

**Univerzita Karlova v Praze**  
**3. lékařská fakulta**

Disertační práce

Praha, 2015

**MUDr. Anna Kubešová**

**Univerzita Karlova v Praze**

**3. lékařská fakulta**

**Disertační práce**

**Histomorfologický, biochemický a behaviorální profil  
animálních modelů schizofrenie**

**Histomorphological, biochemical and behavioral profile  
of animal models of schizophrenia**

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Horáček, Ph.D.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne

Anna Kubešová

**Identifikační záznam:**

KUBEŠOVÁ, Anna. *Histomorfologický, biochemický a behaviorální profil animálních modelů schizofrenie [Histomorphological, biochemical and behavioral profile of animal models of schizophrenia]*. Praha, 2015. Počet stran 109, počet příloh 3. Disertační práce. Univerzita Karova v Praze, 3. lékařská fakulta, Národní ústav duševního zdraví. Školitel Horáček, Jiří.

Klíčová slova: schizofrenie, animální modely, histomorfologie, biochemie, chování

Key words: schizophrenia, animal models, histomorphology, biochemistry, behavior

## **Poděkování:**

Mé poděkování patří všem, kteří se spolupodíleli na vytvoření této disertační práce. V první řadě děkuji prof. MUDr. Jiřímu Horáčkovi, Ph.D., mému školiteli, za cenné rady a odborné vedení po celou dobu mého doktorandského studia. Dále děkuji kolegům z Laboratoře biochemie a patofyziologie mozku, kde podstatná část této disertační práce vznikla, zejména RNDr. Daniele Řípové, CSc., vedoucí laboratoře, za vytvoření vhodných pracovních podmínek, a MUDr. Tomášovi Páleníčkovi, Ph.D., za uvedení do principů vědecké práce. Tato disertační práce by nevznikla bez podpory mé rodiny a mých přátel, proto i jim děkuji.

# OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
SOUHRN.....	11
SUMMARY.....	12
1 ÚVOD A FORMULACE CÍLŮ PRÁCE.....	13
2 SCHIZOFRENIE.....	16
2.1 Etiologie a psychopatologie.....	16
2.2 Histomorfologické změny u schizofrenie.....	17
2.2.1 Objemové změny mozkových struktur.....	17
2.2.2 Patologie hipokampu.....	18
2.2.3 Gliové buňky.....	19
2.3 Biochemické změny u schizofrenie.....	21
2.3.1 Neurotransmitery, jejich metabolity a receptory.....	21
2.3.2 Metabolity kynureninové dráhy.....	22
3 ANIMÁLNÍ MODELY SCHIZOFRENIE.....	25
3.1 Farmakologické modely.....	25
3.1.1 Dopaminový model.....	25
3.1.2 Glutamátový model.....	26
3.1.3 Serotoninový model.....	27
3.1.4 GABA model.....	28
3.2 Neurovývojové modely.....	28
3.2.1 Metylazoxymetanol acetát.....	29
3.2.2 Sociální izolace.....	29
3.2.3 Imunitní aktivace.....	30
3.3 Modely založené na mozkové lézi.....	30
3.4 Genetické modely.....	31
4 SPECIÁLNÍ ČÁST.....	32
4.1 Studie 1: Biochemický, histopatologický a morfologický profil animálního modelu časné imunitní stimulace - vztah k psychopatologii.....	32
4.1.1 Úvod a hypotézy studie 1.....	32
4.1.2 Metodika studie 1.....	34
4.1.3 Výsledky studie 1.....	37

4.1.4	Diskuze studie 1 .....	44
4.1.5	Závěr studie 1 .....	48
4.2	Studie 2: Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a sensorimotorické zpracování informací - animální model psychózy .....	50
4.2.1	Úvod a hypotézy studie 2 .....	50
4.2.2	Metodika studie 2 .....	51
4.2.3	Výsledky studie 2 .....	54
4.2.4	Diskuze studie 2 .....	57
4.2.5	Závěr studie 2 .....	58
4.3	Studie 3: Behaviorální, neurochemický a EEG profil psychedelické drogy 4-bromo-2,5-dimetoxyfenyletylaminu (2C-B) u potkana .....	59
4.3.1	Úvod a hypotézy studie 3 .....	59
4.3.2	Metodika studie 3 .....	60
4.3.3	Výsledky studie 3 .....	64
4.3.4	Diskuze studie 3 .....	78
4.3.5	Závěr studie 3 .....	80
5	SPOLEČNÁ DISKUZE A ZHODNOCENÍ CÍLŮ PRÁCE .....	82
6	SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA .....	85
	LITERATURA .....	87
	PŘÍLOHY .....	109

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2C-B	4-Bromo-2,5-dimetoxyfenyletylamin
3-HAA	3-Hydroxyanthralinic acid, 3-hydroxyantraliniková kyselina
3-OH-KYN	3-Hydroxykynurenin
3-MT	3-Metoxytyramin
5-HIAA	5-Hydroxyindoleacetic acid; kyselina 5-hydroxyindoloctová
5-HT	5-Hydroxytryptamin; serotonin/serotoninový receptor
AA	Anthralinic acid; antraliniková kyselina
ACTH	Adrenocorticotropic hormone; adrenokortikotropní hormon
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionát
ANOVA	Analysis of variance; analýza rozptylu
ASR	Acoustic startle reaction; akustická úleková reakce
BDNF	Brain derived neurotrophic factor; mozkový neurotrofický faktor
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
C	Centrální elektroda
CA	Cornu Ammonis; Amonův roh
CNP	2,3-Cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase
CNS	Centrální nervový systém
COMT	Catechol-O-methyl transferase; katechol-O-metyltransferáza
D	Dopaminový receptor
DA	Dopamin
DISC-1	Disrupted-in-schizophrenia 1
DOB	4-Bromo-2,5-dimetoxyamfetamin
DOI	4-Iodo-2,5-dimetoxyamfetamin



DOPAC	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid; dihydroxyfenyloctová kyselina
dsRNA	Double-stranded RNA; dvouvláknová RNA
DTNBP1	Dystobrevin-binding protein 1; dysbindin
EEG	Electroencephalography; elektroencefalografie
F	Frontální elektroda
FWE	Family wise error
GABA	$\gamma$ -Aminobutyric acid; kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GFAP	Glial fibrillary acidic protein; gliální fibrilární kyselý protein
GLU	Glutamát
GS	Glutamin syntetáza
HAAO	3-Hydroxyanthralinic acid oxidase; oxidáza kyseliny 3-hydroxyantralinikové
HEB	Hematoencefalická bariéra
HLA	Human leucocyte antigen; lidský leukocytární antigen
HVA	Homovanilic acid; kyselina homovanilová
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
IDO	Indol-2,3-dioxygenáza
IgG	Imunoglobulin G
IL	Interleukin
INF	Interferon
KAT	Kynurenin aminotransferáza
KMO	Kynurenin monooxygenáza
KYN	Kynurenin
KYNA	Kynurenic acid; kyselina kynureninová
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine; L-3,4-dihydroxyfenylalanin

LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry; kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie
LPS	Lipopolysacharid
LSD	Lysergic acid diethylamide; dietylamid kyseliny lysergové
MAG	Myelin-associated glycoprotein; glykoprotein asociovaný s myelinem
MAM	Methylazoxymethanol acetate; metylazoxymetanol acetát
MAO	Monoaminoxidáza
MBDB	1,3-Benzodioxolyl-N-metylbutanamin
MDMA	3,4-Metylendioxy-N-metylamfetamin; <i>Extáze</i>
MHC	Major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
MHPG	3-Metoxi-4-hydroxyphenylglycol; 3-metoxi-4-hydroxyfenylglykol
MKN-10	Mezinárodní klasifikace nemocí - 10.revize
MRI	Magnetic resonance imaging; magnetická rezonance
mRNA	Messenger ribonucleic acid; mediátorová ribonukleová kyselina
NAAG	N-acetylaspartylglutamát
NAc	Nucleus accumbens
NaCl	Natrium chloratum; chlorid sodný
NGF	Nerve growth factor; nervový růstový faktor
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid; N-metyl-D-aspartát
NO	Nitric oxide; oxid dusnatý
NRG1	Neuregulin 1
P	Parietální elektroda
PD	Postnatální den
PET	Pozitronová emisní tomografie
poly I:C	Polyinosinic-polycytidylic acid

PPI	Perpulse inhibition; prepulzní inhibice
qEEG	Quantitative electroencephalography; kvantitativní elektroencefalografie
QUIN	Quinolinic acid; kyselina chinolinová
RM	Repeated measures; opakovaná měření
SEM	Standard error of the mean; standardní chyba průměru
SN(pc)	Substantia nigra (pars compacta)
T	Temporální elektroda
TDO	Tryptofan-2,3-dioxygenáza
TGF	Transforming growth factor; transformující růstový faktor
TH	Tyrosin hydroxyláza
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF	Tumor necrosis factor; faktor nádorové nekrózy
TRP	Tryptofan
UK	Univerzita Karlova
VTA	Ventral tegmental area; ventrální tegmentální oblast
XA	Xanthurenic acid; xantureniková kyselina

## SOUHRN

Předkládaná práce se zabývá animálními modely schizofrenie. Obecná část je věnována popisu histomorfologických a biochemických změn u pacientů se schizofrenií a základnímu rozdělení a popisu animálních modelů schizofrenie. Ve speciální části jsou prezentovány výsledky 3 studií, které se zabývají histomorfologickými, biochemickými a behaviorálními odchylkami v neurovývojovém modelu schizofrenie a ve farmakologickém modelu schizofrenie navozeném podáním látek, které ovlivňují funkci serotonergního systému. Ve studii 1 jsme prokázali, že časná imunitní stimulace u potkanů v dospělosti vede ke změnám mozkových a plazmatických hladin neurotransmiterů a jejich metabolitů, k aktivaci kynureninové dráhy tryptofanového metabolismu, k hypertrofii astrocytů, snížení objemu hipokampu a poklesu tyrosinhydroxylázové imunoreaktivity v substantia nigra pars compacta. Nálezy této studie podporují hypotézu o významné patofyziologické úloze časné imunitní stimulace u schizofrenie a dalších neuropsychiatrických onemocněních. Ve studii 2 jsme verifikovali aplikaci tryptaminového (psilocin) a fenyletylaminového (mezkalin) halucinogenu jako fenomenologicky validní animální model schizofrenie. Podání testovaných látek vedlo k deficitu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce a k poškození funkční konektivity mozku měřené pomocí kvantitativního EEG. Tyto nálezy vykazují značnou podobnost s nálezy u nemocných schizofrenií. Ve studii 3 jsme v animálním modelu aplikací syntetické drogy 4-bromo-2,5-dimetoxyfenyletylaminu (2C-B) indukovali deficit prepulzní inhibice akustické úlekové reakce a časově a dávkově bifázické změny lokomoce, kdy hypolokomoce byla následována hyperlokomocí. Nízké dávky 2C-B snižovaly v EEG experimentech výkon i koherenci, vysoké dávky měly dočasný bifázický efekt s počátečním poklesem následovaným zvýšením výkonu - obdobný účinek byl pozorován i u koherence. Pomocí mikrodialýzy jsme v nucleus accumbens dále prokázali zvýšení hladin dopaminu a jeho metabolitů kyseliny homovanilové a 3-metoxytyraminu a naopak snížení hladiny kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové. Zvýšení EEG výkonů a koherencí bylo po aplikaci 2C-B časově spojeno se zvýšením lokomoční aktivity a dopaminových hladin v nucleus accumbens.

## SUMMARY

The presented work focuses on the animal models of schizophrenia. The general part is dedicated to describing histomorphological and biochemical changes in patients with schizophrenia and basic classification and description of animal models of schizophrenia. The results of 3 studies that deal with histomorphological, biochemical and behavioral abnormalities in the neurodevelopmental model of schizophrenia and in the pharmacological model of schizophrenia induced by the administration of substances that affect the serotonergic system are presented in the special part. In the study No. 1 we demonstrated that the early immune stimulation in rats leads in adulthood to changes in the brain and plasma levels of neurotransmitters and their metabolites, activation of kynurenine pathway of tryptophan metabolism, hypertrophy of astrocytes, reduction of hippocampal volume and decrease of tyrosinhydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta. The findings of this study support the hypothesis of an important pathophysiological role of the early immune stimulation in schizophrenia and other neuropsychiatric disorders. In the study No. 2 we verified the application of tryptamine (psilocin) and phenylethylamine (mescaline) hallucinogen as phenomenologically valid animal model of schizophrenia. Administration of the tested substances led to a deficit in the prepulse inhibition of the acoustic startle reaction and damage of the brain functional connectivity measured by quantitative EEG. These findings are very similar to the findings in patients with schizophrenia. In the study No. 3 the application of synthetic drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenylethylamine (2C-B) induced in animal model deficit in the prepulse inhibition of the acoustic startle reaction and time- and dose related biphasic changes in the locomotion when the hypolocomotion was followed by the hyperlocomotion. Low doses of 2C-B reduced the EEG power and coherence, high doses had a temporary biphasic effect with an initial decline followed by an increase in power – a similar effect was also observed in the coherence. Using the microdialysis we also demonstrated increased levels of dopamine and its metabolites homovanilic acid and 3-methoxytyramine and decreased levels of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in the nucleus accumbens. The increase in the EEG power and coherence was after the 2C-B application time associated with the increase in the locomotion and dopamine levels in the nucleus accumbens.

# 1 ÚVOD A FORMULACE CÍLŮ PRÁCE

Schizofrenie je závažné psychiatrické onemocnění, jehož původ není zcela objasněn. Předpokládá se, že svou roli v etiopatogenezi schizofrenie hrají genetické a negenetické faktory, které ovlivňují homeostázu organismu (Karl and Arnold 2014). Jednou ze základních metod, jak lze schizofrenii v rámci preklinického výzkumu studovat je použití animálních modelů. Animální modely schizofrenie zpravidla reprodukuje předpokládanou etiopatogenezi onemocnění nebo se snaží alespoň modelovat symptomy nemoci, což jsou v případě schizofrenie pozitivní, negativní, kognitivní a afektivní příznaky (Marcotte et al. 2001; Jones et al. 2011). Animální modely slouží zejména k objasnění neurobiologických podkladů onemocnění, ale lze je využít také k sledování progresu nemoci a testování potenciální léčby.

