měření senzomotorického zpracování informací, oproti stanovení vlny P50, která je spojována spíše se zaznamenáním pouze sensorické zpracování informací. Při PPI se hodnotí, k jakým změnám došlo v úlekové reakci prostřednictvím motorické odpovědi. U člověka se nejčastěji používá akustický nebo hmatový podnět, či jejich kombinace a motorická odpověď je zaznamenána skrze elektromyograf (EMG), zaznamenávající kontrakci *m. orbicularis oculi* na pravém i levém oku. Jedinec je nejdříve vystaven slabému prestimulu, který ho „upozorní“ na následující silný stimul, což ve výsledku vede ke snížení jeho úlekové reakce během silného stimulu (Light & Braff., 1999). Opět se předpokládá se, že u zdravých jedinců je úleková reakce snížena v důsledku sensorického gatingu - vrátkového mechanismu, který by mohl sloužit jako ochrana mozku před jeho energetickým vyčerpáním zapříčiněného jeho neustálou aktivací během úlekové reakce. U pacientů se schizofrenií by mohl být tento vrátkový mechanismus

narušen, čemuž odpovídá i skutečnost, že míra úlekové reakce je na následující silný podnět méně ovlivněna prestimulem, a tak oproti zdravým jedincům zvýšená. (Höschl et al., 2004) Snížení PPI bylo dokumentováno nejen u pacientů se schizofrenií (Braff et al., 1978), ale i u jejich příbuzných a osob se schizoidní poruchou osobnosti, což opět poukazuje na podíl genetického pozadí na propuknutí schizofrenního onemocnění (Candehad et al., 2000).

Z výše uvedených důvodů je kognitivnímu deficitu věnována pozornost ve výzkumu, ať už pro potenciální význam časného a správného diagnostikování schizofrenního onemocnění, tak pro možné hodnocení a vývoj nových léčebných strategií, které by pacientům umožnily nezávisle vykonávat každodenní činnosti.

A proto se v současné době experimentální studie zaměřují na modelování schizofrenii podobného chování především prostřednictvím manipulace a ovlivněním glutamatergního systému, kdy jak už bylo zmíněno, nekompetitivní antagonisté NMDA receptorů vyvolají u lidí příznaky podobné schizofrenii a to jak pozitivní, negativní, tak i pro nás významné kognitivní, které doposud odolávají psychofarmakologické léčbě a negativně tak ovlivňují každodenní výkon pacienta (Keefe & Harvey, 2012).

3.3 Glutamatergní teorie schizofrenie

Jak již bylo řečeno, ve výzkumu schizofrenie si díky pozorování účinku látek působící jako nekompetitivní NMDA antagonisté získal pozornost především hlavní excitační neurotransmitter CNS glutamát. Myšlenka o roli glutamatergního systému v patofyziologii schizofrenie vznikla polovině dvacátého století, kdy bylo poprvé pozorováno, že látka fencyklidin používána jako disociativní anestetikum vyvolává u lidí stavy podobné psychóze (Neill et al., 2010). Na rozdíl od amfetaminu, který také vyvolává psychózu, po podání fencyklidiny dochází k ovlivnění glutamatergní neurotransmise a k vyvolání jak pozitivní, tak negativní a dokonce i kognitivních příznaků pozorované u schizofrenních pacientů. (Coyle et al., 2003). Roli glutamátu v patofyziologii schizofrenie podporuje i další studie, kdy subanestetické dávky anestetika ketaminu, který opět působí jako nekompetitivní antagonist NMDA receptorů, vyvolaly u zdravých dobrovolníků jak pozitivní i negativní příznaky pozorované u schizofrenie, tak i narušení kognitivních funkcí. Z hlediska kognitivního deficitu projevovali účastníci experimentu zhoršení v testech citlivých na čelní kortikální dysfunkce jako je míra bdělosti, slovní plynulost a Wisconsinský test třídění karet

(Krystal et al. 1994). Ve studii, kde byl podán ketamin i pacientům se schizofrenií došlo ke zhoršení jejich pozitivních a negativních symptomů a také k prohloubení jejich kognitivního deficitu měřeného testy na pozornost a paměť, kde bylo hodnoceno vybavení a rozpoznání (Malhotra et al., 1997). Glutamátergní teorii schizofrenie podporuje i další studie, kdy podání subanestetických dávek ketaminu zdravým dobrovolníkům vyvolalo na dávce závislé zhoršení příznaků pozorovaných u schizofrenie a to pozitivních, negativních a opět i kognitivních. Kdy došlo v závislosti na dávce k postupnému zhoršení výkonu dobrovolníků v deklarativní paměti (Newcomer et al., 1999).

Zdá se tedy, že narušení glutamátergní signalizace hraje v patofyziologii schizofrenie významnou roli, neboť na základě mnoha studií látky působící jako nekompetitivní antagonisté glutamátergních NMDA receptorů, vyvolávají u zdravých dobrovolníků jak pozitivní, tak negativní, ale i kognitivní příznaky pozorované u pacientů se schizofrenií. Dále podání těchto látek vyvolává u pacientů se schizofrenií zhoršení jejich příznaků opět ve všech rovinách. Proto se v současné době výzkum zaměřil na modelování schizofrenii podobného chování prostřednictvím ovlivnění glutamátergní neurotransmise pomocí nekompetitivní NMDA antagonistů jako ketamin, PCP a dizocilpinu (MK-801) (Bubeníková-Valešová et al., 2008). Také z hlediska modelování tohoto heterogenního onemocnění lze kognitivní schopnosti u zvířat testovat, oproti jiným příznakům schizofrenie.

3.3.1 Animální modely schizofrenii podobného chování

Je zřejmé, že příznaky tohoto komplexního a heterogenního onemocnění jako je typicky lidská psychóza - schizofrenie nelze u zvířat z důvodu jejich odlišné anatomie a funkce CNS, a tedy smyslového, emočního a kognitivního zpracování informací modelovat v plném rozsahu (Lipska & Weinberger., 2000). Podobnost mezi příznaky schizofrenie a projevem chování dokumentované u zvířat je často velmi vzdálená, a tak se často tento přístup setkává se skeptickým postojem okolí. Avšak cílem modelování je především najít určité možné koreláty a markery mezi projevem chování u zvířat a příznaky pozorovanými u pacientů trpících schizofrenií (Geyer & Moghaddam., 2002).

V modelování schizofrenie se využívá především genetického, vývojového a farmakologického modelu. Genetický model by mohl přispět k lepšímu pochopení příčiny a vzniku onemocnění a lépe objasnit vztah mezi genetickými a epigenetickými / (či) environmentálními faktory podílejícími se na etiopatogenezi schizofrenie (Lipska

& Weinberger., 2000). Z hlediska glutamátergní teorie se často při tomto modelování využívá transgenních zvířat, kdy genetická manipulace vede k narušení funkce NMDA receptorů. U takto geneticky modifikovaných zvířat byla nalezena snížená metabolická aktivita v PFC, která je také pozorována u pacientů se schizofrenií. A dále projevy chování jako zvýšená lokomoční aktivita, která je považována za pozitivní příznak schizofrenie, snížená PPI (Ducan et al., 2002) a snížena sociální interakce, jež jsou dokumentovány u pacientů se schizofrenií (Ducan et al., 2004). Tyto modely tak ukazují konstrukční a v některých případech i fenomenologickou validitu.

Další hypotetickou příčinou vzniku schizofrenie by mohlo být narušení mozku v časně fázi vývoje, které se projeví až v rané dospělosti, jak je tomu u tohoto onemocnění. Proto se v této souvislosti využívají neurovývojové animální modely, kdy se ukazuje, že podání NMDA antagonistů experimentálním zvířatům v časně fázi vývoje mozku, vede u nich v dospělosti k atypickým projevům chování, jež jsou považovány za podobné příznakům schizofrenie (viz tabulka 1.) (Bubeníková-Valešová at al., 2008; Lipska & Weinberger., 2000).

Nevýhodou tohoto modelu je však jeho časová náročnost. Velmi rozšířené jsou tak modely farmakologické, které jsou založeny na hypotézách o jednotlivých neurotransmiterech a jejich roli v patofyziologii schizofrenního onemocnění. Farmakologické modely tak umožňují testovat vliv nejrůznějších látek, o nichž například už víme, jaké projevy chování způsobují u člověka a lze je tak porovnat s projevy chování pozorovaných u zvířat. Následně tak můžeme tomuto chování zabránit podáním používaného, nebo potenciálního léčiva. Farmakologické modely mají často velmi dobrou predikční validitu a lze je tak efektivně využít pro testování potenciálních farmak.

Genetické a neurovývojové modely tak zkoumají především možné hypotézy etiologie a patofyziologie schizofrenního onemocnění, zatímco farmakologické modely jsou využívány především pro testování léčiv (Bubeníková-Valešová at al., 2008; Lipska & Weinberger., 2000; Marcotte et al., 2001).

3.3.1.1 Farmakologický animální model

Při vytváření animálního farmakologického modelu schizofrenie podobného chování se využívá především látek působících jako nekompetitivní antagonisté glutamatergických NMDA receptorů, jimiž jsou především již zmíněná disociativní anestetika ketamin a PCP, používaná i u lidí, kdy vyvolávají stavy podobné schizofrenii. Dále se také hojně používá MK-801, která je však používána pouze u experimentálních zvířat a působí také jako nekompetitivní NMDA antagonist.

Studie ukazují, že aplikace těchto látek vyvolává u zvířat změny chování projevující se zhoršením výkonu zvířat v pracovní paměti, narušením PPI, sníženou sociální interakcí, hyperlokomocí a zvýšeným stereotypním chováním. A tyto projevy chování se považují do určité míry, za podobné příznakům vyskytujícím se u pacientů se schizofrenií. Přehled viz tabulka 1. (Bubeníková-Valešová et al., 2008)

Tabulka 1: *Porovnání klinických příznaků pozorovaných u pacientů se schizofrenií s projevy chování u zvířat, které se do určité míry považují za příznaky schizofrenie podobného chování v animálním modelu vyvolaného NMDA antagonisty (Převzato a upraveno podle Bubeníková-Valešová et al., 2008).*

Klinické příznaky schizofrenie	Změny v chování v animálním modelu schizofrenie
Psychotické symptomy	Zvýšená lokomoční aktivita
Stereotypní chování	Utkvělost v chování jako jsou čištění, čmouchání atd.
Zvýšená náchylnost ke stresu	Změny v lokomoční aktivitě nebo v chování vyvolané stresem
Deficit ve zpracování informací	Deficit v prepulzní inhibici úlekové reakce (PPI)
Deficit v pozornosti	Deficit v latentní inhibici
Kognitivní deficit	Zhoršení výkonu v úlohách posuzujících prostorovou paměť
Emoční oploštělost	Snížený sociální kontakt s neznámým jedincem

3.4 Kognitivní schopnosti v animálním modelu schizofrenie

Na základě glutamatergní teorie schizofrenie byla provedena řada behaviorálních experimentů zabývajících se vlivem nekompetitivních antagonistů na chování zvířat.

Výsledky z těchto studií obecně podporují použití těchto látek v modelování negativních příznaků i kognitivního deficitu projevující se při schizofrenii, což tak podporuje celkovou validitu animálního modelu schizofrenie podobného chování založeného na aplikaci nekompetitivních NMDA antagonistů (Neill et al., 2010).

O některých behaviorálních úlohách následně podrobněji pojednám.

3.4.1 Senzorické a senzomotorické zpracování

Jak už bylo zmíněno výše jedním z uvažovaných markerů schizofrenního projevu u lidí je narušení zpracování informací měřeného pomocí testu PPI a testu akusticky evokovaných potenciálů vlny P50. Výhodou těchto testů je, že se dají použít i zvířat.

U zvířat se PPI měří ve speciální komoře, kam je zvíře umístěno a snímá se pohyb celého těla jako odpověď na stimuly podobné těm, které jsou používány u lidí. (Light & Braff., 1999). V souladu s glutamatergní teorií studie ukazují, že podání NMDA antagonistů zvířatům signifikantně narušilo schopnost PPI (Geyer et al., 2001).

Za úlohu, která je považována za analogickou úlohu k akusticky evokovaným potenciálům vlny P50, je u zvířat používána úloha N40 potlačení (Light & Braff., 1999). Systematické podání PCP narušilo u zvířat senzoričné zpracování měřené pomocí této úlohy (Adler et al., 1986). Ovšem když byl zvířatům podán ketamin v dávce 10 mg/kg došlo k narušení senzomotorického zpracování informací měřeného PPI, ale ne senzoričného zpracování v úloze N40. Toto zřejmě poukazuje na odlišné zpracování informací CNS během těchto úloh (de Bruin et al., 1999).

3.4.2 Vizualní paměť

Vizualní paměť je u zvířat testována prostřednictvím úlohy rozpoznávání objektů („novel objective recognition test“- NORT). Při této úloze se měří, jakou dobu zvíře věnuje prozkoumávání nového objektu v porovnání se známým objektem. Ukázalo se, že po chronické aplikaci nekompetitivního antagonisty PCP došlo k signifikantnímu snížení doby

kontaktem zvířete s novým předmětem. Dále se ukázalo, že tento deficit byl signifikantně zrušen podáním atypického antipsychotika klozapinu (Hashimoto et al., 1999).

3.4.3 Prostorová orientace

Prostorová paměť u zvířat je plně využívána pro studium neurobiologických mechanismů souvisejících s učením, pamětí, vykonáním rozhodnutí. Někteří autoři dokonce považují prostorovou paměť zvířat jako model deklarativní paměti a vyšších kognitivních funkcí u lidí jako jsou již výše zmíněné exekutivní funkce umožňující řešit problémy, plánovat, rozhodovat se a realizovat cílevědomé postupy a výkony (O'Keefe & Nadel, 1978).

Výzkum dokládá, že klíčovou roli v paměti hraje mozková struktura hipokampus a to především v paměti deklarativní (Scoville & Milner, 1957).

Hojně využívanou metodou pro studium prostorové kognice a role hipokampu je Morrisovo vodní bludiště („Morris water maze“ - MWM). V této úloze je zvíře, nejčastěji potkan, vložen do kruhového nádrže naplněné vodou, která je zakalena netoxickým barvivem. Úkolem zvířete je zde najít ostrůvek skrytý pod hladinou. Zvířata se tak musí orientovat především pomocí vzdálených orientačních bodů v místnosti a používat tak alotetickou strategii navigace. Zvířata jsou schopna spolehlivě se tuto úlohu naučit (Morris, 1981). Předpokládá se, že zvířata jsou schopna řešit tuto úlohu na základě vytvoření takzvané kognitivní mapy, která je chápána jako vnitřní reprezentace prostředí (Tolman, 1984). Úloha MWM je citlivá na činnost hipokampu, neboť bilaterálním léze hipokampu výrazně naruší schopnost zvířat řešit tuto úlohu (Morris, 1982).

V úloze MWM jsou měřeny parametry: doba, za kterou zvíře nalezne ostrůvek, průměrná uplavaná vzdálenost a průměrná rychlost plavání. Dalším z možných měřitelných parametrů je doba, kterou zvíře stráví v tréninkovém kvadrantu, po odstranění ostrůvku. Studie ukazují, že zvířata po podání NMDA antagonisty MK-801 stráví více času hledáním ostrůvku, oproti kontrolám a také méně času v tréninkovém kvadrantu. Tento deficit koreloval s množstvím aplikované látky. (Ahlander et al., 1999; van der Staay et al., 2011).

3.4.4 Kognitivní koordinace

Velmi zajímavou úlohou pro testování kognitivních schopností zvířat je úloha aktivního vyhýbání se místu (AAPA) v behaviorální aparatuře bludiště karusel (podrobněji viz metody).

Bludiště je tvořeno kruhovou arénou, kde je úkolem zvířete vyhýbat se „zakázanému sektoru“. Tento sektor může být definován dvojím způsobem, buď vzhledem ke stabilním orientačním bodům v místnosti („room frame“), nebo přímo v rámci kruhové arény („arena frame“). Pokud je averzivní sektor definován v souřadnicovém systému místnosti potkan se musí naučit orientovat podle vzdálených orientačních bodů a zaujmou tak alotetickou strategii vyhýbání. Je-li však sektor určen v rámci arény, využívá potkan s nejvyšší pravděpodobností proximální vodítka, jako jsou značky na aréně, či pachové stopy vytvořené potkanem a také idiotetická navigace (Petrásek et al., 2009).

Výhodou tohoto bludiště je, že může být využito v několika variantách. Pokud je aréna stabilní nedochází zde ke vzájemnému konfliktu informací z dvou odlišných rámců („room frame X „arena frame“) a zvíře se tak může sektoru definovanému v rámci místnosti vyhýbat i pomocí značek na aréně. Problém při takto zvolené strategii nastává, když se aréna začne otáčet, neboť doposud relevantní informace se stávají neefektivními a zvíře se už podle nich nemůže nadále orientovat. Musí se tak naučit rozlišovat od sebe tyto dva referenční rámce a je-li sektor definován v rámci místnosti, musí ignorovat značky na aréně.

Dalšími možnými variantami využití bludiště je například možnost pokrýt povrch arény vodou, čímž jsou potlačena arénová vodítka, nebo naopak zhasnutí světla v místnosti, takže zvíře nemůže použít k orientaci podněty vyskytující se v místnosti (Petrásek, 2009).

Ukázalo se, že při odlišování těchto dvou prostorových rámců podstatnou roli opět zastupuje hipokampus (Wesierska et al., 2005).

V této studii bylo bludiště využito ve čtyřech variantách:

- stabilní suchá aréna: (Room&Arena)+
- rotující aréna ve tmě: Arena+
- rotující aréna pokrytá vodou: Room+
- rotující suchá aréna: Room+ Arena- (AAPA)

Ve variantě (Room&Arena)+ se zvíře může orientovat podle podnětů z obou referenčních rámců. Ve variantě Arena+ je znemožněna možnost alotetické orientace podle vzdálenějších orientačních bodů v místnosti. Při variantě Room+ je narušena orientace podle

proximálních vodítek - pachových značek potkana (moč, exkrementy). Varianta Room+ Arena- je specifická v tom, že zde dochází ke konfliktu informací z obou referenčních rámců. Sektor je definován v rámci místnosti a zvíře se tak musí orientovat pouze na základě podnětů vyskytujících se v místnosti a ignorovat podněty nalézající se na aréně. Tato varianta úlohy je také nazývána jako úloha AAPA.

U zvířat byla provedena unilaterální inaktivace hipokampu a pak se testovala jejich výkonnost v těchto odlišných variantách úlohy. Ve všech případech byla zvířata schopna úlohu úspěšně řešit kromě varianty Room+ Arena- (AAPA) - suché rotující aréně, kde dochází ke vzájemnému konfliktu dvou referenčních rámců. Což poukazuje roli hipokampu v segregaci a současné koordinaci informací, a tak možnost rozlišovat mezi relevantními („room frame“) a irrelevantními („arena frame“) podněty okolního světa (Wesierska et al., 2005).

Tato hypotéza je obdobná již zmíněné skutečnosti pozorované u pacientů se schizofrenií, kdy se předpokládá, že nejsou schopni rozlišovat mezi podstatnými a nepodstatnými podněty a asociací mezi nimi, za což by mohl být zodpovědný proces kognitivní koordinace (Phillips & Silverstein, 2003).

Studie ukazují, že podání NMDA antagonistů, narušuje schopnost zvířat řešit úlohu AAPA

K zajímavým výsledkům došel experiment, kde byla opět provedena unilaterální léze hipokampu, ale tentokrát byla porovnávána výkonnost zvířat v bludišti karusel a MWM. Ukázalo se, že zde došlo téměř k protichůdným výsledkům.

V MWM nebyla zvířata schopna si vybavit polohu ostrůvku naučenou před inaktivací, avšak byla schopna se naučit novou polohu ostrůvku. Oproti tomu v bludišti karusel nebyla zvířata schopna se naučit vyhýbat novému sektoru definovanému v rámci místnosti, ale dokázala se vyhýbat poloze sektoru naučené před inaktivací. Nutno však podotknout, že zde byl povrch arény pokryt vodou.