Z výše uvedených důvodů jsem si za téma své disertační práce zvolila „Histomorfologický, biochemický a behaviorální profil animálních modelů schizofrenie“. Předkládaná disertační práce je souborem tří původních vědeckých publikací týkajících se uvedeného tématu, na kterých jsem se autorsky podílela (Páleníček et al. 2011; Palenicek et al. 2013; Kubesova et al. 2015). S ohledem na klíčovou roli neuroplasticity jak v patofyziologii, tak v léčbě schizofrenie se pak k problematice tématicky váže rovněž můj přehledný článek zabývající se vlivem psychoaktivních látek na neurogenezi v dospělém hipokampu (Kubesova et al. 2012).

V průběhu svého studia jsem se odborně zaměřila na animální modely neuropsychiatrických poruch, zejména na modely schizofrenie. S tímto hlavním předmětem mého zájmu souvisí i výběr publikací do disertace. Prezentované publikace shrnují výsledky studijní práce zabývající se histomorfologickými, biochemickými a behaviorálními odchylkami v neurovývojovém modelu schizofrenie a ve farmakologickém modelu schizofrenie navozeném podáním látek, které ovlivňují funkci serotonergního systému. Dvě z prací zahrnují i výsledky z kvantitativní analýzy EEG. Speciální části předchází obecná část, ve které se zaměřuji na histomorfologické a biochemické změny u pacientů se schizofrenií, které se mohou vyskytovat i v animálních modelech a jsou proto předmětem méj práce, a na rozdělení a základní popis animálních modelů schizofrenie.

První studie se zabývá biochemickým, histopatologickým a morfoloogickým profilem v neurovývojovém animálním modelu schizofrenie navozeným časnou imunitní stimulací indukovanou podáním bakteriálního endotoxinu lipopolysacharidu (Kubesova et al. 2015). V této studii jsme hodnotili mozkové a plasmatické hladiny vybraných neurotransmiterů a jejich metabolitů a tryptofanu a jeho metabolitů z kynureninové katabolické dráhy. Kromě toho jsme se zaměřili na histologické a morfoloogické markery, které mají vztah k patogenezi mozkových onemocnění, včetně schizofrenie - aktivace gliových buněk, neurodegenerace, objemová redukce hipokampu a dopaminergní syntéza v substantia nigra. Druhá studie porovnává vliv tryptaminového halucinogenu psilocinu a fenyletylaminového halucinogenu mezkalinu na sensorimotorické zpracování informací měřené pomocí testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce a na funkční konektivitu mozku měřenou pomocí kvantitativního EEG (Páleníček et al. 2011). Oba hodnocené parametry jsou změněny u pacientů se schizofrenií i v animálních modelech (Ludewig et al. 2002; Boutros et al. 2008). Předmětem třetí studie bylo objasnit behaviorální, biochemický a EEG profil syntetického halucinogenu 4-bromo-2,5-dimetoxyfenyletylaminu (2C-B) (Palenicek et al. 2013). V této studii jsme hodnotili lokomoci v testu otevřeného pole, sensorimotorické zpracování informací v testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce, hladiny dopaminu a jeho metabolitů v nucleus accumbens a dále jsme provedli kvantitativní analýzu EEG. Jako referenční látka k porovnání výsledků byl v této studii vybrán amfetamin, který se používá v dopaminovém farmakologickém modelu schizofrenie (Marcotte et al. 2001; Jones et al. 2011).

### **Formulace cílů práce**

1. Objasnění vlivu časně imunitní stimulace na biochemické, histopatologické a morfologické změny v mozku dospělého potkana a jejich potenciální vztah k psychopatologii
2. Porovnání vlivu psilocinu a mezkalinu na funkční konektivitu mozku a sensorimotorické zpracování informací hodnocené pomocí metodiky prepulzní inhibice akustické úlekové reakce u dospělého potkana
3. Analýza vlivu 2C-B na lokomoci, prepulzní inhibici akustické úlekové reakce, hladiny dopaminu a jeho metabolitů v nucleus accumbens a funkční konektivitu mozku u dospělého potkana



## **2 SCHIZOFRENIE**

### **2.1 Etiologie a psychopatologie**

Schizofrenie je závažné duševní onemocnění, jehož celoživotní prevalence se v populaci pohybuje okolo 0,3-0,7% (McGrath et al. 2008; van Os and Kapur 2009). Etiologie schizofrenie není známá, nicméně epidemiologické a genetické studie popsaly některá rizika, která mohou souviset s tímto onemocněním. Na rozvoji schizofrenie se tak pravděpodobně podílejí genetické i negenetické vlivy (Karl and Arnold 2014).

Genetická hypotéza schizofrenie se opírá o výsledky studií rodokmenů, dvojčat a adoptovaných dětí, které ukázaly, že největší riziko nesou monozygotní dvojčata (> 40%) nemocných a to i v případě, že byla vychována v odlišném prostředí. Vyšší výskyt onemocnění se objevuje i u dizygotních dvojčat a dalších příbuzných (Moldin 1998). V tuto chvíli je identifikováno více než 100 kandidátních genů, které mohou mít vliv na vznik schizofrenie (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium 2014). Nicméně ani přes intenzivní výzkum stále nebylo objasněno genetické pozadí tohoto onemocnění.

Genetická vulnerabilita ke vzniku schizofrenie může být modifikována faktory zevního prostředí. Epigenetické mechanismy, zejména metylace deoxyribonukleové kyseliny a posttranslační modifikace histonů, nejsou v průběhu života stabilní a mohou být ovlivněny různými faktory (Popov et al. 2012). Ukazuje se, že časná poporodní infekce nebo pozdní infekce, zejména toxoplazmová, mohou vyvolávat imunitní dysbalanci, která může stát za rozvojem schizofrenie (Horacek et al. 2012; Holub et al. 2013). Byly replikovány také nálezy podporující souvislost mezi komplikacemi v těhotenství a v průběhu porodu u matky a výskytem schizofrenie u potomka. Mezi další faktory prostředí patří datum a místo narození, fyzický a psychický stres a zneužívání návykových látek (Schmitt et al. 2014).

Vzhledem k tomu, že elektroencefalografické ani žádné zobrazovací či laboratorní vyšetření v současnosti nedokáže spolehlivě diagnostikovat schizofrenii, je z hlediska diagnózy klíčové správné rozpoznání a popis symptomů, které můžeme rozdělit do čtyř skupin: pozitivní (ozvučování, vkládání a odnímání myšlenek, halucinace, bludy, dezorganizace řeči a chování, poruchy motoriky), negativní (afektivní oploštění, alogie, apatie, anhedonie, sociální stažení), kognitivní (poruchy

paměti, pozornosti a exekutivních funkcí) a afektivní (depresivní a manické symptomy) (Bankovská-Motlová and Spaniel 2011). Pro diagnózu schizofrenie podle MKN-10 je dále důležitá i délka trvání těchto symptomů a to alespoň jeden měsíc.