Za tyto skutečnosti by mohly být zodpovědné odlišné nároky na učení v obou úlohách. V úloze AAPA - suchá rotující aréna se vyžaduje segregace stimulů místnosti od stimulů vyskytujících se na stabilní aréně a selektivní asociace averzivního stimulu s vhodnou podskupinou stimulů. V úloze MWM není tato segregace vyžadována, avšak jsou zde kladeny mnohem větší nároky na asociativní reprezentaci prostředí a přesnou navigaci na malý ostrůvek (~1/400) oproti bludišti karusel, kde je možné se vyhýbat 1/6 arény.

Výsledky nasvědčují tomu, že segregace a reprezentace jsou odlišné funkce distribuované neuronové sítě hipokampu. Zdá se, že na hipokampu je závislé vytváření podskupiny relevantně asociovaných stimulů, kdy dochází k dynamické aktivaci a inhibici reprezentací vnějšího světa a opět tak odkazuje na teorii procesu kognitivní koordinace (Kubík & Fenton, 2005).

Výsledky studií naznačují, že podání nekompetitivního antagonisty MK-801 narušuje schopnost zvířat úspěšně řešit úlohu AAPA v porovnání s kontrolami (viz tabulka 2). O těchto studiích se v následujícím textu podrobněji zmíním.

3.5 MK-801 (dizocilpin)

V souhrnné práci zaměřené na využití nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů látky MK-801, se ukázala, že tato látka v dávce do 0,1 mg/kg je schopna narušit kognitivní funkce, aniž by však vyvolala závažnější příznaky spojené s intoxikací. Proto by při použití této látky mohla být splněna kritéria pro validitu animálního modelu schizofrenie i v oblasti kognitivní dysfunkce (van der Staay et al., 2011).

Proto dnes mnoho studií využívá při modelování schizofrenii podobného chování právě této látky, neboť se současně považuje za schopnou vyvolat příznaky podobné schizofrenii nejen pozitivní, negativní, ale i kognitivní (Andiné et al., 1999; van der Staay et al., 2011). To dokládá i studie kdy aplikace této látky v dávce 0,1 mg/kg vyvolala u zvířat nejen hyperlokomoci uvažující se jako projev pozitivních příznaků, ale i narušení PPI. Hyperlokomoce byla následně snížena podáním typického antipsychotika haloperidolu což opět poukazuje na predikční validitu tohoto modelu (Bubeníkova-Valešová et al., 2010).

Dále aplikace této látky opět v dávce 0,1 mg/kg vyvolala sníženou dobu sociálního kontaktu mezi zvířaty (Sumiyoshi, 2008). Ale jak již bylo zmíněno, v současnosti se výzkum v této oblasti zaměřuje na studium kognitivních funkcí, neboť se nyní považují za stěžejní projev schizofrenního onemocnění (Bowie & Havey., 2006; Keefe & Harvey., 2012; Kuperberg & Heckers., 2000; O'Carroll, 2000)

3.5.1 Vliv MK-801 na kognitivní schopnosti

Jak již bylo částečně zmíněno, kognitivní schopnosti jsou u zvířat testovány nejrůznějšími úlohami od modifikací skinnerova boxu až po různé typy bludišť (Neill et al., 2010; van der Staay et al., 2011).

Hojně se tak využívá například již zmíněného MWM, kdy někteří autoři považují dokonce prostorovou paměť u zvířat za specifický typ deklarativní paměti (O'Keefe & Nadel, 1978). Úloha MWM je vhodný přístup pro studium alotetické prostorové paměti. Avšak vzhledem k současným poznatkům a teorii kognitivní koordinace v souvislosti se schizofrenním onemocněním (Phillips & Silverstein, 2003) je také plně využíváno bludiště karusel a úloha AAPA. Při které musí být vnímané okolní informace řazeny do souvislých reprezentací, což by tak mohl představovat užitečný nástroj pro studium vyšších kognitivní schopností (Kubík & Fenton, 2005; Wesierska et al., 2005).

3.5.1.1 Vliv MK-801 v MWM a bludišti karusel („Carousel maze“)

Ve studii kde byl posuzován vliv látky MK-801 na kognitivní schopnosti zvířat v dávce 0,1 mg/kg a 0,2 mg/kg v úloze AAPA a MWM se projevil odlišný efekt výše těchto dávek na výkon zvířat v těchto úlohách. V kolotočovém bludišti v úloze AAPA došlo po aplikaci vyšší dávky k signifikantnímu zhoršení učení a současně s tím i k signifikantně zvýšené lokomoci zvířat. Oproti tomu v MWM byla výkonnost zvířat signifikantně zhoršena oběma dávkami a zvířata strávila delší dobu nalezením ostrůvku. Při aplikaci dávky nižší se potkani naučili ostrůvek hledat, ale trvalo jim to delší dobu. Pomalejší učení může být zapříčiněno narušením senzomotorických a/ nebo procedurálních schopností zvířat. Při aplikaci vyšší dávky nebyli potkani už schopni ostrůvek najít, a pokud byli po skončení časového limitu k nalezení ostrůvku navedeni, nebyli schopni se na něm udržet. Potkani také po aplikaci této vyšší dávky vykazovali neustálou tigmataxi. Proto je možné, že tento deficit je spíše způsoben narušením v procedurálních schopnostech než deficitem v prostorové navigaci. Tyto výsledky tak poukazují na nutnost přesného odhadnutí dávky při modelování psychózy. Dále také poukazují na již zmíněné odlišné požadavky na kognitivní schopnosti související s funkcí NMDA receptorů a úspěšným řešením těchto dvou úloh (Stuchlík et al., 2004).

Jak již bylo zmíněno podání NMDA antagonistů zvířatům testovaných v MWM naruší výkonost zvířat v této úloze (Ahlander et al., 1999; van der Staay et al., 2011).

Avšak podání těchto látek nenaruší výkonnost zvířat, která si už osvojila behaviorální aspekty úlohy MWM prostřednictvím předchozí zkušenosti s úlohou (Bannerman et al., 1995).

Další studie Stuchlík & Valeš, 2005 se tedy zaměřila na posouzení vlivu látky MK-801 v dávkách 0,15 a 0,2 mg/kg na vybavení a „znovuobnovení“ („re-acquisition“) schopnosti řešit úlohu AAPA. Při „znovuobnovení“, neboli opětovném učení potkani již už měli předchozí zkušenost s řešením úlohy AAPA, jen se však učili v jiném prostředí a tak v jiném kontextu podnětů. V této studii se však ukázalo se, že vyšší dávka významně narušila kognitivní schopnosti zvířat a zvýšila lokomoci jak při vybavení, tak při opětovném učení. Oproti tomu nižší dávky nenarušila kognici ani lokomoci zvířat při vybavení, avšak během opětovného učení významně snížila maximální čas vyhýbaní, což je nejdéle naměřený čas mezi dvěma vstupy zvířete do zakázané oblasti. Lokomoci a počet vstupů do zakázané oblasti ovlivnila tato dávka při opětovném učení neprokazatelně. Zdá se tedy, že proces separace okolních stimulů do koherentních reprezentací v úloze AAPA, je závislý na neporušené funkci NMDA receptorů. A také, že tato správná funkce NMDA receptorů je více citlivá při opětovném učení. V této studii podání NMDA antagonistů narušilo výkonost zvířat v úloze AAPA a nepodařilo se předejít tomuto narušení ani prostřednictvím předchozí zkušenosti zvířat se základním principem úlohy (Stuchlík & Valeš, 2005). Tento výsledek je odlišný oproti výsledku ve studii, kde byla použita úloha MWM (Bannerman et al., 1995).

V dalším experimentu byl porovnáván vliv látky MK-801 v dávkách 0,1; 0,2; 0,3 mg/kg u dvou kmenů potkanů (Wistar a Long-Evants) v úloze AAPA a MWM. V Morrisově vodním bludišti byla použita verze pro testování pracovní paměti, kdy se mění poloha ostrůvku každý den. Ukázalo se, že v úloze AAPA byla lokomoce zvířat, počet vstupů do zakázané oblasti a maximální čas vyhýbaní významně negativně ovlivněn u obou kmenů potkanů po podání dávek 0,2 a 0,3 mg/kg v porovnání s kontrolami. Dávka 0,1 mg/kg nevyvolala hyperlokomoci, ale prokazatelně snížila maximální čas vyhýbaní u potkanů kmene Wistar oproti kontrolám a mezi oběma kmeny byl v tomto parametru významný rozdíl. U potkanů kmene Wistar vyvolala tato dávka i významný zvýšení počtu vstupů do zakázané oblasti oproti potkanům kmene Long-Evans. V MWM dávka 0,1 mg/kg nezhoršila paměť zvířat v porovnání s kontrolami, avšak opět se zde ukázal významný rozdíl mezi kmeny Wistar a Long-Evans. Ukazuje se tak, že je zde prokazatelný rozdíl ve výkonnosti zvířat odlišných kmenů po podání látky MK-801.

Dávka 0,2 a 0,3 mg/kg vyvolaly kognitivní deficit v úloze AAPA, nicméně tento deficit koreloval i s hyperlokomocí (Valeš et al., 2006).

V předchozí zmíněné studii narušila látka MK-801 referenční paměť v MWM (Stuchlík et al., 2004), zatímco zde podání této látky pracovní paměť nenarušilo. Což nesouhlasí s nálezy pozorovanými u pacientů se schizofrenií, kde je výrazně narušena i paměť pracovní. Tato studie tak poukazuje nad nutností se zamyslet a vhodně zvolit množství aplikované látky, kmen zvířete i behaviorální aparaturu podle cíle zkoumání (Valeš et al., 2006).

Ve studii kdy byla použita dávka 0,15 a 0,2 mg/kg látky MK-801 se opět ukázalo signifikantní narušení schopnosti zvířat řešit úlohu AAPA v dávce 0,2 mg/kg. Tato dávka u zvířat významně zvýšila lokomoci, počet vstupů do zakázaného sektoru a snížila maximální čas vyhýbání. Oproti tomu dávka 0,15 mg/kg prokazatelně snížila pouze maximální čas vyhýbání (Stuchlík et al., 2009).

Studie kde byla látka MK-801 použita pro modelování schizofrenii podobného chování v úloze AAPA v dávce 0,1 mg/kg, způsobila tato dávka zvýšený počet vstupů zvířat do zakázané oblasti a snížení maximálního času vyhýbání se této oblasti. Průkazné narušení lokomoce se zde neprojevilo (Valeš et al., 2010; 2012).

V podobné studii, se opět ukázalo, že MK-801 dávce 0,1 mg/kg vyvolá u zvířat narušení schopnosti řešit úlohu AAPA projevující se zvýšeným vstupováním do zakázané oblasti a snížením maximálního času vyhýbání. A opět bez prokazatelně zvýšené lokomoce. Atypická antipsychotika ritanserin a risperidone byla schopna tento vyvolaný kognitivní deficit zvrátit. Klasické antipsychotikum haloperidol ve vyšší dávce ovlivnilo pouze lokomoci zvířat, což je v souladu s tvrzením, že hyperlokomoce u zvířat by se mohla považovat za pozitivní projev příznaků v animálním modelu schizofrenii podobného chování. Tento výsledek podporuje predikční validitu tohoto modelu a možnost potenciálního využití látky MK-801 a úlohy AAPA pro studium nových potenciálních antipsychotik cílené na léčbu kognitivních funkcí (Bubeniková-Valešová et al., 2008).

V další studii byla tentokrát hodnocena behaviorální flexibilita, jejíž narušení se dává do souvislosti s projevem kognitivním deficitu pozorovaného u pacientů se schizofrenií. Uvažuje se, že deficit v behaviorální flexibilitě se projevuje neschopností či sníženou schopností přizpůsobit se měnícím podmínkám prostředí. V této studii byla zvířata nejprve trénována po tři dny na jednu polohu sektoru v úloze AAPA a taktéž jednu polohu v úloze MWM. Po těchto třech dnech učení, následovaly dva dny, kdy se poloha sektoru i ostrůvku

změnila. První den kdy se poloha sektoru i ostrůvku změnila, byla aplikována 30 min před testem potkanům látka MK-801 v různých dávkách 0,05; 0,08; 0,10; 0,12; 0,15 mg/kg. Od dávky 0,08 mg/kg byla signifikantně zvýšena lokomoce zvířat (Lobellova et al., 2013), což si odporuje s předchozími nálezy (Stuchlík & Valeš, 2005). Možným vysvětlením by mohlo být obdržení většího množství averzivních podnětů během změny polohy sektoru. Počet vstupů do sektoru zvířat a maximální čas vyhýbání byly negativně ovlivněny dávkami 0,12 a 0,15 mg/kg. Avšak počet vstupů byl signifikantně zvýšen i v dávce 0,08 mg/kg, ale nikoliv v dávce 0,1 mg/kg. Stejným způsobem byl ovlivněn i relativní čas strávený v cílovém (zakázaném) sektoru, kde nejvíce času strávila zvířata po aplikaci dávek 0,8; 0,12 a 0,15 mg/kg. V MWM byla výkon zvířat spolehlivě narušen od dávky 0,1 mg/kg. Tyto nálezy tak podporují použití látky MK-801 k vyvolání kognitivního deficitu souvisejícího se schizofrenií v animálním modelu schizofrenii podobného chování (Lobellova et al., 2013).

Další studie se zaměřila na studium pracovní paměti a na vliv předchozí zkušenosti zvířete s úlohou AAPA. Zvířata prošla jednodenní habituací na arénu v kolotočovém bludišti, která trvala jeden den po dobu 20 minut (10 min stabilní aréna a 10 min rotující aréna), kdy nedostávala averzivní podněty. Poté následovaly čtyři dny učení pozice averzivního sektoru, kdy každý den byla poloha sektoru změněna.

Design tréninku byl:

- habituace: 5 min, rotující aréna bez averzivních stimulů
- učení: 15 min, rotující aréna s averzivními stimuly
- pauza: 5 min, zvíře bylo umístěno do klece
- vybavení: 5 min, rotující aréna bez averzivních stimulů

Zvířata byla rozdělena dvou skupin. Jedna skupina prošla tzv. „pretréninkem“, druhá skupina zvířat tento „pretrénink“ neměla.

Skupině, která měla „pretrénink“, byl aplikován první čtyři dny chronicky fyziologický roztok. Další skupinám byla během těchto čtyř dnů aplikována látka MK-801 v dávce 0,12 a 0,15 mg/kg. Zvířata, která prošla „pretréninkem“, pokračovala po těchto čtyřech dnech v tréninku ještě další čtyři dny. Avšak během těchto čtyř následujících dnů jim byla už aplikována každý den látka MK-801 v dávce 0,12 a 0,15 mg/kg a polohy sektoru byly jiné než během „pretréninku“.

Výsledky ukázaly, že látka MK-801 v obou dávkách významně narušila výkonnost zvířat, která neprošla „pretréninkem“ a nebyla tak obeznámena s principem úlohy.

U „předtrénovaných“ zvířat tyto dávky pouze signifikantně zvýšily lokomoci, což naznačuje vztah účinku látky

MK-801 a předchozí zkušenosti zvířat s principem úlohy (Zemanova et al., 2013). Tato studie se odlišuje výsledkem od studie Stuchlík & Valeš, 2005, kde byl také zkoumán vliv látky MK-801 na předchozí zkušenost zvířete s principem úlohy, ale v obou těchto studiích byl odlišný design experimentu.

Tyto zmíněné studie naznačují tak potenciální možnost modelování schizofrenii podobného chování u zvířat pomocí nekompetitivního antagonisty látky MK-801, neboť podáním této látky dochází nejen k zvýšené lokomoci zvířat, která je považována za korelát pozitivních příznaků, ale také ke stereotypnímu projevu chování a narušení kognitivních funkcí (Andiné et al., 1999; Bubeníková-Valešová 2008; Lipska & Weinberger, 2000; Neill et al., 2010; van der Staay et al., 2011). V mnoha případech tyto vyvolané deficity mohou být zrušeny antipsychotiky na dávce závislým způsobem. Účinnost těchto antipsychotik v animálním modelu koreluje s jejich možnou účinností u lidí (Andiné et al., 1999). Zdá se, že použití látky MK-801 k modelování schizofrenii podobného chování, tak splňuje fenomenologickou i predikční validitu animálního modelu schizofrenii podobného chování (Bubeníková-Valešová 2008; Lipska & Weinberger, 2000).

Jak již bylo zmíněno, uvažuje se, že klíčovou roli v kognitivním deficitu schizofrenie by mohla hrát narušená schopnost kognitivní koordinace (Phillips & Silverstein, 2003).

Proto by využití bludiště karusel a úlohy AAPA mohlo být vhodným nástrojem pro studium tohoto procesu (Kubík & Fenton, 2005; Wesierska et al., 2005).

Následující tabulka 2 shrnuje uvedené studie s látkou MK-801.

Tabulka 2: Souhrn studií s látkou MK-801

Úloha aktivního vyhýbání se místu - AAPA (active allothetic place avoidance)									
Studie	Kmen potkana	Habituaace	Trénink	Dávka mg/kg	Aplikace	Proces	# vstupů	Lokomoce	Max. čas vyhýbání
Stuchlík et al., 2004	Long-Evans		6 dní (5. a 6. den fyz. roztok)	0,1	chron.	učení	0	0	n/a
				0,2			↑	↑	n/a
Stuchlík & Valeš, 2005	Long-Evans		4 dny (5. den aplikace) 5 dní	0,15	akutní	vybavení	0	0	0
				0,15	chron.	reakvizace	0	0	↓
				0,2	akutní	vybavení	↑	↑	↓
				0,2	chron.	reakvizace	↑	↑	↓
Valeš et al., 2006	Wistar		4 dny	0,1	chron.	učení	0	0	↓
				0,2			↑	↑	↓
				0,3			↑	↑	↓
				0,1			0	0	0
				0,2			↑	↑	↓
				0,3			↑	↑	↓
Bubeníková-Valešová et al., 2008	Hannover Wistar		4 dny	0,1	chron.	učení	↑	0	↓
Stuchlík et al., 2009	Long-Evans		4 dny	0,15	chron.	učení	0	0	↓
				0,2			↑	↑	↓
Valeš et al., 2010	Long-Evans		4 dny	0,1	chron.	učení	↑	0	↓
				0,1			chron.	učení	↑
Lobellová et al., 2013	Long-Evans		5 dní (4. a 5. den změna polohy sektoru)	0,05	akutní 4. den	přeučení	0	0	0
				0,08			↑	↑	0
				0,1			0	↑	0
				0,12			↑	↑	↓
				0,15			↑	↑	↓
				0,12			↑	↑	↓
Zemanová et al., 2013	Long-Evans	1 den (10 min - stab. a 10 min rot.)	4 dny	0,12	chron.	učení	↑	↑	↓
				0,15			↑	↑	↓
				0,12			0	↑	0
				0,15			0	↑	0

4 Cíle práce

Cíle této práce byly:

- Studium behaviorálních strategií laboratorních potkanů v úloze AAPA
- Studium účinku MK-801 (dizocilpinu) na behaviorální strategie a kognitivní výkonnost potkanů v úloze AAPA

5 Materiál a metody

5.1 Experimentální zvířata

V experimentech bylo použito celkem 64 dospělých samců laboratorního potkana kmene Long-Evans z chovu Fyziologického ústavu Akademie věd. V době experimentů byli staří 3-4 měsíce a jejich hmotnost se pohybovala od 300-500 g. Potkani byli na začátku experimentu umístěni po 3-4 jedincích v plastových průhledných boxech (o velikosti 50 x 25 x 25 cm) ve zvěřinci oddělení neurofyziologie paměti. Potkani měli volný přístup k vodě i potravě a 12 hodinový světelný cyklus, kdy světelná fáze probíhala od 7,00 do 19,00 hodin. Experimenty probíhaly zpravidla v odpoledních hodinách ve světelné fázi dne.

Všechny uvedené experimenty probíhaly v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a s vyhláškou o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat č. 207/2004 Sb.