## **2.2 Histomorfologické změny u schizofrenie**

### **2.2.1 Objemové změny mozkových struktur**

Některé studie popisují celkové zmenšení objemu mozku, zejména u pacientů s první epizodou schizofrenie (Wright et al. 2000; Shepherd et al. 2012). Mezi nejčastěji popisované změny morfologie však patří zvětšení objemu postranních komor (Wright et al. 2000; Vita et al. 2006). Tento znak je připisován objemovému úbytku šedé a bílé hmoty okolních mozkových struktur, kdy ke zvětšení komor dochází z toho důvodu, aby se tzv. „vyplnil“ nitrolebeční prostor (Horga et al. 2011).

Dobrym morfologickým korelátem onemocnění se zdá být redukce objemu hipokampu, která byla demonstrována jak u první epizody, tak u chronických pacientů (Shenton et al. 2010; Shepherd et al. 2012; Adriano et al. 2012). Snížení objemu pravého i levého hipokampu je znakem pravidelně nacházeným v in vivo MRI studiích schizofrenie, ale také dalších neuropsychiatrických onemocněních. Meta-analýza 44 MRI studií ukázala effect size tohoto znaku jako střední a to bez rozdílu mezi pacienty s první epizodou a chronickými pacienty (Adriano et al. 2012). Pacienti se schizofrenií mají zmenšený objem všech hipokampálních částí s výjimkou fimbrie v porovnání se zdravými kontrolami, čímž se liší například od pacientů s bipolární poruchou, kde chybí výrazné snížení objemu subikula a presubikula (Haukvik et al. 2014).

Mezi další objemové změny patří snížení objemu mozkové kůry zejména ve frontálních a temporálních oblastech mozku (Shenton et al. 2010). Zdá se, že tato objemová změna je vyvolaná ztenčením mozkové kůry a zároveň zmenšením její plochy (Rimol et al. 2012). Podkladem tohoto znaku je pravděpodobně úbytek neuropilu, tj. nervových vláken, synapsí a výběžků gliových buněk (Selemon et al. 1995). Redukce korové tloušťky probíhá v čase a koreluje s poškozením kognitivních funkcí u pacientů (Andreasen et al. 2011). Kromě objemových změn postihují mozkovou kůru pacientů se schizofrenií také změny gyrifikace (Falkai et al. 2007; White and Hilgetag 2011). Tato skutečnost nahrává hypotéze, podle které je

schizofrenie neurovývojové onemocnění vzhledem k tomu, že k tvorbě mozkových závitů dochází v prenatálním období (White et al. 2010).

Zobrazovací metody ukázaly, že u schizofrenie dochází také k morfologickým změnám podkorových struktur. Popsané je zvětšení objemu bazálních ganglií, zřetelné hlavně v případě globus pallidus (Rimol et al. 2010; Haukvik et al. 2010; Hartberg et al. 2011), a zmenšení objemu thalamu (Smith et al. 2011). Vzhledem k bohatému zásobení bazálních ganglií dopaminergními vlákny, je obtížné u pacientů dlouhodobě léčených antidopaminergními antipsychotiky interpretovat morfologické změny této struktury (Scherk and Falkai 2006). V případě thalamu se předpokládá, že se zmenšení této struktury odráží v její funkci, což by se pravděpodobně projevilo jako poškození toku informací mezi různými částmi mozku (Andreasen et al. 1998).

### **2.2.2 Patologie hipokampu**

Hipokampus je částí limbického systému, která hraje mimo jiné důležitou úlohu v učení a paměti (Myslivečková and Rokyta 2000). Morfologické změny hipokampu se mohou odrážet na jeho funkci a být tak podkladem kognitivního poškození, které je jedním ze znaků schizofrenie (Small et al. 2011).

Hipokampus se nachází ve střední čáře temporálního laloku a anatomicky se skládá z cornu Ammonis (CA 1-3), gyrus dentatus a subikula (Petrovický 2008). Oblasti hipokampu jsou navzájem spojeny v jednosměrném okruhu začínajícím v granulárních neuronech gyrus dentatus, které dostávají vstup z entorhinálního kortexu. Prostřednictvím mechových vláken se informace šíří k pyramidovým neuronům CA3 a dále Shafferovými kolaterálami k CA1 a subikulu, odkud informace pokračuje do entorhinálního kortexu a dalších částí mozku (Small et al. 2011). Hipokampus, konkrétně subgranulární zóna gyrus dentatus, je jedna ze dvou oblastí, ve kterých probíhá neurogeneze v průběhu celého života (Cameron and Gould 1994; Eriksson et al. 1998). Neurogeneze spočívá v proliferaci progenitorových buněk, diferenciaci v neurony, jejich migraci a integraci do nervových okruhů (Kempermann et al. 2004).

Důvodem objemových změn hipokampu mohou být abnormality neurogeneze, které jsou nacházeny v post mortem studiích u pacientů se schizofrenií (Reif et al. 2006; Toro and Deakin 2007). Jedním z genů, který reguluje míru neurogeneze a

neuroplasticity je DISC-1 (Zhao et al. 2006). Tento gen je zároveň kandidátním genem schizofrenie a je asociován s poškozením paměti, halucinacemi a úbytkem šedé hmoty v hipokampu a prefrontálních oblastech (Le Strat et al. 2009). Jeho mRNA je vysoce exprimovaná v granulární vrstvě gyrus dentatus hipokampu i v dospělosti (Austin et al. 2004; Schurov et al. 2004) a jeho dysfunkce má spojitost s nadměrnou akcelerací neurogeneze (Duan et al. 2007).

Podle jedné z hypotéz abnormální vývoj imunitního systému vede k dlouhodobému zvýšení hladin cytokinů v mozku schizofrenních pacientů (Monji et al. 2009), což může být dalším mechanismem ovlivňujícím neurogenezi. Dlouhodobé zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů v mozku vede k úbytku progenitorových buněk a potlačení proliferace v gyrus dentatus (Monje et al. 2003; Cacci et al. 2005; Koo and Duman 2008).

Mezi další post mortem nálezy v hipokampu pacientů se schizofrenií patří zmenšení těl pyramidových neuronů (Harrison 2004), redukce hustoty somatostatin-pozitivních neuronů v presubikulu (Wang et al. 2011), redukce hustoty dendritických trnů (Kolomeets et al. 2007) a redukce počtu a hustoty interneuronů (Konradi et al. 2011).

### **2.2.3 Gliové buňky**

Moderní zobrazovací metody stejně jako post mortem morfologické studie odhalily široké spektrum abnormalit bílé hmoty ve spojitosti s onemocněním schizofrenií (Walterfang et al. 2011; Whitford et al. 2011). Předpokládá se, že porucha neurální konektivity, která je jedním z kandidátních mechanismů pro vysvětlení patofyziologie schizofrenie, je způsobena abnormalitami oligodendrocytů, které vedou k narušení myelinizace a integrity bílé hmoty (Davis et al. 2003). Kromě patologie oligodendrocytů, se nově hovoří také o patologii dalších gliových buněk - astrocytů a mikroglíí (Bernstein et al. 2014).