5.2 Farmaka použitá během experimentu

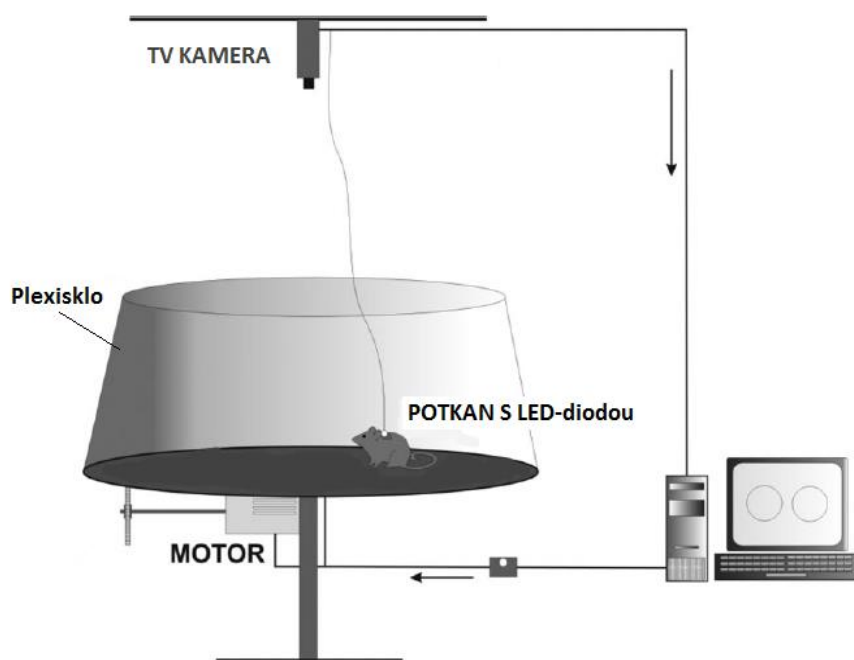
V experimentech byla použita látka MK-801 (dizocilpin - [5R,10S]-[+]-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imin) od firmy Sigma-Aldrich v dávkách: 0,15; 0,20; 0,30 mg/kg váhy zvířete. Látka MK-801 byla vždy rozpuštěna ve fyziologickém roztoku (B Braun) a zvířatům aplikována intraperitoneálně v objemu 1 ml/kg váhy zvířete.

5.3 Bludiště karusel („Carousel maze“)

V experimentech byla použita behaviorální aparatura bludiště karusel („Carousel maze“), které je tvořeno kruhovou arénou s kovovým dnem (o průměru 82 cm) a s průhledným plexisklem po okrajích (viz obr. 3). Aréna je poháněna elektromotorem umístěným pod arénou. Rychlost i směr otáčení arény je možné regulovat pomocí výkonu elektromotoru. V našem experimentu byla rychlost otáčení jedna otáčka za minutu ve směru hodinových ručiček.

Nad arénou se nachází kamera snímající signál ze dvou infračervených LED-diod. Jedna dioda (referenční) je umístěna na okraji arény, druhá („trackovací“) je prostřednictvím postroje umístěna na hřbetě zvířete (viz obr. 4). Díky tomu je zaznamenána poloha a rychlost pohybu arény i zvířete. Na aréně je definován zakázaný sektor v podobě kruhové výseče

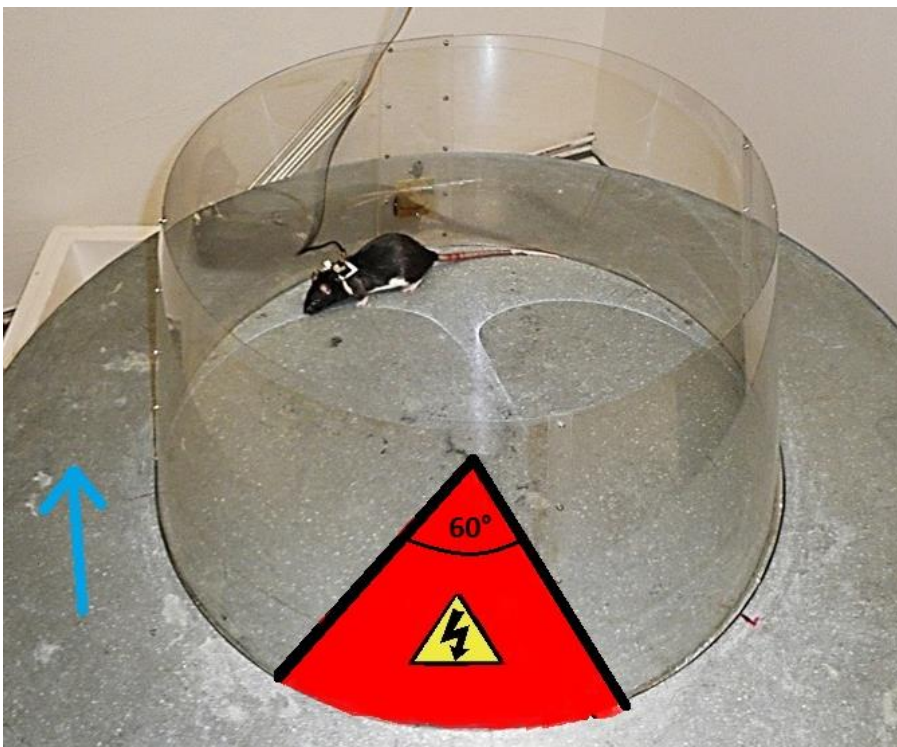
(60°)(viz obr. 5), kde zvíře po vstupu obdrží slabé elektrické impulzy. Tento sektor může být určen dvěma různými způsoby – prostorovými (referenčními) rámci. Jeden rámec je definován vnitro-arénovými (proximálními) podněty - například pachové stopy potkana („arena frame“), zatímco druhý je definován mimo-arénovými (distálními) podněty – objekty a uspořádání místnosti („room frame“). Sektor není viditelně označen, ale je definován pomocí počítače, který řídí experiment a vyhodnocuje (registruje) pozici potkana i pohyb arény.



Obr. 3: Bludiště karusel („Carousel maze“), na kterém potkani řešili úlohu AAPA během experimentů. Na vnějším obvodu arény je umístěna referenční dioda pro snímání pohybu arény kamerou. Potkani se v této úloze museli naučit orientovat podle vzdálenějších značek v místnosti: Room+ Arena-.



Obr. 4: Speciální postroj pro potkany, který obsahuje infračervenou LED-diodu pro snímání pohybu a polohy potkana kamerou. Jeho součástí je i kabel, který přivádí elektrický proud a je spojen pomocí svorky s injekční jehlou ve volné kůži za krkem potkana, čímž je zajištěno vodivé spojení s arénou, jež umožňuje dávat elektrické ranky.



Obr. 5: Zakázaný sektor v podobě kruhové výseče (60°), kterému se potkan v úloze AAPA musí naučit vyhýbat, je definován v souřadnicovém systému místnosti. Aréna se otáčí po směru hodinových ručiček rychlostí 1 otáčka/minutu.

5.4 Úloha AAPA

Během prezentovaných experimentů byla použita úloha AAPA, kde je úkolem zvířete naučit se vyhýbat zakázanému sektoru v podobě kruhové výseče (60°) na aréně (viz obr. 5). Sektor je v této úloze definován v souřadnicovém systému v rámci místnosti. Při rotaci arény za světla je tak zvíře nuceno k aktivnímu vyhýbání se zakázané oblasti za použití především alotetické orientace podle objektů vyskytujících se v místnosti. Potkan od sebe musí odlišit dva prostorové referenční rámce: vnitro-arénový („arena frame“) a distální („room frame“). Potkani se tak musí naučit rozlišovat mezi relevantními a irrelevantními stimuly, ignorovat podněty vyskytující se na aréně a řídit se podle vzdálenějších orientačních bodů v místnosti.

Pokud zvíře vstoupí do zakázaného sektoru a setrvá tam déle než 300 ms, obdrží averzivní stimul v podobě elektrické ranky. Elektrický impulz trvá 500 ms. Jeho hodnotu lze individuálně upravovat od 0,2 do 0,8 mA v závislosti na chování zvířete, tak aby zvíře bylo nuceno k aktivnímu chování, ale nedošlo u něj k tzv. („freezingu“) a k „rezignací“ na řešení dané situace vyhýbáním se zakázanému sektoru. Jestliže zvíře sektor neopustí a nadále v něm přetrvává, obdrží každých 900 ms další elektrický impulz. Vodivé spojení s arénou je zajištěno kabelem vedoucím elektrický proud, který je upevněn k postroji na zvířeti a vodivě spojen s injekční jehlou umístěnou ve volné kůži na hřbetě zvířete (viz předchozí obr. 4). Aplikace jehly není pro zvíře bolestivá. Jehla je po aplikaci pomocí peánu upravena tak, aby se zabránilo její ztrátě a poranění zvířete.

5.5 Manipulace se zvířaty

5.5.1 Aklimatizace a „handling“

Na začátku každého experimentu byla zvířata nejprve umístěna minimálně na 14 dní do chovů oddělení neurofyzologie paměti, aby došlo k jejich aklimatizaci. Posléze proběhl tzv. „handling“, což je cvičná manipulace experimentátora se zvířetem, během níž si zvíře navyká na experimentátora a na manipulaci v průběhu experimentu. Zvířata byla takto „handlována“ po dobu dvou dní a každé zvíře nejméně 10 minut. Den před experimentem byla zvířatům podkožně aplikována injekční jehla.

5.5.2 Habituační na aréně

Habituační je sice již součástí experimentu, ale zároveň ještě není součástí vlastního testování zvířete. Zvíře se při habituaci pohybuje po aréně bez omezení, neboť při ní nejsou aplikovány elektrické stimuly po vstupu do zakázané oblasti. Habituační slouží především k seznámení zvířete s novým prostředím, kdy zvíře vyvíjí spontánní aktivitu a prozkoumává prostředí, a tak se snižuje možný vlivu stresu z neznámého prostředí na výsledky experimentu. Při habituaci zvířete na bludišti karusel se dle cíle experimentu aréna může nebo nemusí pohybovat a může se při ní zaznamenávat například lokomoční aktivita zvířete.

5.5.3 Trénink

Při tréninku se zvířata učí vyhýbat se zakázanému sektoru. Zvířata jsou během tréninku umístěna na rotující arénu, a pokud vstoupí do zakázané oblasti, obdrží elektrický stimul.

Trénink je součástí experimentu a zaznamenávají se při něm především hodnoty:

- počet vstupů do zakázaného sektoru
- čas do prvního vstupu do sektoru, jenž odráží výkonnost dlouhodobé paměti potkana
- maximální čas vyhýbání mezi dvěma vstupy poukazující na výkonnost pracovní paměti
- délka dráhy uběhnuté potkanem definující jeho lokomoční aktivitu a schopnost únikové reakce

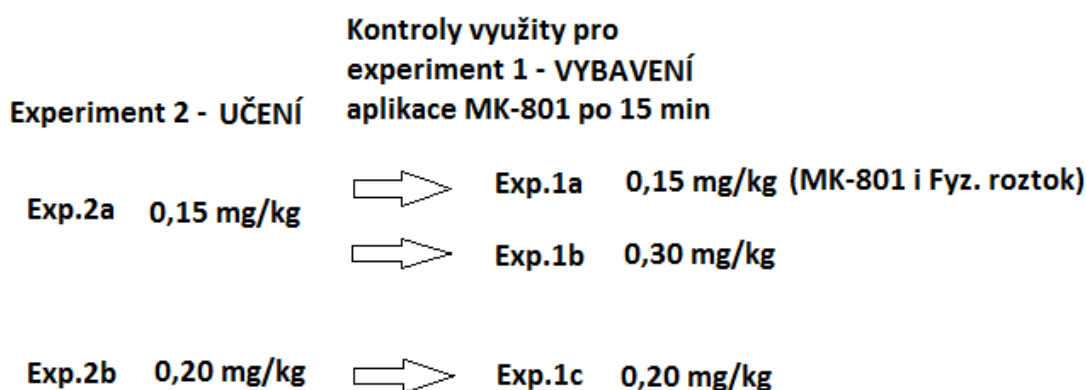
5.6 Metodické postupy

5.6.1 Experiment 1: Vliv akutní aplikace MK-801 na vybavení

Cílem experimentu 1 bylo zjistit účinek MK-801 na vybavení naučené úlohy AAPA po jednorázové aplikaci MK-801 v dávkách 0,15; 0,20; 0,30 mg/kg.

Sledovali jsme především vliv na kognitivní schopnosti zvířete a na jeho lokomoční aktivitu v úloze AAPA.

Z důvodu zvýšení počtu zvířat v testované skupině, byl tento experiment obohacen kontrolními zvířaty z **experimentu 2 - UČENÍ - 2a a 2b** (viz obr. 6), která sice neměla stejnou historii učení, ale kterým byl během učení aplikován pouze fyziologický roztok.



Obr.6: Využití kontrolních potkanů z experimentu 2 – UČENÍ na experiment 1- VYBAVENÍ.

Rozdělení zvířat do skupin pro jednotlivé aplikace látek viz tabulka 3.

Tabulka 3: Počet zvířat v jednotlivých skupinách - test VYBAVENÍ

Experiment	Skupina (aplikovaná látka)	Počet zvířat
	Fyziologický roztok (kontroly)	13
1a	MK-801 (0,15 mg/kg)	34
1b	MK-801 (0,30 mg/kg)	9
1c	MK-801 (0,20 mg/kg)	6

5.6.1.1 Experiment 1a: MK-801 dávka 0,15 mg/kg

1a.I - aplikace po 15 min v průběhu sezení

1a.II - aplikace 30 min před sezením

Cílem experimentu 1a bylo studovat vliv MK-801 na vybavení naučené úlohy AAPA po jednorázové aplikaci látky MK-801 v dávce 0,15 mg/kg. Látka (MK-801 nebo fyziologický roztok) byla v tomto případě aplikována buď 30 minut před začátkem sezení, anebo v průběhu sezení po 15 minutách kdy už je zvíře na aréně a je konfrontováno s úlohou. Sledovali jsme, zda bude nějaký rozdíl mezi potkany, kteří obdrží látku MK-801 před začátkem sezení a potkany, kterým bude látka aplikována až v průběhu sezení, kdy už zvíře řeší úlohu a vybavuje si naučené informace.

Zvířata prošla dvoudenní habituací trvajícím každý den 20 minut. Habituace probíhala na stabilní aréně. Druhý den habituace byl zvířatům 30 minut před vstupem na arénu intraperitoneálně aplikován fyziologický roztok 1 ml/kg váhy zvířete, aby si zvíře navyklo na aplikaci a snížilo se tak možné ovlivnění výsledku experimentu vlivem stresu z aplikace látky. Následujících pět dní byla zvířata trénována na rotující aréně, trénink trval každý den 20 minut. Pátý den tréninku zvířata opět dostala injekci fyziologického roztoku 30 minut před začátkem tréninku. Toto sezení sloužilo zároveň jako kontrolní sezení v podmínkách A.

Po těchto pěti dnech tréninku byla zvířata náhodně rozdělena do tří skupin:

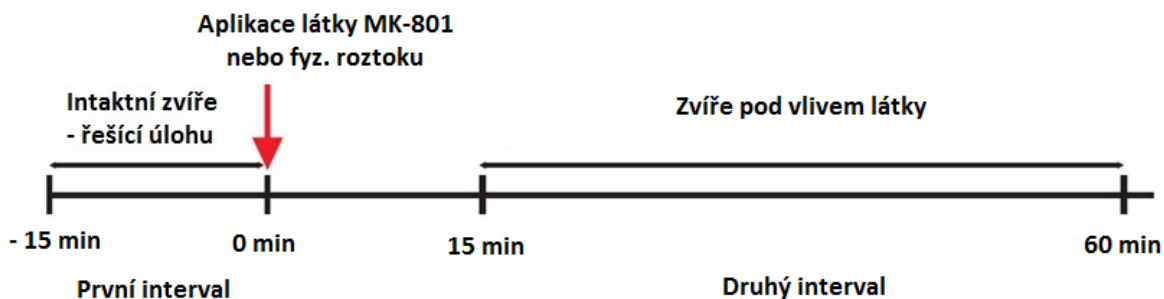
- A) Látka MK-801 byla aplikována zvířeti 30 minut před začátkem sezení trvajícím 30 minut.
- B) Aplikace látky MK-801 byla po 15 min v průběhu sezení trvajícím 75 minut (viz obr. 7) Toto sezení trvalo déle, aby se mohl efekt látky MK-801 plně rozvinout.
- C) Kontrolní skupina, která měla podmínky jako skupina B s tím rozdílem, že zvířatům byl aplikován fyziologický roztok.

Devátý den měla zvířata standardní 20 minutový trénink, aby se ověřilo, zda už došlo k vymizení účinku látky MK-801. Desátý den došlo k prohození podmínek skupiny A s B a kontroly byly náhodně rozděleny do skupiny A nebo B.

K přesnější orientaci (viz obr. 8 -design experimentu 1a).

Habituaace	Trénink	Aplikace látek	Trénink	Aplikace látek	Trénink
2 dny Stabilní aréna 20 min sezení	5 dní Rotující arena Averzivní se vyhýbání sektoru 20 min sezení	1 den (8. den) Rotující arena Averzivní se vyhýbání sektoru 30 min nebo 75 min sezení	1 den (9. den) Rotující arena Averzivní se vyhýbání sektoru 20 min sezení	1 den (10. den) Rotující arena Averzivní se vyhýbání sektoru 30 min nebo 75 min sezení	1 den Rotující arena Averzivní se vyhýbání sektoru 20 min sezení
		Jednorázová aplikace látky MK-801 (0,15 mg/kg)		Jednorázová aplikace látky MK-801 (0,15 mg/kg)	
Druhý den aplikován fyziologický roztok (ml/kg) 30 min před začátkem sezení	Pátý den aplikován fyziologický roztok (ml/kg) 30 min před začátkem sezení	Potkani byli rozděleny do tří skupin: A) aplikace MK-801 <u>30 min před</u> začátkem sezení (trvajícího 30 min) B) aplikace MK-801 <u>15 min po</u> začátku sezení (trvajícího 75 min) C) kontrola - aplikace fyz. roztoku 15 min po začátku sezení (trvajícího 75 min)	Aplikace fyz. roztoku 30 min (ml/kg) před začátkem sezení	Změna podmínek - skupina: A) aplikace MK-801 <u>15 min po</u> začátku sezení (trvajícího 75 min) B) aplikace MK-801 <u>30 min před</u> začátkem sezení (trvajícího 30 min) C) kontroly byly přiřazeny do skupiny: A nebo B	Aplikace fyz. roztoku 30 min (ml/kg) před začátkem sezení

Obr. 8: Design experimentu 1a



Obr. 7: Design dlouhého sezení trvajícím 75 min. Látka MK-801 nebo fyziologický roztok byl aplikován v průběhu sezení po 15 minutách, kdy už zvíře řeší úlohu AAPA a vybavuje si naučené informace.

Aréna byla mezi jednotlivými sezeními očištěna mýdlovou vodou, čímž byly odstraněny pachové stopy předchozího potkana.

5.6.1.2 Experiment 1b: MK-801 dávka 0,30 mg/kg

V tomto experimentu byl opět testován vliv jednorázové aplikace látky MK-801 na vybavení naučené informace, ale v dávce 0,30 mg/kg, která byla podána po 15 min od začátku sezení trvajícím 75 min (viz předchozí obr. 7). Tato dávka by už měla výrazně narušit chování zvířete. Na experiment bylo použito 9 zvířat (kontrolní zvířata z experimentu 2a). Tato zvířata měla dva dny 20 minutovou habituaci na stabilní nebo rotující aréně a následný trénink, tak aby úspěšně zvládala řešit úlohu AAPA (viz obr. 9). Aréna se v tomto experimentu mezi sezeními neumývala, pachové značky na ní zůstávaly.