Oligodendrocyty obklopují v CNS axony neuronů a vytvářejí na nich myelinové pochvy. Opakované nálezy ukazují spojitost schizofrenie se snížením počtu oligodendrocytů, poškozením jejich prostorové distribuce a s odchylkami jejich morfologie (Uranova et al. 2001; Hof et al. 2002; Hof et al. 2003; Uranova et al. 2004;

Kerns et al. 2010). Tyto změny nejsou ohraničené pouze na bílou hmotu, ale vyskytují se také v různých oblastech šedé hmoty, např. ve III. vrstvě mozkové kůry a hipokampu (Hof et al. 2003; Schmitt et al. 2009). Redukce hustoty oligodendrocytů dosahuje v některých oblastech mozku až 30% (Uranova et al. 2007). Kromě toho u schizofrenie chybí věkem podmíněné zvýšení počtu oligodendrocytů, které se vyskytuje ve zdravě stárnoucí populaci (Vostrikov and Uranova 2011). Ultrastrukturální studie odhalily zvýšení denzity nukleárního heterochromatinu, dystrofie, nekrózy a apoptózy a také otoky periaxonálních výběžků (Uranova et al. 2001; Uranova et al. 2007; Uranova et al. 2011). Histologické studie ukázaly redukcii barvení myelinu v mozcích schizofrenních pacientů (Regenold et al. 2007). Dochází také k malformaci lamel myelinové pochvy ve frontálním kortexu a v kaudátu (Uranova et al. 2001; Uranova et al. 2004; Uranova et al. 2011). Ve spojitosti se schizofrenií se uvažuje i o změnách chemické kompozice myelinu (Haroutunian and Davis 2007). V předním cingulu bylo detekováno snížené množství mRNA transkriptů pro geny asociované s myelinizací: myelin-associated glycoprotein (MAG), transferrin, quaking 1 a 2,3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase (CNP) (McCullumsmith et al. 2007). Zdá se, že snížená exprese MAG, CNP, fosfolipidů a myelinového bazického proteinu se vyskytuje v mozku schizofrenních pacientů generalizovaně (Bernstein et al. 2014). Nicméně existují hypotézy, které připisují některé z výše popsaných změn dlouhodobé léčbě antipsychotiky u chronických pacientů (Bernstein et al. 2014).

Astrocyty jsou nejpočetnější buňkou v savčím mozku, která plní mnoho zásadních funkcí. Dřívější výzkumy ukazovaly na astrogliózu jako na průvodní jev schizofrenie. Zvýšená denzita astrocytů byla popsána v různých oblastech kůry, v hipokampu a v periakveduktální šedi (Stevens 1982; Stevens et al. 1988; Casanova et al. 1990). Novější výzkumy však prokázaly naopak úbytek astrocytů spojený se schizofrenií, který je nejpatrnější v bílé hmotě (Webster et al. 2005; Williams et al. 2013). Vzhledem k tomu, že astrocyty exprimují dopaminové receptory, může být jejich úbytek spojen s dlouhodobou antipsychotickou léčbou (Hertz et al. 1984).

Mikroglie jsou nejmenší gliové buňky, které mají schopnost fagocytózy a účastní se různých imunitních dějů v nervové soustavě. Imunitní hypotéze schizofrenie, která toto onemocnění dává do souvislosti s abnormální funkcí imunitního systému (Bechter et al. 2010; Bechter 2013), nahrávají znaky mikrogliaální aktivity u pacientů se

schizofrenií. Zvýšená exprese HLA-DR, které patří mezi MHC-II geny, byla pozorována v post mortem studiích v hipokampu, prefrontálním a temporálním kortexu a předním cingulu (Bayer et al. 1999; Radewicz et al. 2000). Důležitou informací o fázi onemocnění podávají in vivo PET studie využívající [<sup>11</sup>C]-PK11195 jako ligand, který se váže na mitochondriální translokační protein, jenž je zvýšeně exprimován v aktivovaných mikroglíích a astrocytech (Cosenza-Nashat et al. 2009). Výrazné zvýšení vazby ligandu bylo pozorováno v hipokampu během akutní fáze onemocnění, avšak nikoliv během remise, kdy byla zjištěna zvýšená vazba ligandu v šedé hmotě v celém mozku (Doorduyn et al. 2009; van Berckel et al. 2008). Mikrogliaální aktivace má pravděpodobně spojitost s akutní fází onemocnění, při které převládají pozitivní symptomy (Busse et al. 2012), a někdy bývá asociována i se suicidalitou (Steiner et al. 2006). Nicméně některé výzkumy popisují i mikrogliaální degeneraci ve frontálním a temporálním laloku u pacientů s chronickou schizofrenií (Wierzba-Bobrowicz et al. 2004).

## **2.3 Biochemické změny u schizofrenie**

### **2.3.1 Neurotransmitery, jejich metabolity a receptory**

Poškození neurotransmise je podle některých hypotéz podkladem onemocnění schizofrenií. Původní hypotéza schizofrenie se opírala především o abnormální aktivitu dopaminergního systému (Seeman 1987; Dworkin and Opler 1992), nicméně bylo prokázáno, že u tohoto onemocnění dochází ke změnám i v dalších monoaminergních systémech a ke změnám systému glutamatergním a GABAergním (Carlsson et al. 2001). Tyto změny se mohou následně odrážet do biochemického složení tělesných tekutin a být detekovány in vivo u pacientů se schizofrenií. Dle post-mortem nálezů dochází v mozku pacientů také ke změnám v expresi některých receptorů (Harrison 2000).

Zvýšené plasmatické hladiny hlavního dopaminového metabolitu kyseliny homovanilové (HVA) jsou korelovány s negativními symptomy, zejména s anhedonií (Zhang et al. 2001) a méně i s pozitivními symptomy (Kim et al. 2000). Podobně jsou s negativními a někdy i s pozitivními symptomy korelovány hladiny 3-metoxy-4-hydroxyfenylglykolu (MHPG), což je metabolit noradrenalinu (Pickar et al. 1990; Maas

et al. 1993). U schizofrenních pacientů bylo dále popsáno zvýšení hladin serotoninu a jeho metabolitu kyseliny 5-hydroxyindoloctové (5-HIAA) (Oades et al. 2002; Muck-Seler et al. 2004), které může být odrazem hostility (Markianos et al. 1992) a impulsivity (Dursun et al. 2000). Hladiny glutamátu byly v různých studiích popsány jako zvýšené (Tortorella et al. 2001; van der Heijden et al. 2004), snížené (Palomino et al. 2007) nebo i beze změny (Altamura et al. 1993), stejně tak nejsou konzistentní ani nálezy změn hladin kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné (GABA) (Petty and Sherman 1984; Petty et al. 1999; Arrue et al. 2010). Podle jedné studie dochází u schizofenie ke zvýšení poměru GABA/glutamát, které je normalizováno podáváním risperidonu (Cai et al. 2010).