5.6.1.3 Experiment 1c: MK-801 dávka 0,20 mg/kg

V tomto experimentu byl sledován vliv účinku MK-801 v dávce 0,20 mg/kg na kognitivní schopnosti zvířat v úloze AAPA podle našeho designu experimentu.

Zde bylo využito 6 kontrolních zvířata z experimentu-2b, která absolvovala jen jeden den 20 minutové habituace na stabilní aréně a následně pět dní 20 minutového tréninku (viz obr. 10). Těmto zvířatům byla opět aplikována látka MK-801 tentokrát v dávce 0,20 mg/kg po 15 minutách v průběhu 75 minut trvajících sezení (viz obr. 7). Aréna se mezi jednotlivými sezeními neumývala, pachové značky na ní zůstávaly.

5.6.2 Experiment 2: Vliv chronické aplikace MK-801 na učení

V tomto experimentu bylo cílem ověřit účinek chronické aplikace látky MK-801 v dávce 0,15 a 0,20 mg/kg na učení zvířat v úloze AAPA. Látka MK-801 nebo fyziologický roztok byly aplikovány vždy 30 minut před začátkem tréninku zvířete. Počet zvířat v jednotlivých skupinách viz tabulka 4.

Tabulka 4: Počet zvířat v jednotlivých skupinách – test UČENÍ

Experiment	Skupina (aplikovaná látka)	Počet zvířat
	Fyziologický roztok (kontroly)	17
2a	MK-801 (0,15 mg/kg)	21
2b	MK-801 (0,20 mg/kg)	6

5.6.2.1 Experiment 2a: MK-801 dávka 0,15 mg/kg

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda chronická aplikace látky MK-801 v dávce 0,15 mg/kg ovlivní kognitivní schopnosti zvířat při učení úlohy AAPA za odlišných podmínek během habituace.

Zvířata byla dva dny habituována na stabilní nebo rotující aréně a následně trénována na rotující aréně s averzivním sektorem po dobu pěti dní. Habituace trvala každý den 20 minut a 30 minut před habituací byl aplikován fyziologický roztok nebo MK-801.

Trénink trval pokaždé 20 minut a 30 minut před začátkem každého tréninkového sezení, byl zvířatům aplikován fyziologický roztok, nebo látka MK-801 v dávce 0,15 mg/kg (viz obr. 9).

Zvířata byla pro následnou analýzu rozdělena do šesti skupin:

1) podle aplikace látky:

- a) MK-801 v dávce 0,15 mg/kg aplikována 30 minut před vstupem na arénu
- b) Fyziologický roztok aplikován 30 minut před vstupem na arénu

2) podle podmínek během habituace:

- a) Stabilní aréna
- b) Rotující aréna

(viz obr. 9 – design experimentu 2a).

Aréna	Habituace - 2 dny 20 min	Trenink - 5 dní 20 min ROTUJÍCÍ ARÉNA
Stabilní	Fyz. roztok	Fyz. roztok *
	Fyz. roztok	MK801 (0,15 mg/kg)
	MK801 (0,15 mg/kg)	MK801 (0,15 mg/kg)
Rotující	Fyz. roztok	Fyz. roztok *
	Fyz. roztok	MK801 (0,15 mg/kg)
	MK801 (0,15 mg/kg)	MK801 (0,15 mg/kg)

Obr. 9: Design experimentu-2a

*Zvířata v kontrolní skupině, kterým byl v průběhu experimentu aplikován fyziologický roztok, byla poté ještě využita pro experiment 1a a 1b (experiment – VYBAVENÍ aplikace fyziologického roztoku i látky MK-801).

Aréna se zde mezi jednotlivými sezeními u prvních skupiny potkanů umývala mýdlovou vodou, u následujících skupiny pak myta nebyla (viz diskuse).

5.6.2.2 Experiment 2b: MK-801 dávka 0,20 mg/kg

V tomto experimentu se opět testoval účinek chronického podávání látky MK-801, tentokrát v dávce 0,2 mg/kg, na kognitivní funkce potkanů při učení úlohy AAPA. Rozdíl oproti předchozímu experimentu byl ve výši dávky MK-801 a habituaci. Habituace trvala pouze jeden den na stabilní aréně a byl aplikován pouze fyziologický roztok, neboť předchozí experiment 2a neukázal rozdíl ve výkonu mezi zvířaty, která měla odlišné podmínky (rotující

vs. stabilní aréna) během habituace (pretréninku). Pro další analýzu byly proto tyto dva experimenty (2a a 2b) spojeny.

Látka MK-801 v dávce 0,20 mg/kg váhy zvířete byla opět aplikována 30 minut před každým tréninkovým sezením.

V experimentu bylo použito 12 zvířat, která byla náhodně rozdělena po 6 do dvou skupin (kontrolní (aplikace fyziologického roztoku) experimentální (aplikace MK-801)). Kontroly byly následně využity ještě pro experiment 1c (vybavení po vlivem látky MK-801) design experimentu-2b (viz obr. 10).

Habituace - 1 den, 20 min Stabilní arena		Trénink - 5 dní, 20 min Rotující aréna		Kontroly-test vybavení Aplikace MK-801 po 15 min v průběhu sezení trávajícího 88 min	
→		→		→	
Skupina 1- kontroly	Fyz. roztok	Fyz. roztok		MK-801 (0,2 mg/kg)	
Skupina 2- exp.	Fyz. roztok	MK-801 (0,2 mg/kg)			

Obr. 10: Design experimentu 2b

5.6.3 Statistika a analýza dat

V experimentu byly vyhodnocovány parametry:

- počet vstupů do zakázaného sektoru za minutu (#/min)
- maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru (min)
- průměrná rychlost zvířete na aréně (m/min)

Data byla přepočítána (vztažena) na jednotku času.

Data byla statisticky zpracována v programu R.

Data byla nenormálně rozdělena, jejich variabilitu názorně demonstrují grafy obr. 14, 17.

Data tak byla proto hodnocena Kruskal-Wallis neparametrickou ANOVOU, případně pak post hoc testy, kdy byl použit Wilkonxonův test s Holm-Bonferroniho korekcí pro vícenásobné porovnání, nebo Wilkonxonův párový test.

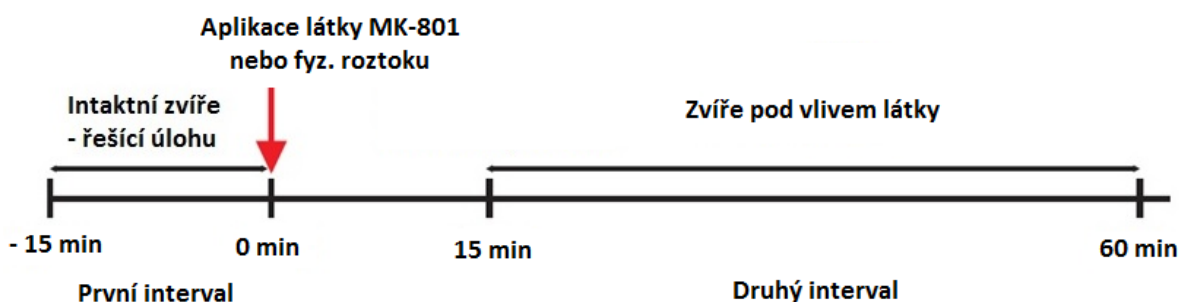
Osy grafu byly transformovány $\log_2(x+1)$ (obr. 13,14,16,17,23).

6 Výsledky

6.1 Experiment 1: Vliv akutní aplikace MK-801 na vybavení

6.1.1 Experiment 1a.I,1b,1c: Aplikace látky MK-801 po 15 minutách od začátku úlohy AAPA

V experimentu byla látka MK-801 podána po 15 min, kdy už potkan byl konfrontován s úlohou AAPA. Během prvního intervalu (15 min) bylo zvíře intaktní a ve druhém intervalu (45 min) bylo jeho chování pod vlivem látky MK-801 v dávkce 0,15; 0,20; 0,30 mg/kg, případně byl aplikován fyziologický roztok (viz design experimentu obr. 11).



Obr.11: Design experimentu. Fyziologický roztok nebo látka MK-801 byla aplikována po 15 minutách zvířeti, které už řeší úlohu AAPA. Analyzován byl první interval (intaktní zvíře), který byl porovnán s druhým intervalem (zvíře pod vlivem látky MK-801, nebo aplikací fyziologického roztoku).

V tomto experimentu jsme identifikovali dvě zcela odlišné behaviorální strategie, které potkani v úloze AAPA zaujali. Z pozorování během experimentu bylo patrné, že potkani jsou poslední den tréninku ve většině případu buď schopni řešit úlohu AAPA a vyhýbat se zakázanému sektoru, nebo se naopak sektoru nevyhýbají a setrvávají v nahrbené pozici (tzv. „freezing“) téměř bez jakékoliv lokomoce po aréně a bez vyhýbání se zakázanému sektoru.

Na základě zkušeností, pozorování a výsledků z předchozích studií jsme si tak stanovili kritéria pro „úspěšně řešícího“ a „nepohybujícího“ se potkana.

Kritérium pro řešícího potkana bylo stanoveno:

- méně než 0,25 vstupů za minutu

Kritérium pro nepohybující se potkana bylo stanoveno:

- průměrná rychlost lokomoce méně než jeden metr za minutu

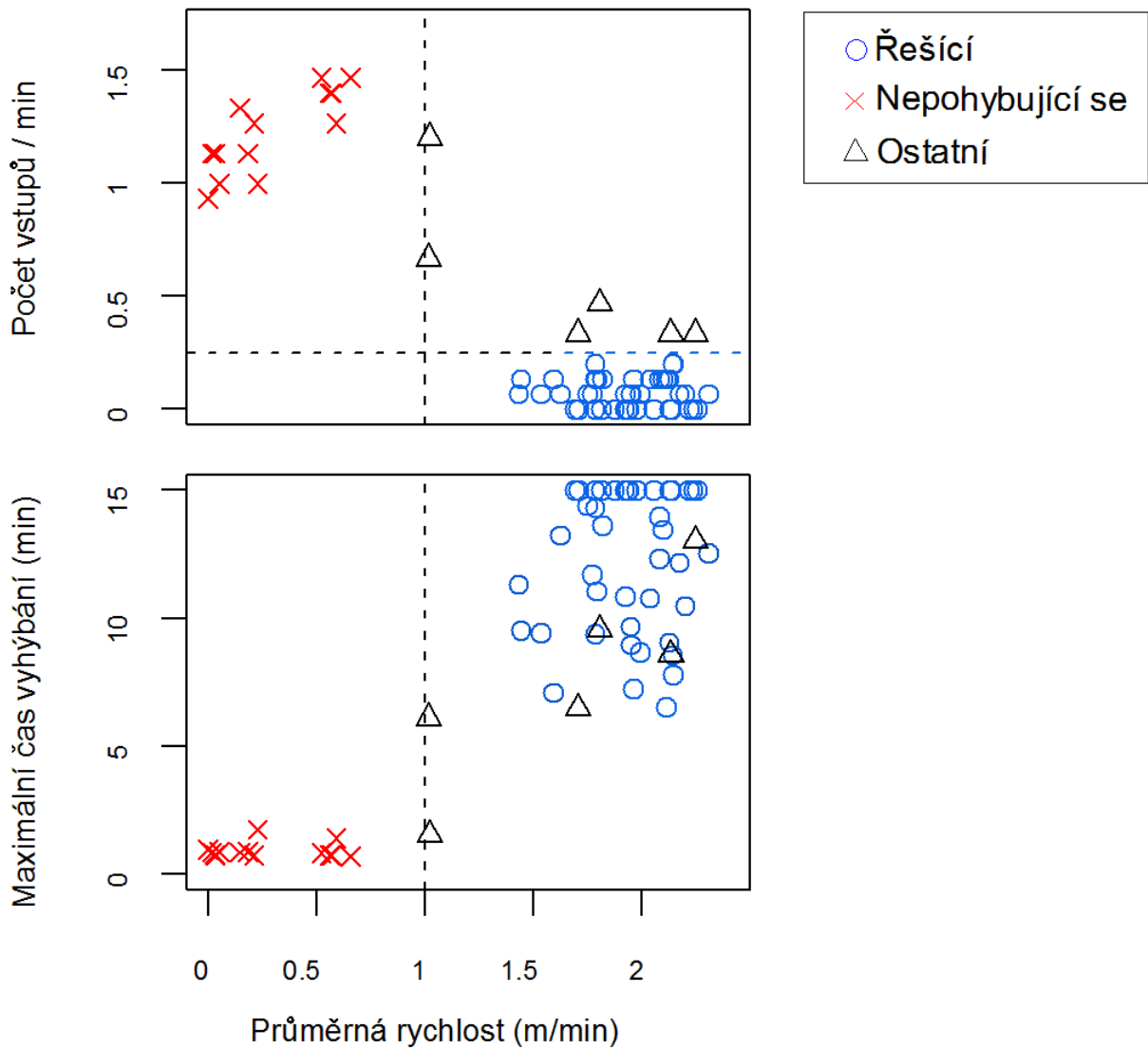
Potkan stojící na okraji arény se musí pohybovat rychlostí okolo 2 m/min, aby kompenzoval rychlost otáčení arény a tak se vyhnul zakázané oblasti.

Rozdělení potkanů podle behaviorální strategie na základě chování během prvního intervalu (15 min) znázorňuje graf obr.12 a tabulka 5.

Tabulka 5: Počet zvířat ve skupině a rozdělení podle behaviorální strategie

Skupina (aplikovaná látka)	Potkan (strategie chování v úloze AAPA)		
	Řešící	Nepohybující se	Ostatní
Fyziologický roztok (kontroly)	6	2	5
MK-801 (0,15 mg/kg)	24	9	1
MK-801 (0,20 mg/kg)	6	0	0
MK-801 (0,30 mg/kg)	6	3	0

Rozdělení potkanů podle behaviorální strategie



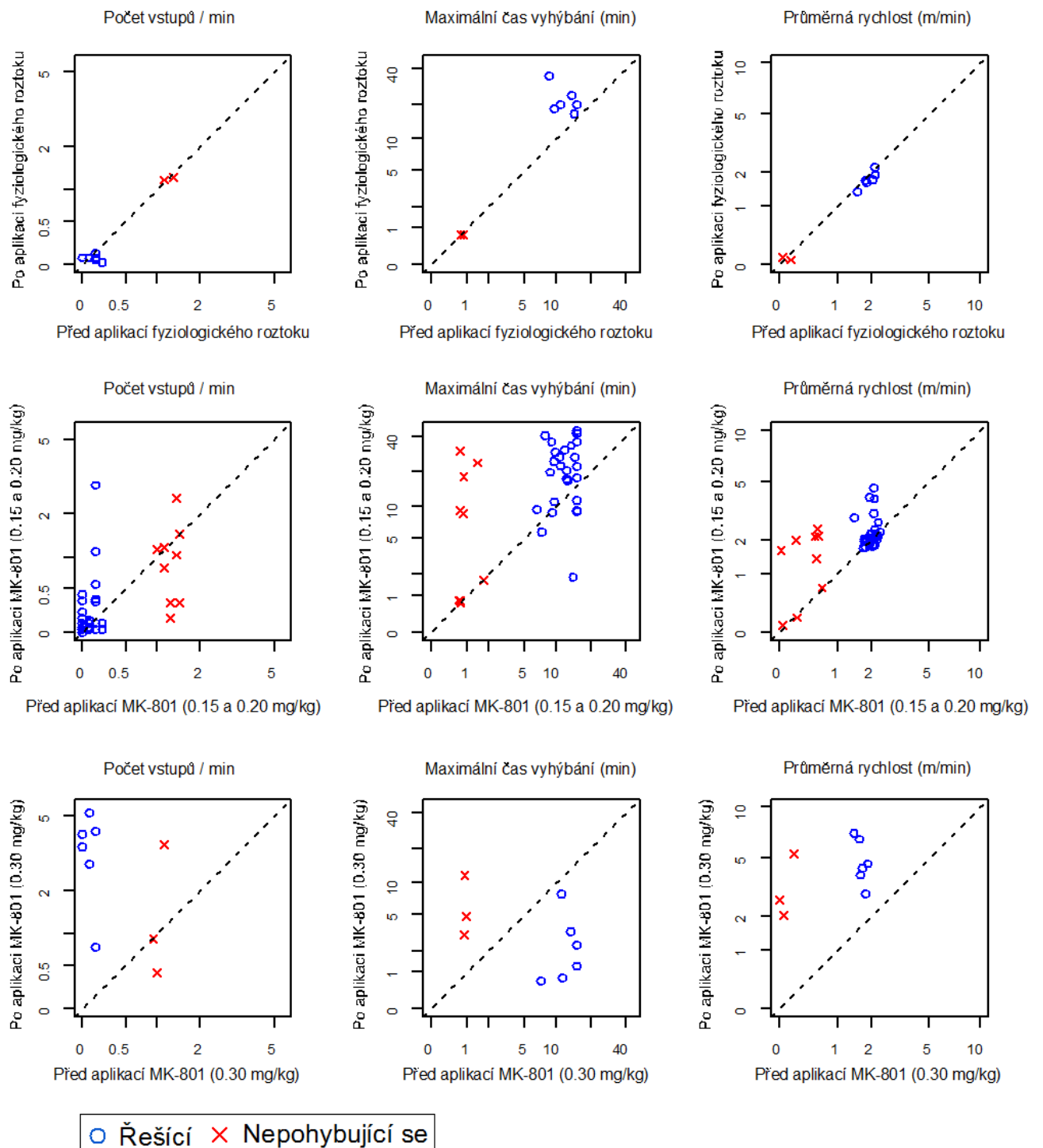
Obr. 12: Rozdělení potkanů podle behaviorální strategie. Graf znázorňuje rozdělení potkanů podle behaviorální strategie na základě stanovených kritérií (přerušovaná čára) pro „úspěšně řešícího“ potkana (méně jak 0,25 vstupů/min) a „nepohybujícího“ se potkana (průměrná rychlost lokomoce méně než 1m/min) analyzované během prvního intervalu (15 min). Potkani, kteří spadají do skupiny „ostatní“ byli na hranici těchto kritérií. Na ose x je znázorněna lokomoce zvířete na aréně jako průměrná rychlost (m/min), na ose y v horním grafu je znázorněn počet vstupů za minutu do zakázaného sektoru a v dolním grafu maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru.

Následující grafy (viz obr. 13) porovnávají chování zvířat během prvního intervalu (15 min, intaktní zvíře) a druhého intervalu (45 min, zvíře pod vlivem látky) (viz design experimentu obr. 11). Tyto grafy velmi přehledně znázorňují změnu chování jednotlivých zvířat po aplikaci fyziologického roztoku, nebo látky MK-801 v dávce 0,15; 0,20; 0,30 mg/kg. Je zde názorně vidět rozdílný vliv látky MK-801 na jednotlivá zvířata s odlišnou behaviorální strategií.

Z grafů je patrné, že se během druhého intervalu se oproti prvému ve většině případů zvýšil maximální čas vyhýbání se místu jak u kontrol, tak i u potkanů ovlivněných látkou MK-801 v dávce 0,15 a 0,20 mg/kg. To bylo pravděpodobně způsobeno samotným uspořádáním experimentu – druhý interval je delší a zvíře má tak příležitost déle se vyhýbat. Dále je z grafů patrné, že ve většině případů dávky 0,15 a 0,20 mg/kg nijak výrazně neovlivnily počet vstupů do zakázané oblasti.

Také je zde vidět odlišný vliv látky MK-801 na potkany, kteří byli zařazeni do skupiny „nepohybujících se“, u nichž je vidět nejen výrazně zvýšená lokomoce, ale i snížený počet vstupů do sektoru. Tento „pozitivní“ vliv látky MK-801 na nepohybující se potkany, kdy se potkani s touto strategií začnou vyhýbat zakázané oblasti, byl pozorován v několika případech a názorně je to vidět na grafu reprezentace dráhy (viz obr. 22).

Vliv látky MK-801 na chování potkanů s odlišnou behaviorální strategií



Obr. 13: Vliv MK-801 na potkany s různou behaviorální strategií. Graf znázorňuje vliv látky MK-801 aplikované po 15 min na vybavení. Porovnáván je první interval, kdy bylo zvíře intaktní (osa x) vůči druhému intervalu (osa y) po aplikaci fyziologického roztoku (horní grafy) nebo po aplikaci MK-801 0,15; 0,20 mg/kg (grafy v řadě uprostřed) a 0,30 mg/kg (grafy v dolní řadě). Je zde názorně vidět vliv MK-801 na jednotlivá zvířata s odlišnou behaviorální strategií.

Statisticky byla analyzována data pouze pro potkany ze skupiny „řešící“ úlohu AAPA vyhýbáním se sektoru viz tabulka 5. Počet potkanů ze skupiny „nepohybující se“ byl příliš malý pro korektní statistickou analýzu a jejich chování je ukázáno na ilustračních grafech (viz obr. 12, 13, 15, 16) a na ukázce trajektorie (viz obr. 22).

Statistické porovnání výkonnosti skupin v druhém intervalu (45 min)(viz obr. 11) bylo provedeno Kruskal-Wallis neparametrickou ANOVOU. Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní v počtu vstupů za minutu (#/min), v maximálním času vyhýbání se zakázané oblasti (min) a v průměrné rychlosti zvířete na aréně (m/min) (viz tabulka 6).

Tabulka 6: Data zanalyzována Kruskal-Wallis neparametrickou ANOVOU

Parametr	χ_3^2	p	
Počet vstupů/minutu	14,5958	0,002197	$p < 0,01$
Max. čas vyhýbání (min)	15,4081	0,001499	$p < 0,01$
Průměrná rychlost (m/min)	19,5163	0,0002138	$p < 0,001$

Data byla následně analyzována Wilkonxonovým testem s Holm-Bonferroniho korekcí pro vícenásobné porovnání. Porovnáván byl vždy druhý interval (45 min) kontrolní skupiny versus druhý interval (45 min) analyzované skupiny ovlivněné látkou MK-801 (viz tabulka 7).

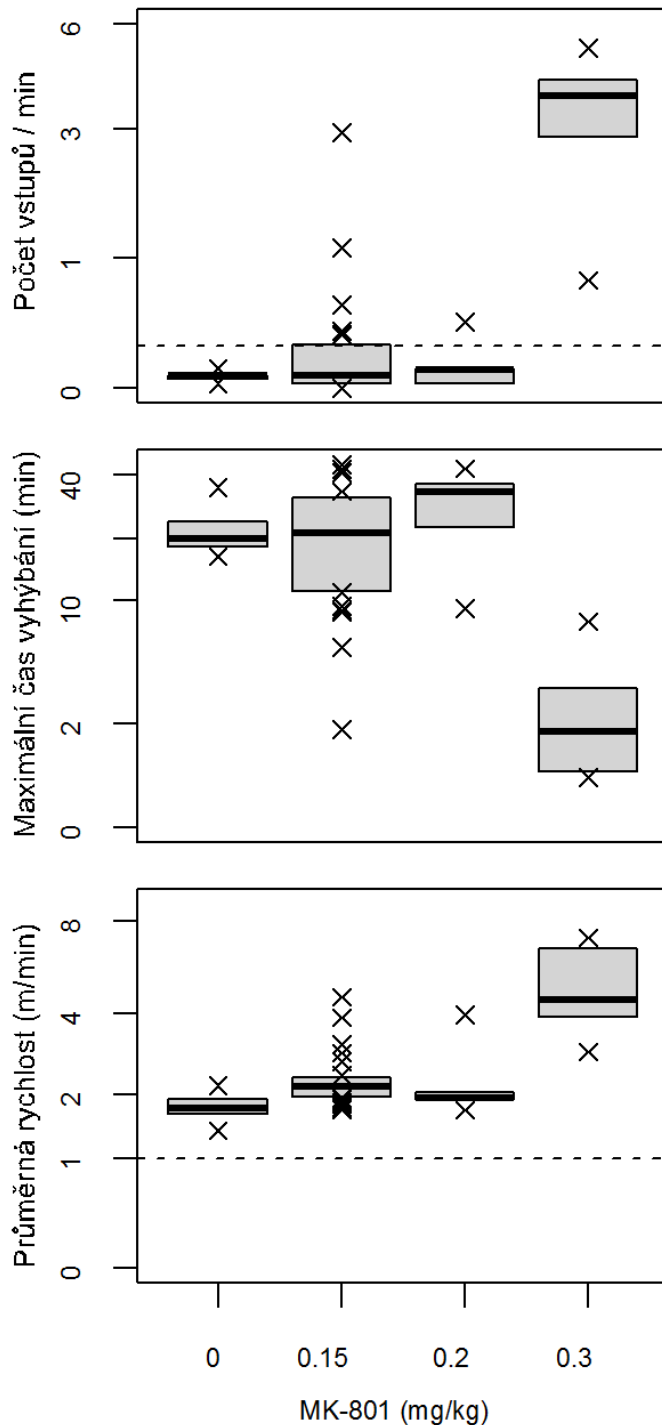
Tabulka 7: Data zanalyzována Wilkonxonovým testem s Holm-Bonferroniho korekcí

Parametr	Porovnané skupiny zvířat	W	p („adjusted“)korigované	
Počet vstupů/min	Kontroly x MK-801 (0,15 mg/kg)	65	0,7346	
	Kontroly x MK-801 (0,20 mg/kg)	13	0,9232	
	Kontroly x MK-801 (0,30 mg/kg)	0	0,014316	$p < 0,05$
Maximální čas vyhýbání se místu (min)	Kontroly x MK-801 (0,15 mg/kg)	71	0,9793	
	Kontroly x MK-801 (0,20 mg/kg)	9	0,3594	
	Kontroly x MK-801 (0,30 mg/kg)	36	0,006495	$p < 0,01$
Průměrná rychlost (m/min)	Kontroly x MK-801 (0,15 mg/kg)	19	0,008292	$p < 0,01$
	Kontroly x MK-801 (0,20 mg/kg)	8	0,132	
	Kontroly x MK-801 (0,30 mg/kg)	0	0,006495	$p < 0,01$

Látka MK-801 v dávce 0,15 a 0,20 mg/kg neovlivnila signifikantně chování potkanů.

Lokomoce potkanů analyzovaná jako průměrná rychlost (m/min) byla prokazatelně zvýšená u potkanů po podání látky MK-801 v dávce 0,15 mg/kg, ale v dávce 0,20 mg/kg se tento efekt neprojevil. Což mohlo být způsobeno například i malým počtem zvířat ve skupině. Pouze dávka 0,3 mg/kg vyvolala u potkanů signifikantní rozdíl v chování ve všech měřených parametrech. Tato zjištění názorně demonstrují následující grafy (viz obr. 14). V dávce 0,15 a 0,20 mg/kg nedochází ve většině případů k výraznému narušení chování u zvířat, avšak je zde značná variabilita výsledného chování po působení látky MK-801. Z grafů (viz obr. 13, 14) jsou patrné rozdíly v působení látky MK-801 na jednotlivá zvířata. Pouze v dávce 0,30 mg/kg je už signifikantní efekt MK-801 na chování, které je v této dávce ovlivněno u všech zvířat.

Vliv látky MK-801 na potkany úspěšně řešící úlohu AAPA



Obr. 14: Vliv MK-801 na různé parametry při řešení úlohy AAPA. Grafy názorně ukazují variabilitu chování zvířat po aplikaci MK-801 u potkanů, kteří úspěšně řešili úlohu AAPA vyhýbáním se zakázané oblasti. Na ose x jsou jednotlivé dávky MK-801. Na ose y je počet vstupů/min do zakázaného sektoru (horní graf), maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru (prostřední graf) a lokomoce zvířete analyzována jako průměrná rychlost (m/min) (spodní graf). Pouze v dávce 0,30 mg/kg je chování signifikantně ovlivněno.

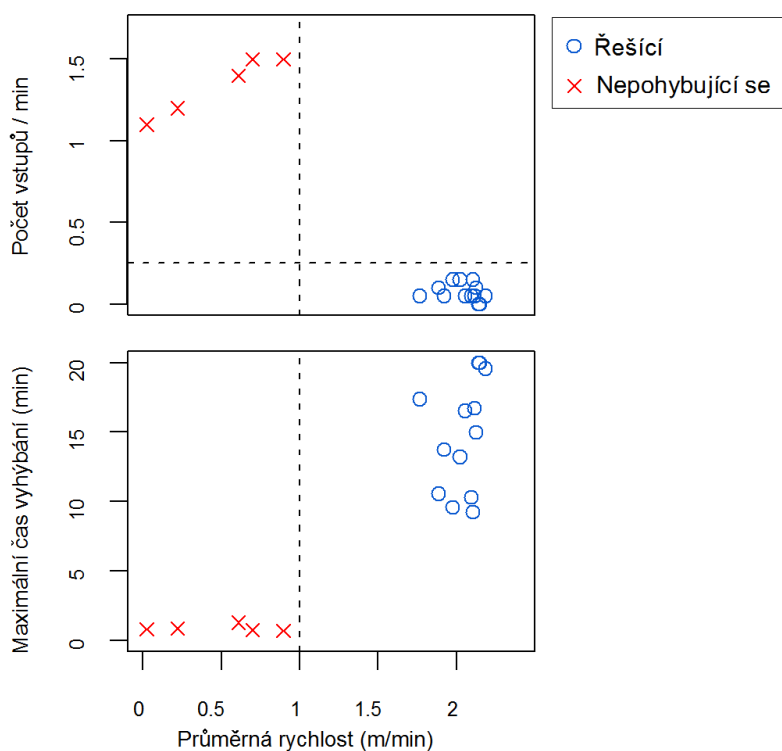
6.1.2 Experiment 1a.II: Látka MK-801 byla aplikována 30 minut před začátkem úlohy AAPA

Látka MK-801 v dávce 0,15 mg/kg, která byla aplikována 30 min před tím, než potkan začal řešit úlohu na aréně. Následující tabulka 8 a graf (viz obr. 15) opět poukazuje na odlišné strategie chování potkanů při řešení úlohy AAPA analyzované během posledního sezení.

Tabulka 8: Počet zvířat a rozdělení podle behaviorální strategie- test VYBAVENÍ

Strategie chování zvířete	Počet
Potkan řešící úlohu AAPA	13
Nepohybující se potkan	5

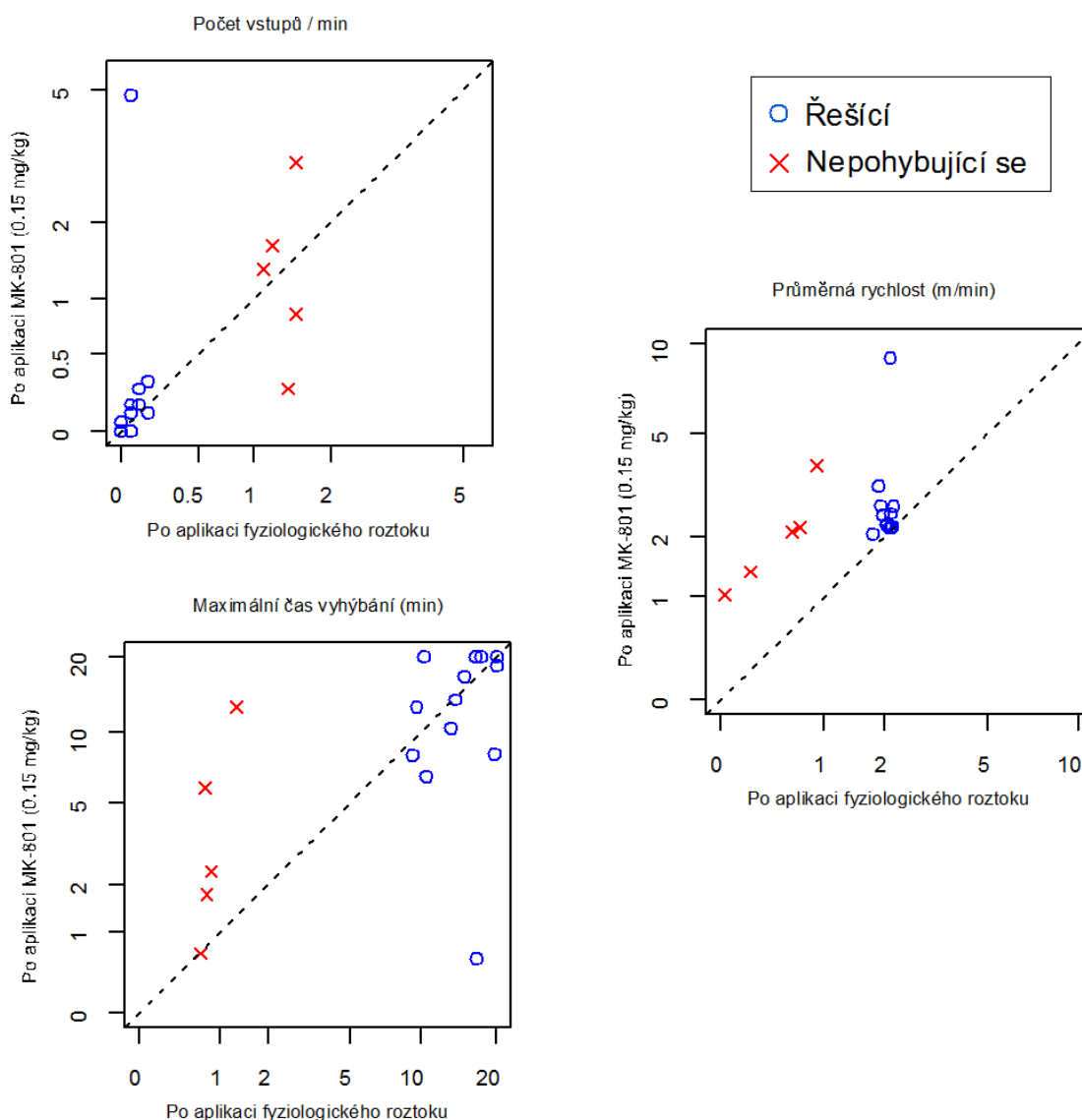
Rozdělení zvířat podle behaviorální strategie



Obr. 15: Rozdělení zvířat podle behaviorální strategie. Graf znázorňuje rozdělení potkanů podle behaviorální strategie na základě stanovených kritérií (přerušovaná čára) pro úspěšně řešícího potkana (méně jak 0,25 vstupů/min) a nepohybujícího se potkana (průměrná rychlost lokomoce méně jak 1m/min) analyzované během posledního tréninku. Na ose x je znázorněna lokomoce zvířete (m/min), na ose y v horním grafu je znázorněn počet vstupů/min do zakázaného sektoru a v dolním grafu max. čas vyhýbání se zakázanému sektor (min).

Následující grafy (viz obr. 16) opět ukazují na odlišný vliv látky MK-801 v dávce 0,15 mg/kg na jednotlivá zvířata s odlišnou behaviorální strategií. Porovnávána je zde výkonnost zvířete v posledním sezení tréninku, kdy zvířata obdržela fyziologický roztok versus experimentální sezení probíhající den poté. Opět se zde projevil „pozitivní“ vliv látky MK-801 na „nepohybující se potkany“, u kterých je vidět především zvýšený maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru.

Vliv látky MK-801 na chování potkanů s odlišnou behaviorální strategií



Obr. 16 : Vliv látky MK-801 na potkany s různou behaviorální strategií. Grafy názorně ukazují vliv látky MK-801 aplikované 30 min před začátkem experimentu na jednotlivá zvířata s odlišnou behaviorální strategií. Porovnáván je zde výkon zvířete v posledním tréninkovém sezení po aplikaci fyziologického roztoku (osa x) versus následující den, kdy byla aplikována látka MK-801 v dávce 0,15 mg/kg (osa y).

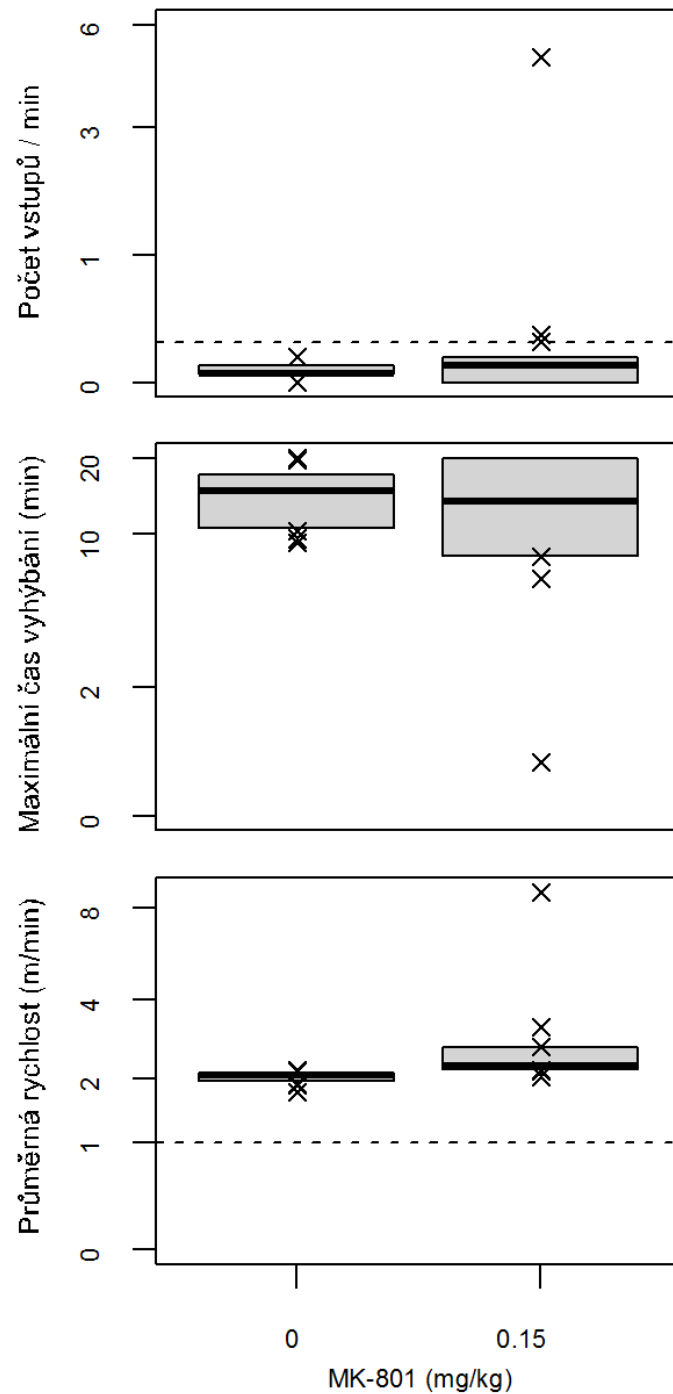
Statisticky byla opět hodnocena pouze ta zvířata, která poslední den tréninku úspěšně řešila úlohu AAPA a vyhýbala se tak zakázanému sektoru, počet (viz tabulka 8). Porovnáván byl výkon stejného zvířete během posledního tréninku s výkonností během experimentu s aplikací MK-801, který probíhal den poté. Data byla analyzována Wilkonxonovým párovým test (viz tabulka 9).