V post-mortem mozkové tkáni pacientů byla zjištěna zvýšená exprese dopaminového D<sub>2</sub> receptoru (Seeman and Niznik 1990; Seeman and Kapur 2000) a změny v expresi dopaminových D<sub>1</sub>, D<sub>3</sub> a D<sub>4</sub> receptorů (Harrison 1999). Ve frontálním kortexu pacientů bez předchozí medikace dochází ke snížení exprese serotoninového 5-HT<sub>2A</sub> receptoru a zvýšení denzity 5-HT<sub>1A</sub> receptoru (Harrison 1999; Harrison 2000). V prefrontálním kortexu a hipokampu bylo zjištěno zvýšení hladin N-acetylaspartylglutamátu (NAAG), což je neuropeptid, který antagonizuje účinek glutamátu na NMDA receptorech, a snížení aktivity specifické peptidázy, která přeměňuje NAAG na glutamát a N-acetylaspartát (Tsai et al. 1995). Dále byla popsána redukce exprese AMPA a kainátových receptorů v hipokampu (Harrison et al. 1991) a změna exprese podjednotek NMDA receptoru v prefrontálním kortexu (Akbarian et al. 1996). GABAerní systém je postižen změnami exprese receptorů v hipokampu a frontálním kortexu (Benes 1993; Akbarian et al. 1995; Benes 1999), ztrátou nebo snížením aktivity GABAerních neuronů (Benes 1993; Volk et al. 2000) a úbytkem GABAerních presynaptických zakončení (Woo et al. 1998).

### **2.3.2 Metabolity kynureninové dráhy**

U schizofrenních pacientů byly popsány změny v metabolismu esenciální aminokyseliny tryptofanu. Tryptofan je výchozí látkou syntézy řady neuroaktivních látek - jedná se zejména o neurotransmitter serotonin, melatonin a metabolity

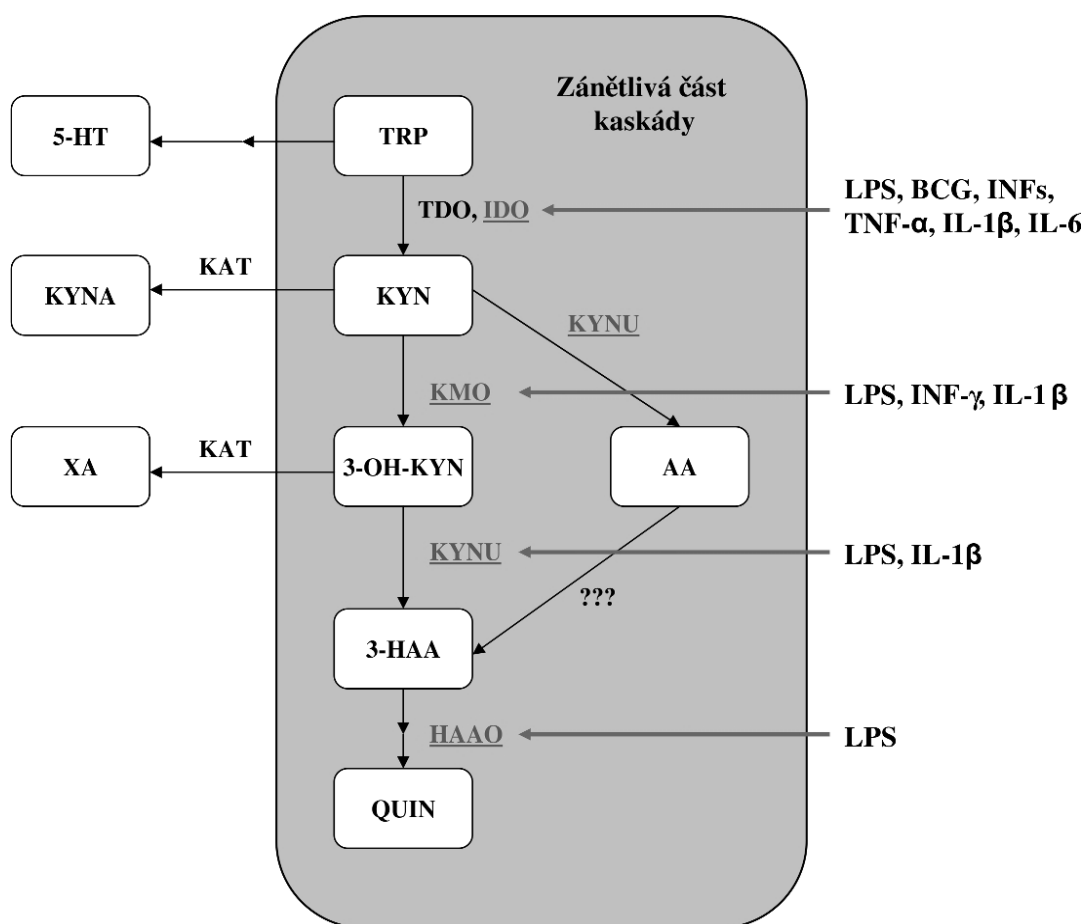
kynureninu (KYN), jako jsou kyselina kynureninová (KYNA), 3-hydroxykynurenin (3-OH-KYN) a kyselina chinolinová (QUIN).

Enzymy kynureninové metabolické dráhy se nacházejí v periferních tkáních i centrálně (Heyes et al. 1993; Heyes et al. 1997). Prvními a limitujícími enzymy kynureninové dráhy jsou indolamin-2,3-dioxygenáza (IDO) a v menší míře tryptofan-2,3-dioxygenáza (TDO), které konvertují tryptofan na N-formylkynurenin (Shimizu et al. 1978; Takikawa et al. 1988). Metabolická dráha se rozděluje na dvě větve po konverzi N-formylkynureninu na KYN. Kynurenin monooxygenáza (KMO) aktivuje tzv. zánětlivou / neurotoxickou část kynureninové kaskády, jejímiž produkty jsou mimo jiné 3-OH-KYN a QUIN. 3-OH-KYN má spojitost s oxidativním stresem a indukuje apoptózu (Chiarugi et al. 2001; Colin-Gonzalez et al. 2013). QUIN je excitotoxická látka, která působí jako agonista glutamátového NMDA receptoru a indukuje nekrózu (Chiarugi et al. 2001; Guillemin 2012). IDO, KMO a další enzymy zánětlivé části kaskády jsou stimulovány prozánětlivými cytokiny (Campbell et al. 2014). Na druhou stranu kynurenin aminotransferáza I-IV (KAT I-IV) aktivuje tzv. nezápětlivou / neuroprotektivní část kaskády, mezi jejíž produkty patří KYNA, která je antagonistou glutamátového NMDA receptoru (Campbell et al. 2014). *Obrázek č.1*

Zvýšená koncentrace KYNA byla detekována v post-mortem tkáni pacientů se schizofrenií v Brodmannově aree 9 (Schwarcz et al. 2001) a v předním cingulu (Miller et al. 2006). Stejně tak byly naměřeny zvýšené hladiny KYNA (Nilsson et al. 2005) a KYN (Linderholm et al. 2012) v mozkomíšním moku pacientů. V plasmě bylo navíc kromě zvýšení KYNA popsáno i zvýšení QUIN (Ravikumar et al. 2000a). V kontrastu s předchozími nálezy byl naopak v nedávné studii v plasmě nemedikovaných pacientů zjištěn pokles hladin KYNA a vzestup 3-OH-KYN, který byl upraven šestitýdenní antipsychotickou farmakoterapií (Myint et al. 2011).