Tabulka 9: Data zanalyzována Wilkonxonovým párovým testem

Parametr	V	<i>p</i>	
Počet vstupů/min	26	0,3266	
Maximální čas vyhýbání se místu (min)	53	0,6355	
Průměrná rychlost (m/min)	0	0,0002441	<i>p</i> < 0,001

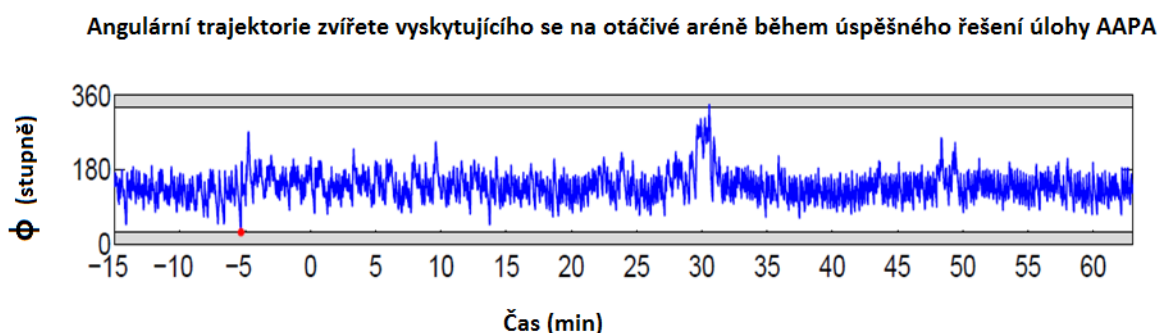
Látka MK-801 v dávce 0,15 mg/ kg aplikována 30 minut před začátkem experimentu, neovlivnila signifikantně počet vstupů do zakázaného sektoru a maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru u potkanů, kteří jsou schopni úspěšně řešit úlohu AAPA. Statisticky průkazně však tato dávka zvýšila lokomoci zvířat. Tento efekt je také vidět na následujících grafech (viz obr. 17) znázorňujících variabilitu mezi výsledným chováním potkanů po aplikaci látky MK-801.

Vliv látky MK-801 na potkany úspěšně řešící úlohu AAPA

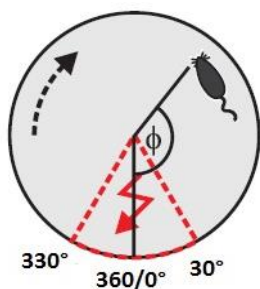


Obr. 17: Vliv MK-801 na potkany úspěšně řešící úlohu AAPA. Grafy názorně ukazují variabilitu v datech. Dávka 0,15 mg/kg aplikovaná 30 minut před začátkem úlohy výrazně neovlivnila chování u zvířat, která uměla úlohu AAPA řešit vyhýbáním se zakázané oblasti. Na ose x je znázorněna aplikovaná látka. Na ose y je počet vstupů/min do zakázaného sektoru (horní graf), maximální čas vyhýbání se zakázanému sektoru (min) (prostřední graf) a průměrná rychlost zvířete na aréně (m/min)-(spodní graf).

Během pozorování experimentu byl patrný odlišný vliv látky MK-801 na jednotlivá zvířata s různými behaviorálními strategiemi jak prezentují i předchozí grafy (viz obr. 13, 16). Následující ilustrační grafy ukazují chování individuálních potkanů během konkrétního sezení. Představují grafickou reprezentaci dráhy (angulární trajektorii) zvířete na otáčivé aréně (viz obr. 18). Zakázaný sektor je znázorněn dvěma podélnými šedými pruhy reprezentující oblast 0° až 30° a 360° až 330° na kruhové aréně (viz obr 19). Nepohybující se zvíře je otáčivým pohybem arény vezeno od 360° k 0° do zakázaného sektoru. Aktivní pohyb zvířete proti směru otáčení arény je graficky znázorněn směrem vzhůru od 0° ke 360° (viz obr. 18)



Obr.18: Angulární trajektorie zvířete na aréně znázorněná jako grafická reprezentace dráhy. Zakázaný sektor je znázorněn dvěma podélnými šedými pruhy. Aktivní pohyb zvířete je směrem od 0° k 360°, směrem opačným je zvíře pasivně vezeno otáčivým pohybem arény.

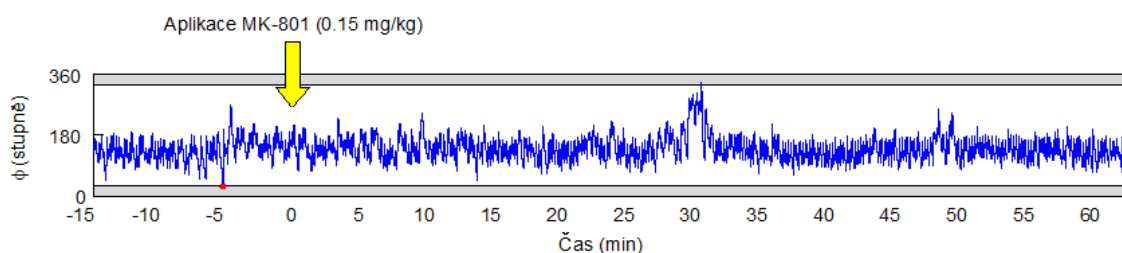


Obr. 19: Zakázaný sektor tvoří kruhová výseč (60°), zde tvořená oblastí od 0° až k 30° a 360° až k 330° prezentované jako šedé pruhy viz obr.X2

Zvířata jsou různě náchylná k působení vlivu látky MK-801 ve stejné dávce, což znázorňují i následující grafy (viz obr. 20, 21, 22). U těchto potkanů podání látky vyvolalo i zcela protichůdné výsledky chování. Například podání látky MK-801 v dávce 0,15 mg/kg nezpůsobilo u jednoho zvířete úspěšně řešícího úlohu AAPA žádné narušení kognice (viz obr. 20) zatímco u druhého zvířete - taktéž úspěšně řešícího úlohu AAPA tato - aplikace

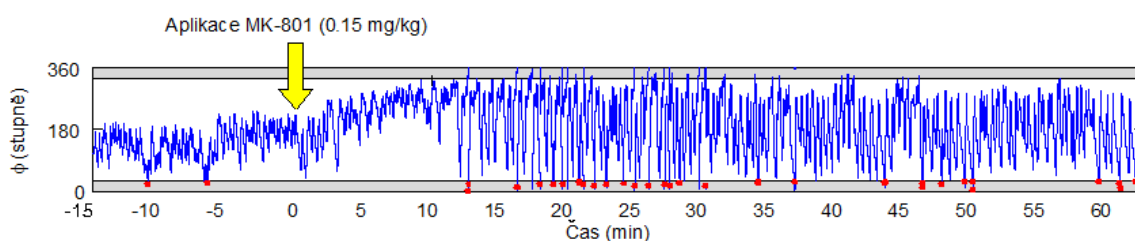
výrazně narušila schopnost řešit úlohu (viz obr. 21). Velice zajímavý je pak fenomén, kdy podání této látky pozitivně ovlivnilo chování doposud neřešícího a nepohybuujícího se potkana, kdy bylo vidět patrné zlepšení a řešení úlohy AAPA (viz obr. 22), toto zlepšení bylo pozorované celkem u šesti jedinců.

Vliv látky MK-801 na potkana úspěšně řešícího úlohu AAPA



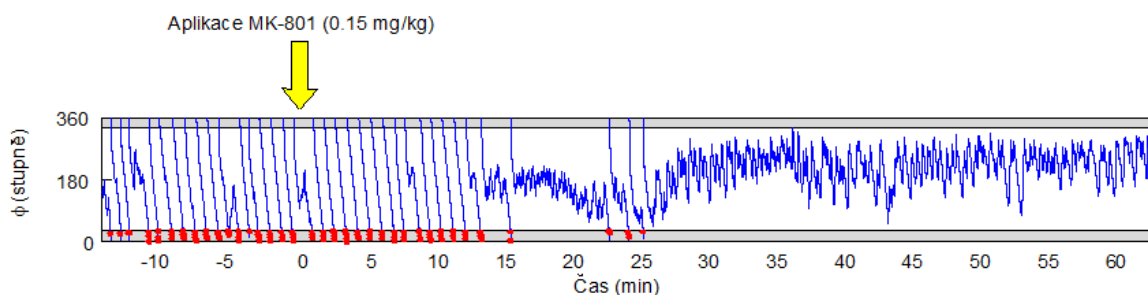
Obr. 20: Angulární trajektorie potkana, který úspěšně řeší úlohu AAPA. Podání látky MK-801 (0,15 mg/kg) během řešení úlohy u něj nevyvolalo žádné behaviorální změny, které by narušily jeho schopnost úspěšně řešit úlohu AAPA. Zvíře se tak nadále úspěšně vyhýbalo zakázanému sektoru (znázorněného na dvěma šedivými podélnými pruhy).

Vliv látky MK-801 na potkana úspěšně řešícího úlohu AAPA



Obr. 21: Angulární trajektorie potkana, který úspěšně řeší úlohu AAPA. Podání látky MK-801 (0,15 mg/kg) během úlohy u něj vyvolalo změny chování projevující se narušením schopnosti řešit tuto úlohu a časté vstupování do zakázané oblasti (znázorněné dvěma šedými podélnými pruhy).

Vliv látky MK-801 na nepohybuujícího se potkana v úloze AAPA



Obr. 22: Angulární trajektorie potkana, který se nepohybuje a nevyhýbá se zakázanému sektoru (znázorněn dvěma podélnými šedými pruhy). Rovnoběžné čáry na začátku představují tu část experimentu, kdy je potkan pasivně transportován skrz zakázanou oblast. Aplikace látky MK-801 (0,15 mg/kg) během úlohy u něj vyvolala změny chování projevující se úspěšným řešením úlohy AAPA

Následující graf (viz obr. 23) ukazuje souvislost mezi množstvím dávky MK-801, lokomocí potkana na aréně a schopností potkana řešit úlohu AAPA vyhýbáním se zakázané oblasti. Graf demonstruje optimální rychlost, která umožňuje potkanovi kompenzovat rychlost arény a vyhýbat se zakázanému sektoru.

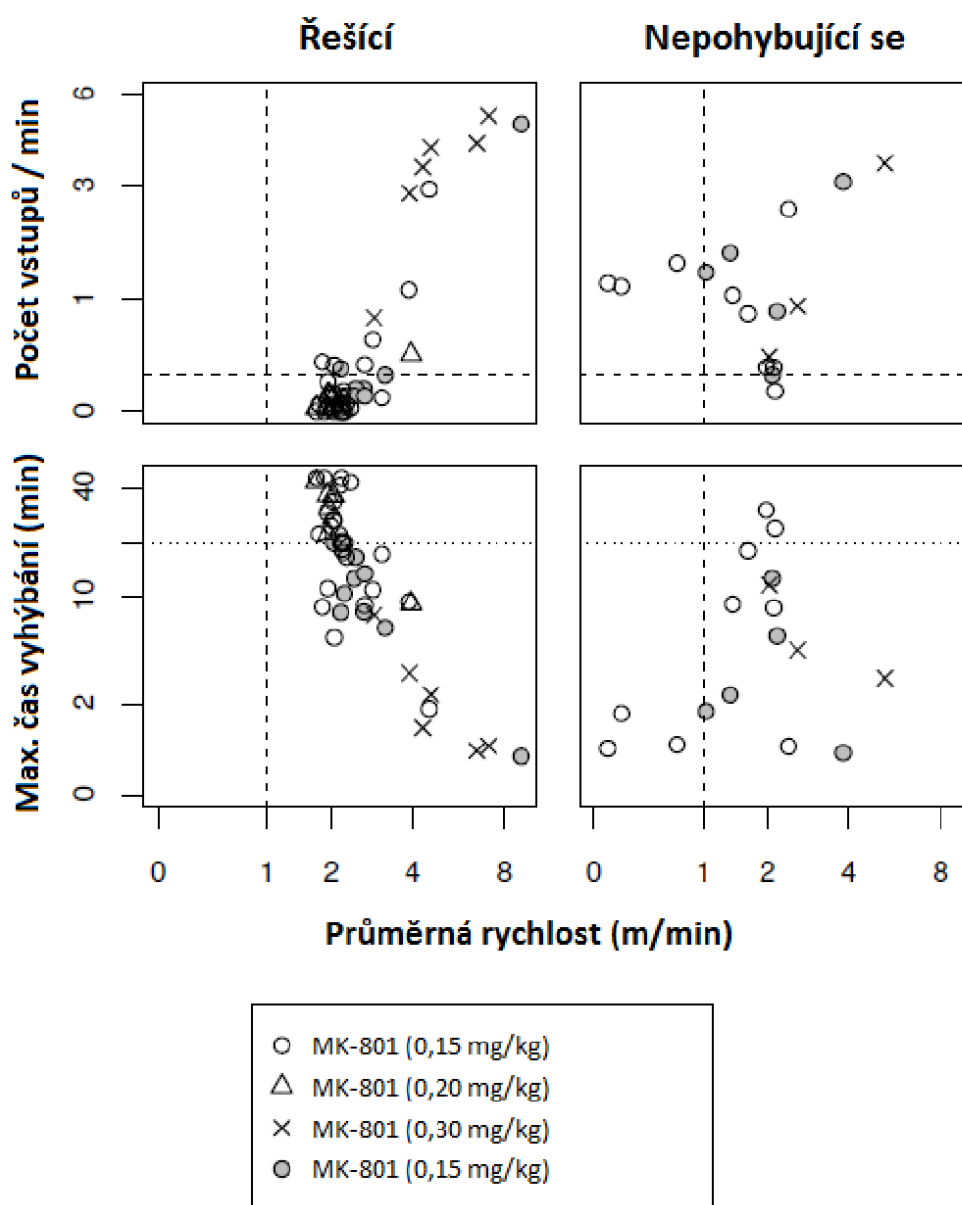
Zanalyzována byla data opět pouze pro potkany „řešící“ úlohu AAPA.

Spermanův korelační koeficient:

Dávka 0,15 a 0,20 mg/kg MK-801

- průměrná rychlost x počet vstupů ($p=0,007$)
- prům. rychlost x max. čas vyhýbání se ($p=0,003$)

Účinek látky MK-801 na řešící a nepohybující se potkany



Obr.23: Vliv MK-801 na chování „řešících“ a „nepohybujících se potkanů“.

Graf demonstruje optimální rychlost, která umožňuje potkanovi kompenzovat rychlost arény a vyhýbat se zakázanému sektoru. Na Grafu je zázorněn vztah mezi množstvím aplikované dávky MK-801, lokomocí zvířete a schopností řešit úlohu AAPA vyhýbáním se zakázanému sektoru. Na ose x je průměrná rychlostí zvířete po aréně (m/min). Na ose y počet vstupů/min do zakázané oblasti (horní graf) a maximální čas vyhýbání se zakázané oblasti (min) (dolní graf).

6.2 Experiment 2: Vliv chronické aplikace MK-801 na učení

6.2.1 Experiment 2a, 2b

V tomto experimentu byl zkoumán efekt chronické aplikace MK-801 na učení úlohy AAPA. Učení probíhalo po dobu pěti dnů a látka MK-801 byla aplikována v dávkách 0,15 a 0,20 mg/kg 30 minut před začátkem experimentu. Počet zvířat v jednotlivých skupinách v experimentu 2a a 2b ukazuje tabulka 10.

Tabulka 10: Počet zvířat v jednotlivých skupinách – test UČENÍ

Experiment	Skupina (aplikovaná látka)	Počet zvířat
	Fyziologický roztok (kontroly)	17
2a	MK-801 (0,15 mg/kg)	21
2b	MK-801 (0,20 mg/kg)	6

Ke statistickému porovnání výkonu mezi skupinami během posledního tréninku (páté sezení) byl použit Kruskal-Wallisův test (viz tabulka 11).

Tabulka 11: Analýza dat Kruskal-Wallisovým testem

Parametr	χ_2^2	p	
Počet vstupů/min	5,4142	0,06673	
Maximální čas vyhýbání se místu (min)	4,3306	0,1147	
Průměrná rychlost (m/min)	12,3363	0,002095	$p < 0,01$

Signifikantní rozdíl byl mezi skupinami pouze v lokomoci zvířat. Tato data byla následně analyzována Wilxonovým testem s Holm-Bonferroniho korekcí pro vícenásobné porovnání (viz tabulka 12).

Tabulka 12: Analýza dat Wilxonovým testem s Holm-Bonferroniho korekcí

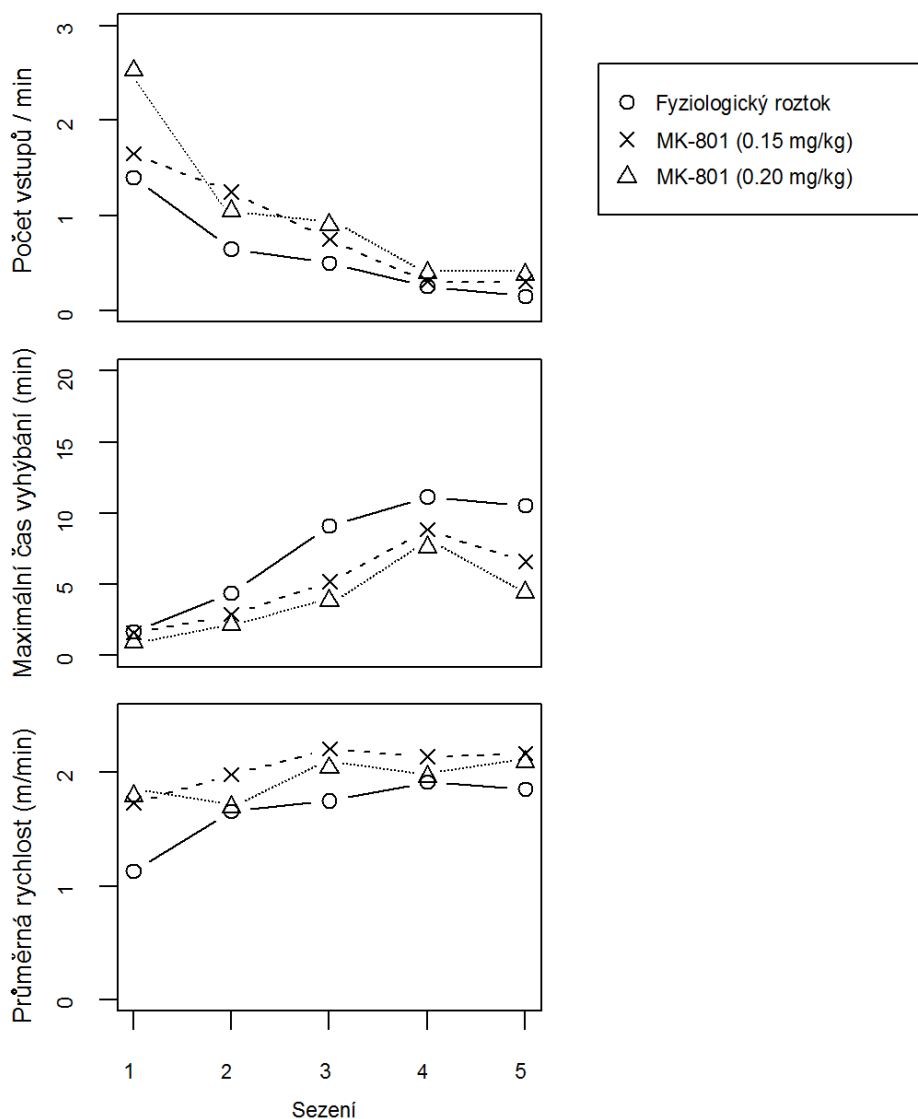
Porovnané skupiny	W	p („adjusted“) korigované	
Kontroly x MK-801 (0,15 mg/kg)	63	0,0013092	$p < 0,01$
Kontroly x MK-801 (0,20 mg/kg)	21	0,07252	
MK-801 (0,15 mg/kg) x (0,20 mg x kg)	66	0,8872	

Prokazatelný rozdíl v lokomoci byl nalezen mezi skupinou, které byl aplikován fyziologický roztok a skupinou, které byla aplikována látka MK-801 v dávce 0,15 mg/kg.

U skupiny, které byla aplikována látka MK-801 v dávce 0,20 mg/kg nebyl nalezen prokazatelný rozdíl nejspíš z důvodu malého počtu zvířat ve skupině.

Následující graf (viz obr. 24) ukazuje učení zvířat během pětidenního tréninku.

Vliv látky MK-801 na učení



Obr. 24: Vliv MK-801 (v dávce 0,15; 0,20 mg/kg) na učení. Graf ukazuje učení zvířat v úloze AAPA během pětidenního tréninku - jednotlivá sezení viz osa x. Na ose y je znázorněn počet vstupů do zakázané oblasti (horní graf), max. čas vyhýbání se zakázanému sektoru (min)-(prostřední graf) a lokomoce zvířete (m/min)-(dolní graf).

7 Diskuse

Látka MK-801 je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů. Studie naznačují, že tato látka je vhodným nástrojem k modelování schizofrenii podobného chování ve všech jeho rovinách (Andiné et al., 1999; Bubeníková-Valešová et al., 2008; van der Staay et al., 2011). Kognitivní deficit je v současnosti považován za stěžejní symptom schizofrenního onemocnění (O'Carroll, 2000), v kterém by klíčovou roli mohl hrát proces kognitivní koordinace. Kognitivní koordinace se podílí na rozlišování mezi relevantními a irrelevantními podněty a tato schopnost je u pacientů se schizofrenií narušena (Phillips & Silverstein, 2003).

Užitečným nástrojem pro zkoumání procesu kognitivní koordinace se zdá být úloha aktivního vyhýbání se místu. Předpokládá se, že zvíře se v této úloze musí naučit rozlišovat mezi dvěma prostorovými rámci a rozlišovat tak mezi podstatnými a nepodstatnými okolními stimuly (Petrásek, 2009; Wesierska et al., 2005).

Cílem této práce bylo popsat behaviorální strategie potkanů v úloze aktivního vyhýbání se místu v behaviorální aparatuře bludišti karusel („Carousel maze“).

Testovali jsme vliv MK-801 po jednorázové aplikaci na vybavení (experiment 1) v dávce 0,15 mg/kg (exp.1a), 0,20 mg/kg (exp.1c), 0,30 mg/kg (exp.1b).

Dále jsme sledovali vliv MK-801 na učení při chronické aplikaci (experiment 2) v dávce 0,15 mg/kg (exp.2a) a 0,20 mg/kg (exp.2b).

V jednorázové aplikaci byl dále v dávce 0,15 mg/kg testován účinek MK-801 podle kontextu aplikace, která byla buď 30 minut před začátkem sezení, nebo v průběhu sezení po 15 minutách kdy už zvíře bylo konfrontováno s úlohou.

Během experimentů jsme identifikovali a při analýze dat potvrdili, že potkani při řešení úlohy aktivního vyhýbání se místu zaujali dvě zcela odlišné behaviorální strategie. Většina potkanů úlohu řešila aktivním vyhýbáním se zakázané oblasti (skupina „řešící“ viz obr. 12 a 15), ale někteří potkani na řešení této úlohy „rezignovali“ (skupina „nepohybující se“ viz obr. 12 a 15).

Tito „rezignující“ potkani zaujali během sezení nahrbenou pozici („freezing“) bez náznaku jakékoliv aktivity a jejich průměrná rychlost byla méně než 1 m/min. Jednorázová aplikace MK-801 působila na potkany s různou behaviorální strategií odlišně.

V experimentu 1a u potkanů, kteří se během tréninku naučili řešit úlohu vyhýbáním se zakázanému sektoru, aplikace MK-801 v dávce 0,15 mg/kg neměla buď žádný vliv na výkonost v úloze, nebo se potkani po aplikaci zhoršili.

Oproti tomu u potkanů, kteří na řešení úlohy „rezignovali“, tato aplikace buď také nevyvolala žádné změny projevující se na behaviorální úrovni, nebo naopak vedla ke zlepšení výkonosti potkanů aktivním vyhýbáním se zakázané oblasti. Tento efekt nepřetrval do druhého dne.

Tento fenomén „pozitivního“ účinku MK-801 byl pozorován u většiny ze skupiny „nepohybujících se“ („rezignujících“) potkanů a názorně je demonstrován na grafické reprezentaci dráhy (viz obr. 22) a na grafech (viz obr. 13 a 16).

Tento efekt si vysvětlujeme tím, že se u zvířat během tréninku mohl vytvořit stav naučené bezmocnosti, popsáný jako jeden z animálních modelů depresi podobného chování. Tento stav je pozorován u zvířat, která jsou vystavena averzivním stimulům nad nimiž nemají kontrolu a která pak upadají do stavu bezmoci a demotivace (Mayer & Seligman, 1976). Pozorované chování během experimentu by tomu i nasvědčovalo, neboť zvířata, která strávila více času v zakázané oblasti (pohybovala se v oblasti zakázaného sektoru bez jakékoliv zjevné únikové strategie), se postupem času zřejmě „naučila“, že je výhodnější v zakázané oblasti se aktivně nepohybovat a nechat se přes ni pasivně převést otáčením arény, protože tam tak stráví méně času. „Pozitivní“ účinek MK-801 by tak mohl být vysvětlen jako antidepresivní působení, což má oporu i v literatuře (Engin et al., 2009; Maj et al., 1992; Mantovani et al., 1999; Meloni et al., 1993; Papp & Moryl, 1994). To by mohlo souviset se stresovou reakcí na averzivní podněty během experimentu, která vedla k aktivaci HPA osy a k uvolnění glukokortikoidů. Glukokortikoidy působí prostřednictvím glukokortikoidních receptorů na glutamátergických neuronech. Následná signalizační kaskáda vede ke zvýšenému výlevu glutamátu v PFC a hipokampu, což ovlivňuje některé aspekty kognitivních procesů (Popoli et al., 2012). Nadměrný výlev glutamátu tak může vést k deficitu únikové reakce a inhibicí NMDA receptorů by se tomuto deficitu mohlo předejít (Hunter et al., 2003). Tento antidepresivní účinek má podporu i v z literatuře popisující molekulární úroveň, kdy se autoři domnívají, že antidepresiva působí vazbou dovnitř iontového kanálu NMDA receptoru a tak ovlivňují tok iontů tímto kanálem (Sills & Loo, 1989; White et al., 1990).

Zajímavé je, že zvířata se po aplikaci látky začala ve většině případů téměř okamžitě zakázané oblasti vyhýbat, což naznačuje, že zvířata sice znala polohu zakázaného sektoru, ale z nějakého důvodu se mu nevyhýbala.

To nemusí být ale v rozporu s modelem naučené bezmocnosti, neboť i zde mají zvířata možnost úniku přeskočením překážky a opět tato skutečnost poukazuje na souvislost naučené bezmocnosti s motivací, emocemi a kognicí (Mayer & Seligman, 1976).

Dalšími možnými faktory, proč někteří potkani zaujali strategii „nepohybujících se“ by mohl být vliv věku a delšího času stráveného v chovech. Skupina zvířat, kde se projevila tato „rezignující“ strategie u většího počtu jedinců strávila přibližně o 20 dní déle v chovech bez jakéhokoliv kognitivního tréninku či stimulace než další skupina zvířat která byla v experimentu jako první.

Dále je z tohoto experimentu patrné, že MK-801 ovlivňovala jednotlivá zvířata v různé míře. Různá „citlivost“ k MK-801 se projevila rovnoměrně v obou skupinách zvířat, kde druhá skupina byla o 14 dní starší než první. U některých zvířat došlo po aplikaci látky MK-801 v dávce 0,15 mg/kg k výraznému zvýšení lokomoce. S tím v některých případech korelovalo narušené chování, které vedlo až k úplné neschopnosti vyhýbat se zakázanému sektoru, zatímco u jiných zvířat nebyl pozorován žádný náznak zhoršení výkonu v úloze AAPA, což opět názorně demonstruje grafická reprezentace dráhy (viz obr. 21-22)

Rozdílná „citlivost“ k látce MK-801 byla pozorována i u nepohybujících se potkanů (viz obr. 13 a 16). U většiny zvířat však bylo pozorováno v různé míře stereotypní chování, projevující se neustálým čištěním a „oklepáváním se“.

Dalším z cílů experimentu 1a bylo sledování účinku MK-801 podle kontextu aplikace. Mk-801 byla aplikována buď 30 minut před začátkem sezení, nebo v průběhu sezení po 15 minutách, kdy už bylo zvíře na aréně a bylo konfrontováno s úlohou. Neprojevilo se však žádný efekt této aplikace v rozdílném kontextu.

Statistické vyhodnocení neprokázalo žádný signifikantní rozdíl mezi skupinou experimentální (které byla aplikována MK-801 v dávce 0,15 mg/kg) a kontrolní (které byl aplikován fyziologický roztok).

Signifikantní byl pouze rozdíl v lokomoci mezi kontrolní skupinou a skupinou ovlivněnou látkou MK-801 aplikovanou v průběhu sezení a mezi kontrolní skupinou a skupinou s látkou MK-801 aplikovanou 30 minut před začátkem sezení.

Při srovnání s dříve provedenou studií (Stuchlík & Valeš, 2005), jsou výsledky popisující kognitivní výkonnost zvířat ve shodě, ale v dřívější studii nebyla lokomoce v dávce 0,15 mg/kg signifikantně zvýšena. Dala, ale byla zpracována odlišným způsobem.

Ve studii Lobellova et al., 2013, byla dráha zvýšená už od dávky 0,8 mg/kg. V této studii byli ale potkani přeučováni na nový sektor, a tak lokomoce mohla být zvýšena například častým vstupováním do zakázané oblasti a častějším obdržetím averzivního podnětu.

V experimentu 1c jednorázová aplikace MK-801 v dávce 0,20 mg/kg nenarušila schopnost potkanů řešit úlohu AAPA, což je v rozporu s předchozí studií (Stuchlík & Valeš, 2005). Rozdíl v těchto studiích byl shledán v délce tréninku, v naší studii 5 dní oproti 4 dnům. Delší trénink může mít podstatný vliv, neboť jsme pozorovali, že ještě i pátý den se některá zvířata učí, čímž si mohou ještě více upevňovat informace z prostředí a řadit si je do koherentních reprezentací. Dále byl rozdíl v aplikaci látky, v naší studii došlo k aplikaci v průběhu sezení (po 15 min po začátku) oproti aplikaci 30 minut před sezením. Rozdíl byl opět ve zpracování dat v našem případě byla data přepočítaná na čas. jednotku, což by ale nemělo ovlivnit výsledek. Také byl nejspíše rozdíl v manipulaci se zvířaty před začátkem prvního tréninku. V dávce 0,20 mg/kg nebyla signifikantně zvýšena lokomoce oproti dávce 0,15 mg/kg v předchozím experimentu, což mohlo být způsobeno malým počtem jedinců ve skupině.

V experimentu 1b, kdy byla aplikována MK-801 v dávce 0,30 mg/kg se už prokázala schopnost látky MK-801 narušit chování zvířat a tak výkonnost potkanů v úloze AAPA. Zvířata úspěšně řešící úlohu AAPA vyhýbáním se zakázané oblasti se pod vlivem této látky signifikantně zhoršila ve všech měřených parametrech oproti kontrolní skupině (vzrostl počet vstupů/min; snížil se maximální čas vyhýbání a průměrná rychlost zvířat na aréně se zvýšila m/min) Dávka 0,30 mg/kg látky MK-801 tedy už prokazatelně ovlivnila chování u všech zvířat.

Dále je z experimentu 1 patrná doba nástupu účinku MK-801, který se projevuje na behaviorální úrovni, tento nástup se objevuje přibližně po 15 minutách. Názorně je demonstrován na grafické reprezentaci dráhy (viz obr. 20, 21, 22).

Nástup behaviorálních projevů odpovídá nástupu elektrofyziologických korelátů sledovaných v předchozí studii (Klement & Levčík, in prep.). V této studii byly pozorovány elektrofyziologické změny přibližně po 15 minutách od aplikace MK-801. Pozorována byla

dekorelace společného (vzájemného) pálení mezi hipokampálními buňkami a theta buňkami v rozmezí gama frekvence. Předpokládá se, že gama oscilace organizuje neuronální aktivitu, což by mohlo být neurofyziologickým mechanismem kognitivní koordinace (Uhlhaas et al., 2006).

V experimentu 1, kdy byla MK-801 aplikována v průběhu sezení po 15 minutách, byly sledovány dva různě dlouhé intervaly 15 min x 45 min (viz obr. 13). Statisticky byl hodnocen pouze druhý interval (45 min). Tento interval byl zvolen tak, aby se už mohl projevit účinek MK-801 a zároveň abychom zaznamenali co nejvíce změn v projevu chování. Data (počet vstupů a lokomoce) jsou vztažena na časovou jednotku. Je zřejmé, že delší doba ovlivní parametr maximální doby vyhýbání se zakázané oblasti (viz obr. 13), ale vycházeli jsme z toho, že v kratším intervalu, bychom nemuseli zaznamenat, některé změny chování, dále jsme předpokládali, že během těchto 45 minut se ještě neprojeví únava zvířat.

V experimentu 2 jsem sledovala vliv chronické aplikace MK-801 na učení potkanů v úloze aktivního vyhýbání se místu. Látka MK-801 byla aplikována vždy 30 minut před začátkem každého tréninku trvajících pět dní. Tento experiment byl proveden s dávkami 0,15 mg/kg (exp.2a) a 0,20 mg/kg (exp.2b).

V dávce 0,15 mg/kg byl zaznamenán signifikantní rozdíl v lokomoci oproti kontrolní skupině, avšak v ostatních parametrech rozdíl zaznamenán nebyl. V dávce 0,20 mg/kg nebyl nalezen také žádný rozdíl a to ani v lokomoci, což mohlo být opět způsobeno malým počtem zvířat ve skupině.

Z grafu (viz obr. 24) je vidět, že kontrolní skupina se učí lépe, ale signifikantní rozdíl zaznamenán nebyl. Tyto odlišné výsledky byly patrně způsobeny velkou variabilitou výkonosti zvířat v kontrolní skupině, ve které bylo mnoho zvířat s nestandardní výkoností.

Dalším faktorem, který jsme zvažovali, že mohl potenciálně ovlivnit výkon v úloze, byly pachové stopy na aréně. V počáteční fázi experimentu byla aréna očištěná a umytá mýdlovou vodou po každém jednotlivém sezení, takže se minimalizoval počet pachových značek a potenciálně se potkanům usnadnila možnost rozlišování referenčních rámců. V další fázi experimentu jsme pachové značky neodstraňovali. Navíc jsme do experimentální místnosti přidali více vizuálních podnětů, avšak ve výkonosti potkanů nebyl nalezen žádný rozdíl oproti potkanům, kterým byla aréna čištěna.

Dalším faktorem, který nemůžeme s jistotou porovnat s předchozími experimenty je manipulace zvířat před prvním tréninkem. Je možné, že celkové zacházení se zvířaty během habituace i během experimentu může mít velký vliv z hlediska stresových podnětů na následující výkonnost zvířat v úloze AAPA a účinnost testovaných látek. Stresové podněty vyvolávají uvolnění glukokortikoidů, které indukují změny v glutamátergní neurotransmisi v PFC a hipokampu, čímž tak mohou ovlivnit některé aspekty kognitivních procesů (Popoli et al., 2012), navíc mohou interferovat s látkou MK-801, která působí prostřednictvím glutamátergní signalizace (Kovacic & Samanathan, 2010).

Z hlediska příčiny schizofrenie se uvažuje, že stresující podněty mohou mít významný podíl na projev schizofrenního onemocnění a proto by měla být věnována pozornost stresujícím faktorům při modelování tohoto heterogenního onemocnění. (Corcoran et al., 2003; Phillips et al., 2006; Walker et al., 1997).

Zásadními poznatky získanými z prezentovaných experimentů je identifikace dvou disjunktních behaviorálních strategií v jedné behaviorální úloze a s tím související i opačný účinek látky MK-801 na potkany. Zdá se tak, že po aplikaci MK-801 bylo pozorováno u některých jedinců vyvolání schizofrenii podobné chování, zatímco u jiných jedinců se prokázal její možný antidepressivní účinek.

Dále pak jednorázová aplikace látky MK-801 v dávce 0,15 mg/kg vyvolala významnou variabilitu v chování u jednotlivých zvířat, zatímco dávka 0,30 mg/kg látky MK-801 byla schopna prokazatelně ovlivnit chování všech zvířat.

Tato skutečnost by případně mohla souviset i s motorickým ovlivněním jedince. Domníváme se, že určitá motorická aktivita (průměrná rychlost pohybu zvířete po aréně) koreluje s úspěšným řešením úlohy AAPA a že potkani nacházející se pod tímto kritériem (nepohybující se potkan), nebo nad tímto kritériem (potkan velmi citlivý na působení látky MK-801) nejsou schopni se úspěšně vyhybat zakázané oblasti v úloze AAPA. S tím by souvisel i „pozitivní“ vliv látky MK-801 na nepohybující se potkany, u kterých by tak byla zvýšena motorická aktivita a s tím související úspěšné řešení úlohy AAPA (viz obr. 23).

Domníváme se, že mezi vlivem MK-801, lokomocí a kognicí je určitá souvislost, přičemž vliv látky MK-801 je na dávce závislý a roli může hrát i případná „náchylnost“ zvířat k působení látky.

Dále tyto výsledky poukazují na skutečnost, že antagonisté NMDA receptorů mohou působit antidepressivně, ale u jiných jedinců mohou vyvolat schizofrenii podobné chování,

což jsme identifikovali na odlišném působení na potkany s odlišnými behaviorálními strategiemi

odlišných behaviorálních strategiích potkanů v úloze AAPA. Zdá se, že jak v depresivním onemocnění, tak ve schizofrenním onemocnění hraje zásadní roli tok iontů NMDA receptory. V souvislosti se schizofrenním onemocněním je tato skutečnost spojována s narušením procesu kognitivní koordinace (Phillips & Silverstein, 2003).

8 Závěr

V této studii jsem se zabývala behaviorálními strategiemi potkanů v úloze aktivního vyhýbání se místu (AAPA) prováděné v karusel bludišti („Carousel maze“). Dále jsem sledovala účinek látky MK-801 (dizocilpin) na tyto behaviorální strategie a na kognitivní schopnosti potkanů v úloze aktivního vyhýbání se místu. Testován byl vliv MK-801 v akutní aplikaci v dávkách 0,15; 0,20; 0,30 mg/kg na vybavení a v chronické aplikaci v dávkách 0,15 a 0,20 mg/kg na učení. Dále byl sledován vliv MK-801 v dávkách 0,15 mg/kg v odlišném kontextu aplikace, kdy byla aplikace provedena 30 minut před začátkem sezení, nebo 15 minut v průběhu sezení kdy je už potkan na aréně a je konfrontován s úlohou.

Během experimentů jsme pozorovali a následně jsme analýzou dat potvrdili, že v úloze aktivního vyhýbání se místu zaujala zvířata dvě zcela odlišné behaviorální strategie. Většina zvířat byla schopna se naučit řešit úlohu aktivním vyhýbáním se zakázanému sektoru, ale část zvířat na řešení této úlohy „rezignovala“ a zaujala nahrbenou pozici bez jakékoliv aktivity „freezing“.

Akutní aplikace MK-801 v dávkách 0,15 mg/kg působila odlišným způsobem na tyto rozdílné strategie zvířat. U zvířat, která úlohu AAPA řešila vyhýbáním se sektoru, neměla aplikace MK-801 žádný vliv, nebo způsobila zhoršení výkonnosti. Oproti tomu u zvířat, která na řešení úlohy „rezignovala“, aplikace buď také neměla vliv, nebo naopak výkonnost zvířat byla po aplikaci výrazně zlepšena a zvířata aktivně řešila úlohu vyhýbáním se zakázanému sektoru. Tento efekt ale nepřetrval do dalšího dne. Tento „pozitivní“ vliv MK-801 byl pozorován u většiny „nepohybujících se“ potkanů.

Dále bylo zjištěno, že jednotlivá zvířata jsou různě náchylná k působení MK-801. Akutní aplikace MK-801 v dávkách 0,15 mg/kg způsobila prokazatelný rozdíl pouze v lokomoci mezi experimentální a kontrolní skupinou. V akutní aplikaci v dávkách 0,20 mg/kg nebyl shledán signifikantní rozdíl v žádném z testovaných parametrů. Oproti tomu akutní aplikace v dávkách 0,30 mg/kg signifikantně ovlivnila chování zvířat ve všech měřených parametrech.