Obrázek č.1 Schématické znázornění kynureninové metabolické dráhy (Campbell et al. 2014). **TRP**, tryptofan; **KYN**, kynurenin; **3-OH-KYN**, 3-hydroxykynurenin; **3-HAA**, 3-hydroxyanthraliniková kyselina; **QUIN**, kyselina chinolinová; **5-HT**, serotonin; **KYNA**, kyselina kynureninová; **XA**, kyselina xanthureniková; **AA**, kyselina anthraliniková; **LPS**, lipopolysacharid; **BCG**, bacillus Calmette-Guerin; **IFN**, interferon; **TNF**, tumor necrosis faktor; **IL**, interleukin; **IDO**, indolamin-2,3-dioxygenáza; **TDO**, tryptofan-2,3-dioxygenáza; **KMO**, kynurenin monooxygenáza; **KAT**, kynurenin aminotransferáza; **KYNU**, kynurenináza; **HAAO**, oxidáza kyseliny 3-hydroxyanthralinikové



### **3 ANIMÁLNÍ MODELY SCHIZOFRENIE**

Využívání animálních modelů neuropsychiatrických onemocnění je jednou ze základních metod preklinického výzkumu. Tato metoda mimo jiné umožňuje výzkum neurobiologických podkladů onemocnění, sledování progresu nemoci a testování nových terapeutických postupů.

Ideální animální model by měl splňovat požadavky na validitu (platnost, pravdivost), tedy schopnost reprodukovat skutečný stav. Rozlišujeme validitu konstruktivní, fenomenologickou a prediktivní. Konstruktivní validita vypovídá o schopnosti modelu reprodukovat předpokládanou etiopatogenezi nemoci - tedy genetické, neurochemické a strukturální změny. Fenomenologická validita se zabývá schopností modelu reprodukovat symptomy nemoci. Prediktivní validita předpovídá budoucí stav, tedy například zda bude účinnost metody stejná v animálním modelu jako u lidí (Jones et al. 2011).

V animálních modelech schizofrenie, které využívají jako modelová zvířata hlodavce, byly popsány behaviorální změny napodobující některé klinické symptomy schizofrenie u lidí. Patří sem zvýšená lokomoční aktivita a stereotypní pohyby napodobující pozitivní příznaky schizofrenie a dále redukce sociálního kontaktu a deficit v testech prepulzní inhibice úlekové reakce a prostorové paměti, což je považováno za model negativních a kognitivních příznaků schizofrenie (Lipska and Weinberger 2000; Bubenikova-Valesova et al. 2008; Jones et al. 2011).

Byla navržena řada animálních modelů schizofrenie, které můžeme rozdělit do 4 základních skupin: 1) farmakologické modely, 2) neurovývojové modely, 3) modely založené na mozkové lézi a 4) genetické modely (Carpenter and Koenig 2008; Jones et al. 2011). V dalším textu jsou tyto modely dále rozděleny a podrobně popsány.

#### **3.1 Farmakologické modely**

##### ***3.1.1 Dopaminový model***

Podle starší hypotézy motivované především efektem antipsychotik je schizofrenie vyvolána dysfunkcí dopaminergní neuromodulace - konkrétně hyperaktivitou mesolimbických dopaminergních neuronů, která má vztah k pozitivním

příznakům (Seeman 1987), a frontálním hypodopaminerním stavem, který je možným podkladem negativních příznaků (Dworkin and Opler 1992). U pacientů se schizofrenií bylo zjištěno zvýšení denzity D<sub>2</sub> receptorů ve striatu (nucleus caudatus a putamen) in vivo i v post mortem studiích (Seeman and Niznik 1990; Seeman and Kapur 2000) a zároveň bylo potvrzeno, že míra D<sub>2</sub> antagonismu antipsychotik koreluje s jejich klinickou účinností (Creese et al. 1976; Seeman and Kapur 2000). Amfetamin a jemu podobné substance, které zvyšují extracelulární koncentraci dopaminu, vyvolávají psychotické symptomy u zdravých jedinců (Angrist et al. 1970; Angrist and Gershon 1970) a vedou k akutní exacerbaci onemocnění u stabilizovaných pacientů (Lieberman et al. 1987; Lieberman et al. 1994).

V animálních studiích akutní podání amfetaminu a dalších psychostimulancií vyvolává hyperlokomoci, stereotypní chování a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce (Kokkinidis and Anisman 1980; Swerdlow and Geyer 1998). Tyto behaviorální změny, jsou upraveny podáním antipsychotik (Pijnenburg et al. 1975; Swerdlow et al. 1994). Chronické podávání amfetaminu u potkanů vyvolává dlouhotrvající senzitivizaci, která vede k nadměrné odpovědi na akutní podání téže látky (Featherstone et al. 2008). Předchozí podání antipsychotika pak tuto senzitivizaci potlačuje (Meng et al. 1998). V tomto modelu nicméně nedochází k deficitu v sociální interakci (Sams-Dodd 1995) a kognitivní poškození je omezeno pouze na úkoly zprostředkované prefrontální kůrou a nikoli hipokampem (Fletcher et al. 2005; Featherstone et al. 2008).

### **3.1.2 *Glutamátový model***

Nekompetitivní antagonisté NMDA receptoru, například fencyklidin nebo ketamin, vyvolávají jak pozitivní, tak negativní příznaky u zdravých dobrovolníků (Krystal et al. 1994; Bubenikova-Valesova et al. 2008) a exacerbují psychotickou symptomatiku u stabilizovaných schizofrenních pacientů (Javitt and Zukin 1991; Bubenikova-Valesova et al. 2008). Kromě toho dlouhodobé rekreační užívání fencyklidinu vede k poškození kognitivních funkcí, které však odeznívá po vysazení této látky (Cosgrove and Newell 1991). Předpokládá se, že poškozená glutamátergní neurotransmise a porucha funkce NMDA receptoru jsou podkladem zejména negativních a kognitivních příznaků schizofrenie (Marcotte et al. 2001).

V animálním modelu zapřičiňuje akutní aplikace fencyklidinu nebo dizocilpinu hyperlokomoci (Kalinichev et al. 2008), sociální stažení (Sams-Dodd 1995; Rung et al. 2005), kognitivní poškození (Egerton et al. 2005) a deficit prepulzní inhibice úlekové reakce (Mansbach and Geyer 1989). Subchronické nebo chronické podávání NMDA antagonistů vede k mírné hyperlokomoci (Eyjolfsson et al. 2006), lokomoční senzitivizaci (McLean et al. 2010), redukci sociální interakce (Sams-Dodd 1998), vyvolání symptomů podobných depresi (Noda et al. 1995) a poškození kognitivních funkcí (Jones et al. 2011). Většina těchto příznaků je potlačena podáním typických či atypických antipsychotik (Sams-Dodd 1998; Jones et al. 2011). Subchronické a chronické podávání NMDA antagonistů je někdy považováno za lepší model schizofrenie, vzhledem k tomu, že u dlouhodobých uživatelů fencyklidinu byl pomocí SPECT prokázán deficit v temporálním a frontálním laloku, který je srovnatelný s morfologickými změnami u pacientů se schizofrenií (Hertzmänn et al. 1990; Jones et al. 2011).