V dávkách 0,15 mg/kg nebyl žádný rozdíl ve výkonnosti zvířat podle kontextu aplikace MK-801.

V experimentech s akutní aplikací v průběhu sezení byl pozorován nástup účinku MK-801 projevující se na behaviorální úrovni po 15 minutách od aplikace, což odpovídá době nástupů elektrofyziologických korelátů v experimentu Klement & Levčík, in prep.

V další části experimentů jsem studovala vliv chronické aplikace MK-801 v dávce 0,15 a 0,20 mg/kg na učení. V experimentech byl pozorován signifikantní rozdíl pouze v lokomoci mezi experimentální skupinou ovlivněnou MK-801 v dávce 0,15 mg/kg a kontrolní skupinou.

Zásadním poznatkem získaným v těchto experimentech je, že při jedné behaviorální úloze zaujali potkani dvě zcela odlišné strategie chování a zároveň MK-801 působila odlišným způsobem na zvířata s těmito rozdílnými behaviorálními strategiemi.

Dále byla pozorována odlišná náchylnost jednotlivých zvířat k působení MK-801.

Prokázali jsme schopnost látky MK-801 ovlivnit negativně výkonnost zvířat v úloze AAPA a modelovat tak schizofrenii podobné chování, zároveň jsme však pozorovali antidepressivní účinky této látky na skupinu potkanů, u kterých se rozvinula naučená bezmocnost.

Je možné, že významnou roli hraje souvislost mezi vlivem MK-801, motorikou a kognicí.

Prezentované výsledky poukazují na roli glutamatergního systému ve schizofrenním a depresivním onemocnění, zejména prostřednictvím funkce NMDA receptoru. Studie dokládají, že antidepressiva se váží na podobné místo jako nekompetitivní antagonisté vyvolávající schizofrenii podobné chování - dovnitř iontového kanálu NMDA recepturu. Dochází tak k ovlivnění toku iontů kanálem, což může souviset jak s antidepressivními účinky (Sills & Loo, 1989; White et al., 1990), tak s ovlivněním procesu kognitivní koordinace, který je považován za narušený u pacientů trpících schizofrenií (Phillips & Silverstein, 2003).

Tyto dva možné odlišné výsledky působení takto účinkujících NMDA nekompetitivních antagonistů jsme demonstrovali prostřednictvím potkanů, kteří zaujali dvě zcela odlišné behaviorální strategie v úloze aktivního vyhýbaní se místu.

9 Seznam použité literatury

- Adler LE, Rose G, Freedman R. 1986. Neurophysiological studies of sensory gating in rats: effects of amphetamine, phencyclidine, and haloperidol. *Biol Psychiatry* 21(8-9):787-98.
- Ahlander M, Misane I, Schott PA, Ogren SO. 1999. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat. *Neuropsychopharmacology* 21:414-26.
- Andreasen NC, Rezai K, Alliger R, Swayze VW, 2nd, Flaum M, Kirchner P, Cohen G, O'Leary DS. 1992. Hypofrontality in neuroleptic-naive patients and in patients with chronic schizophrenia. Assessment with xenon 133 single-photon emission computed tomography and the Tower of London. *Arch Gen Psychiatry* 49(12):943-58.
- Angelucci F, Brene S, Mathe AA. 2005. BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* 10(4):345-52.
- Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RG. 1995. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 378(6553):182-6.
- Barkus C, McHugh SB, Sprengel R, Seeburg PH, Rawlins JN, Bannerman DM. 2010. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. *Eur J Pharmacol* 626(1):49-56.
- Bear MF. 2007. *Neuroscience: Exploring the Brain*. Lippincot Williams & Wilkins.
- Berman KF, Ostrem JL, Randolph C, Gold J, Goldberg TE, Coppola R, Carson RE, Herscovitch P, Weinberger DR. 1995. Physiological activation of a cortical network during performance of the Wisconsin Card Sorting Test: a positron emission tomography study. *Neuropsychologia* 33(8):1027-46.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47(4):351-4.
- Bliss TV, Lomo T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232(2):331-56.
- Bowie CR, Harvey PD. 2006. Cognitive deficits and functional outcome in schizophrenia. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2(4):531-6.
- Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L. 1978. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 15(4):339-43.
- Braff DL. 1993. Information processing and attention dysfunctions in schizophrenia. *Schizophr Bull* 19(2):233-59.

- de Bruin NM, Ellenbroek BA, Cools AR, Coenen AM, van Luijtelaar EL. 1999. Differential effects of ketamine on gating of auditory evoked potentials and prepulse inhibition in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 142(1):9-17.
- Bubenikova-Valesova V, Horacek J, Vrajova M, Hoschl C. 2008. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 32(5):1014-23.
- Cadenhead KS, Light GA, Geyer MA, Braff DL. 2000. Sensory gating deficits assessed by the P50 event-related potential in subjects with schizotypal personality disorder. *Am J Psychiatry* 157(1):55-9.
- Clementz BA, Geyer MA, Braff DL. 1997. P50 suppression among schizophrenia and normal comparison subjects: a methodological analysis. *Biol Psychiatry* 41(10):1035-44.
- Clementz BA, Geyer MA, Braff DL. 1998. Poor P50 suppression among schizophrenia patients and their first-degree biological relatives. *Am J Psychiatry* 155(12):1691-4.
- Contestabile A. 2000. Roles of NMDA receptor activity and nitric oxide production in brain development. *Brain Res Brain Res Rev* 32(2-3):476-509.
- Corcoran C, Walker E, Huot R, Mittal V, Tessner K, Kestler L, Malaspina D. 2003. The stress cascade and schizophrenia: etiology and onset. *Schizophr Bull* 29(4):671-92.
- Coyle JT, Tsai G, Goff D. 2003. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003:318-27.
- Davidson M, Reichenberg A, Rabinowitz J, Weiser M, Kaplan Z, Mark M. 1999. Behavioral and intellectual markers for schizophrenia in apparently healthy male adolescents. *Am J Psychiatry* 156(9):1328-35.
- Dally PJ. 1958. Indications for use of iproniazid in psychiatric practice. *Br Med J* 1: 1338-1339.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51(1):7-61.
- Duncan G, Miyamoto S, Gu H, Lieberman J, Koller B, Snouwaert J. 2002. Alterations in regional brain metabolism in genetic and pharmacological models of reduced NMDA receptor function. *Brain Res* 951:166-76.
- Duncan GE, Moy SS, Perez A, Eddy DM, Zinzow WM, Lieberman JA, Snouwaert JN, Koller BH. 2004. Deficits in sensorimotor gating and tests of social behavior in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Behav Brain Res* 153:507-19.
- Eisch AJ, Petrik D. 2012. Depression and hippocampal neurogenesis: a road to remission? *Science* 338(6103):72-5.
- El Hamaoui Y, Elyazaji M, Yaalaoui S, Rachidi L, Saoud M, d'Amato T, Moussaoui D, Dalery J, Battas O. 2006. Wiscosin card sorting task in patients with schizophrenia and their siblings. *Can J Psychiatry* 51(1):48-54.

- Engel AK, Fries P, Konig P, Brecht M, Singer W. 1999. Temporal binding, binocular rivalry, and consciousness. *Conscious Cogn* 8(2):128-51.
- Engel AK, Singer W. 2001. Temporal binding and the neural correlates of sensory awareness. *Trends Cogn Sci* 5(1):16-25.
- Engin E, Treit D, Dickson CT. 2009. Anxiolytic- and antidepressant-like properties of ketamine in behavioral and neurophysiological animal models. *Neuroscience* 161(2):359-69.
- Fanselow MS, Dong HW. 2010. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65(1):7-19.
- Freedman R, Adler LE, Gerhardt GA, Waldo M, Baker N, Rose GM, Drebing C, Nagamoto H, Bickford-Wimer P, Franks R. 1987. Neurobiological studies of sensory gating in schizophrenia. *Schizophr Bull* 13(4):669-78.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. 2001. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156(2-3):117-54.
- Geyer MA, Moghaddam B. 2002. *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress. Animal models relevant to schizophrenia disorders.* Edited by K. I. Davis, D. Charney, J. T. Coyle, Ch. Nemeroff. American College of Neuropsychopharmacology.
- Hashimoto K. 2009. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev* 61(2):105-23.
- Hashimoto K. 2011. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(7):1558-68.
- Hashimoto K, Fujita Y, Shimizu E, Iyo M. 2005. Phencyclidine-induced cognitive deficits in mice are improved by subsequent subchronic administration of clozapine, but not haloperidol. *Eur J Pharmacol* 519:114-7.
- Holmes AJ, MacDonald A, 3rd, Carter CS, Barch DM, Andrew Stenger V, Cohen JD. 2005. Prefrontal functioning during context processing in schizophrenia and major depression: an event-related fMRI study. *Schizophr Res* 76(2-3):199-206.
- Höschl C, Libiger J, Švestka J. 2004. *Psychiatrie. Druhé, doplněné a opravené vydání.* TIGIS.
- Hunter AM, Balleine BW, Minor TR. 2003. Helplessness and escape performance: glutamate-adenosine interactions in the frontal cortex. *Behav Neurosci* 117(1):123-35.
- Chen HS, Lipton SA. 2006. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists. *J Neurochem* 97(6):1611-26.
- Javitt DC, Zukin SR. 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148(10):1301-8.

- Judd LL, McAdams L, Budnick B, Braff DL. 1992. Sensory gating deficits in schizophrenia: new results. *Am J Psychiatry* 149(4):488-93.
- Keefe RS, Harvey PD. 2012. Cognitive impairment in schizophrenia. *Handb Exp Pharmacol* (213):11-37.
- Kochhar A, Zivin JA, Mazzarella V. 1991. Pharmacologic studies of the neuroprotective actions of a glutamate antagonist in ischemia. *J Neurotrauma* 8(3):175-86.
- Kovacic P, Somanathan R. 2010. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxid Med Cell Longev* 3(1):13-22.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS. 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51(3):199-214.
- Kubik S, Fenton AA. 2005. Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *J Neurosci* 25(40):9205-12.
- Kuperberg G, Heckers S. 2000. Schizophrenia and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 10(2):205-10.
- Lakhan SE, Caro M, Hadzimichalis N. 2013. NMDA Receptor Activity in Neuropsychiatric Disorders. *Front Psychiatry* 4:52.
- Laruelle M, Kegeles LS, Abi-Dargham A. 2003. Glutamate, dopamine, and schizophrenia: from pathophysiology to treatment. *Ann N Y Acad Sci* 1003:138-58.
- Light GA, Braff DL. 1999. Human and animal studies of schizophrenia-related gating deficits. *Curr Psychiatry Rep* 1(1):31-40.
- Lipska BK, Weinberger DR. 2000. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23(3):223-39.
- Lobelova V, Entlerova M, Svojanovska B, Hatalova H, Prokopova I, Petrasek T, Vales K, Kubik S, Fajnerova I, Stuchlik A. 2013. Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: a dose-response study. *Behav Brain Res* 246:55-62.
- Lynch MA. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84:87-136.
- MacDonald AW, 3rd, Carter CS, Kerns JG, Ursu S, Barch DM, Holmes AJ, Stenger VA, Cohen JD. 2005. Specificity of prefrontal dysfunction and context processing deficits to schizophrenia in never-medicated patients with first-episode psychosis. *Am J Psychiatry* 162(3):475-84.
- Maier SF, Seligman MEP. 1976. Learned helplessness: theory and evidence. *J Exp Psychol Gen* 105:3-46.

- Maj J, Rogoz Z, Skuza G, Sowinska H. 1992. Effects of MK-801 and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2(1):37-41.
- Malenka RC, Bear MF. 2004. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44(1):5-21.
- Malhotra AK, Pinals DA, Adler CM, Elman I, Clifton A, Pickar D, Breier A. 1997. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 17(3):141-50.
- Mantovani M, Matteucci AS, Rodrigues AL. 1999. Antidepressant-like effect of lead in adult mice. *Braz J Med Biol Res* 32(12):1555-60.
- Marcotte ER, Pearson DM, Srivastava LK. 2001. Animal models of schizophrenia: a critical review. *J Psychiatry Neurosci* 26(5):395-410.
- Meloni D, Gambarana C, De Montis MG, Dal Pra P, Taddei I, Tagliamonte A. 1993. Dizocilpine antagonizes the effect of chronic imipramine on learned helplessness in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 46(2):423-6.
- Miyake A, Friedman NP, Emerson MJ, Witzki AH, Howerter A, Wager TD. 2000. The unity and diversity of executive functions and their contributions to complex "Frontal Lobe" tasks: a latent variable analysis. *Cogn Psychol* 41(1):49-100.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297(5868):681-3.
- Musazzi L, Milanese M, Farisello P, Zappettini S, Tardito D, Barbiero VS, Bonifacino T, Mallei A, Baldelli P, Racagni G, Raiteri M, Benfenati F, Bonanno G, Popoli M. 2010. Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One* 5(1):e8566.
- Mysliveček J, Pretl M, Hrabovská A. 2009. *Základy neurověd. 2. vydání. TRITON.*
- Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL, Snigdha S, Rajagopal L, Harte MK. 2010. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Ther* 128(3):419-32.
- Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Olney JW. 1999. Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 20(2):106-18.
- O'Carroll R. 2000. Cognitive impairment in schizophrenia. *Advances in psychiatric treatment* 6:161-68.
- Ohno Y. 2011. Therapeutic role of 5-HT_{1A} receptors in the treatment of schizophrenia and Parkinson's disease. *CNS Neurosci Ther* 17(1):58-65.
- O'Keefe J., Nadel L., 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map.* Clarendon

- Olney JW, Labruyere J, Price MT. 1989. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* 244(4910):1360-2.
- Olypher AV, Klement D, Fenton AA. 2006. Cognitive disorganization in hippocampus: a physiological model of the disorganization in psychosis. *J Neurosci* 26(1):158-68.
- Paoletti P. 2011. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33(8):1351-65.
- Papp M, Moryl E. 1994. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol* 263(1-2):1-7.
- Petrásek T, Benkovičová K, Valeš K, Stuchlík A. 2009. Navigační úloha aktivního alotetického vyhýbání se místu (AAPA): užitečná metoda pro hodnocení prostorové kognice a chování laboratorních zvířat. *Psychiatrie* 13:195-200.
- Phillips LJ, McGorry PD, Garner B, Thompson KN, Pantelis C, Wood SJ, Berger G. 2006. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry* 40(9):725-41.
- Phillips WA, Silverstein SM. 2013. The coherent organization of mental life depends on mechanisms for context-sensitive gain-control that are impaired in schizophrenia. *Front Psychol* 4:307.
- Plháková A. 2005. Učebnice obecné psychologie. Academia.
- Popoli M, Yan Z, McEwen BS, Sanacora G. 2012. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci* 13(1):22-37.
- Reynolds IJ, Miller RJ. 1988. Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc. *Br J Pharmacol* 95(1):95-102.
- Rossi A, Daneluzzo E, Mattei P, Bustini M, Casacchia M, Stratta P. 1997. Wisconsin card sorting test and Stroop test performance in schizophrenia: a shared construct. *Neurosci Lett* 226(2):87-90.
- Salvadore G, Singh JB. 2013. Ketamine as a fast acting antidepressant: current knowledge and open questions. *CNS Neurosci Ther* 19(6):428-36.
- Scala S, Lasalvia A, Cristofalo D, Bonetto C, Ruggeri M. 2012. Neurocognitive profile and its association with psychopathology in first-degree relatives of patients with schizophrenia. A case-control study. *Psychiatry Res* 200(2-3):137-43.
- Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20(1):11-21.
- Seeman P. 1987. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1(2):133-52.
- Seligman MEP, Beagley G. 1975. Learned helplessness in the rat. *J Comp Physiol Psych* 88:534-41.
- Sheline YI. 2011. Depression and the hippocampus: cause or effect? *Biol Psychiatry* 70(4):308-9.

- Siegel C, Waldo M, Mizner G, Adler LE, Freedman R. 1984. Deficits in sensory gating in schizophrenic patients and their relatives. Evidence obtained with auditory evoked responses. *Arch Gen Psychiatry* 41(6):607-12.
- Sills MA, Loo PS. 1989. Tricyclic antidepressants and dextromethorphan bind with higher affinity to the phencyclidine receptor in the absence of magnesium and L-glutamate. *Mol Pharmacol* 36(1):160-5.
- Skolnick P, Popik P, Trullas R. 2009. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci* 30(11):563-9.
- Spencer KM, Nestor PG, Niznikiewicz MA, Salisbury DF, Shenton ME, McCarley RW. 2003. Abnormal neural synchrony in schizophrenia. *J Neurosci* 23(19):7407-11.
- van der Staay FJ, Rutten K, Erb C, Blokland A. 2011. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behav Brain Res* 220:215-29.
- Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. 2009. Effect of alpha(1)-adrenergic antagonist prazosin on behavioral alterations induced by MK-801 in a spatial memory task in Long-Evans rats. *Physiol Res* 58(5):733-40.
- Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S. 2004. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci Lett* 366(2):162-6.
- Stuchlik A, Vales K. 2005. 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):163-71.
- Tolman EC. 1948. Cognitive maps in rats and men. *Psychol Rev* 55(4):189-208.
- Uhlhaas PJ, Phillips WA, Mitchell G, Silverstein SM. 2006. Perceptual grouping in disorganized schizophrenia. *Psychiatry Res* 145(2-3):105-17.
- Vales K, Bubenikova-Valesova V, Klement D, Stuchlik A. 2006. 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):383-8.
- Vales K, Rambousek L, Holubova K, Svoboda J, Bubenikova-Valesova V, Chodounska H, Vyklicky L, Stuchlik A. 2012. 3alpha5beta-Pregnanolone glutamate, a use-dependent NMDA antagonist, reversed spatial learning deficit in an animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res* 235(1):82-8.
- Vales K, Svoboda J, Benkovicova K, Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A. 2010. The difference in effect of mGlu2/3 and mGlu5 receptor agonists on cognitive impairment induced by MK-801. *Eur J Pharmacol* 639(1-3):91-8.
- Vinar O. 2010. Proc pusobi antidepressiva – historie a kousek futurologie. *Medical Tribune* 6: B1,B5.
- Walker EF, Diforio D. 1997. Schizophrenia: a neural diathesis-stress model. *Psychol Rev* 104(4):667-85.

- Weiss JM, Glazer HI, Pohorecky LA, Brick J, Miller NE. 1975. Effects of chronic exposure to stressors on avoidance-escape behavior and on brain norepinephrine. *Psychosom Med* 37(6):522-34.
- Wesierska M, Dockery C, Fenton AA. 2005. Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J Neurosci* 25(9):2413-9.
- White G, Lovinger DM, Peoples RW, Weight FF. 1990. Inhibition of N-methyl-D-aspartate activated ion current by desmethylimipramine. *Brain Res* 537(1-2):337-9.
- Wobrock T, Ecker UK, Scherk H, Schneider-Axmann T, Falkai P, Gruber O. 2009. Cognitive impairment of executive function as a core symptom of schizophrenia. *World J Biol Psychiatry* 10:442-51.
- Yan HC, Cao X, Das M, Zhu XH, Gao TM. 2010. Behavioral animal models of depression. *Neurosci Bull* 26 (4): 327-337
- Zarate CA, Jr., Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK. 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63(8):856-64.
- Zemanova A, Stankova A, Lobellova V, Svoboda J, Vales K, Vlcek K, Kubik S, Fajnerova I, Stuchlik A. 2013. Visuospatial working memory is impaired in an animal model of schizophrenia induced by acute MK-801: an effect of pretraining. *Pharmacol Biochem Behav* 106:117-23.
- Zhou Q, Sheng M. 2013. NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacology (v tisku, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.030)*.
- Zink M, Vollmayr B, Gebicke-Haerter PJ, Henn FA. 2010. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology* 58(2):465-73.
- Zito K, Scheuss V. 2009. Glutamate: NMDA receptor function and physiological modulation. *The New Encyclopedia of Neuroscience*. Edited by L. Squire. Elsevier press.
- <http://neur2201.unsw.wikispaces.net/Aspartame+-+The+Sweet+Killer>