### **3.1.3 Serotoninový model**

Narušení serotonergního systému je další z uvažovaných příčin vzniku schizofrenie. Podkladem pro serotoninovou hypotézu schizofrenie je zdokumentovaný úbytek serotoninových 5-HT<sub>2A</sub> receptorů spolu se zvýšením počtu 5-HT<sub>1A</sub> receptorů v prefrontálním kortexu, který doprovází toto onemocnění (Burnet et al. 1996; Burnet et al. 1997). V kontrastu s tímto nálezem je skutečnost, že některá atypická antipsychotika fungují jako antagonisté 5-HT<sub>2A</sub> receptoru (Seeman 2002) a halucinogenní účinek psychedelických látek ze skupin tryptaminů (psilocin, LSD) a fenyletylaminů (mezkalin, 2C-B) je pravděpodobně vyvolán agonismem 5-HT<sub>2A</sub> receptorů (Aghajanian and Marek 2000). Někteří autoři se pokouší vysvětlit tento paradox interakcí mezi serotonergním a dopaminergním systémem, které se vzájemně ovlivňují na úrovni ventrálního tegmentu, substantia nigra a mediálního a dorsálního rapheálního jádra. Této interakce se pravděpodobně zúčastňují různé serotoninové a dopaminové receptory, nejdůležitější jsou však 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> a D<sub>2</sub> (Meltzer and Roth 1995).

Stejně jako v dopaminovém a glutamátovém modelu, tak i v serotoninovém modelu dochází k deficitu prepulzní inhibice úlekové reakce (Geyer and Braff 1987),

který je pravděpodobně vyvolán přímou stimulací 5-HT<sub>2A</sub> receptoru (Geyer 1998). Na druhou stranu opakované podávání halucinogenu LSD vyvolává behaviorální toleranci, což modelu schizofrenie založeném na agonismu 5-HT<sub>2A</sub> receptoru neodpovídá (Braff and Geyer 1980; Marcotte et al. 2001).

### **3.1.4 GABA model**

Posledním farmakologickým modelem je blokáda GABA-A receptoru. Tento model byl vytvořen na základě in vivo a post mortem nálezů změn v GABAergním systému u pacientů se schizofrenií (Harrison 2000; Wassef et al. 2003). V animálních studiích vyvolává aplikace nekompetitivního antagonisty GABA-A receptoru picrotoxinu do mediálního prefrontálního kortexu deficit prepulzní inhibice úlekové reakce, který je potlačen předchozí aplikací haloperidolu (Japha and Koch 1999).

GABA model je zároveň podpořen nálezy ze studie, které prokázala, že podání benzodiazepinů normalizuje změny vyvolané aplikací ketaminu v testu sociální interakce (Becker and Grecksch 2004). Benzodiazepiny působí jako pozitivní allosterické modulátory GABA-A receptoru tím, že zvyšují propustnost pro chloridové ionty při navázání GABA na receptor (Rudolph and Mohler 2006). Díky svým sedativním účinkům jsou využívány ke zklidnění akutně agitovaných pacientů se schizofrenií, avšak nepůsobí na pozitivní ani negativní příznaky schizofrenie (Dold et al. 2012).

## **3.2 Neurovývojové modely**

Epidemiologická data naznačují určitou spojitost mezi negativními faktory zevního prostředí v průběhu prenatálního a postnatálního období a vznikem schizofrenie v dospělosti (Lewis and Levitt 2002; Schmitt et al. 2014). Na základě těchto dat bylo vytvořeno několik neurovývojových modelů, které spočívají ve vyvolání ireversibilních morfologických změn ve vývoji CNS. Výhodou těchto modelů je jejich snadná kombinace s farmakologickými nebo genetickými modely (Jones et al. 2011).

### **3.2.1 *Metylazoxymetanol acetát***

Mezi nejčastější neurovývojové modely schizofrenie patří aplikace metylazoxymetanol acetátu (MAM) březím samicím (Jones et al. 2011). MAM je antimitotické a antiproliferativní agens, které metyluje DNA (Matsumoto and Higa 1966) a v době svého podání eliminuje mitoticky aktivní neuroblasty v CNS, aniž by ovlivňovalo vývoj gliových buněk nebo periferních orgánů (Cattabeni and DiLuca 1997). Tato látka vyvolává redukci objemu neokortikálních a limbických struktur, zvyšuje neuronální denzitu v perirhinálním kortexu, selektivně snižuje počet neuronů v CA2 oblasti hipokampu a také parvalbumin pozitivních gabaergních interneuronů v gyrus dentatus pokud je aplikována 17. gestační den (Jones et al. 2011). Časnější aplikace MAM vede k příliš výrazným morfologickým změnám CNS, které již neodpovídají nálezům u schizofrenie (Cattabeni et al. 1989). Kromě morfologických změn dochází v modelu i k redukci hladin NGF a BDNF v parietálním kortexu (Fiore et al. 2004). Prenatální expozice MAM 17. gestační den vede u potomků ke zvýšení spontánní aktivity v novém prostředí (Le Pen et al. 2006), zvýšení lokomoční odpovědi na podání amfetaminu (Moore et al. 2006) a dizocilpinu (Le Pen et al. 2006) a k deficitu prepulzní inhibice úlekové reakce (Moore et al. 2006). Bohužel výsledky kognitivních testů jsou v MAM modelu méně konzistentní (Jones et al. 2011).

### **3.2.2 *Sociální izolace***

Sociální deprivace mláďat hlodavců těsně po odstavení vyvolává v dospělosti zvířat behaviorální změny, které připomínají některé příznaky schizofrenie a lze je souhrnně označit jako tzv. izolační syndrom (Jones et al. 2011). Mezi tyto příznaky patří spontánní lokomoční hyperaktivita, deficit prepulzní inhibice úlekové reakce (Heidbreder et al. 2000), neofobie, agresivita (Fone and Porkess 2008), kognitivní deficit (Marsden et al. 2011) a úzkostné chování (Weiss et al. 2004). Deficit prepulzní inhibice úlekové reakce je zde upraven podáním atypických antipsychotik, hyperaktivita je potlačena také podáním haloperidolu (Jones et al. 2011). V tomto modelu dochází i k morfologickým změnám mozku připomínajícím schizofrenii jako je snížení objemu prefrontálního kortexu (Schubert et al. 2009) a redukce počtu parvalbumin pozitivních gabaergních interneuronů v hipokampu (Harte et al. 2007) a prefrontálně (Bloomfield et

al. 2008). Nevýhodou modelu sociální izolace je, že behaviorální změny mohou být relativně snadno zvráceny opakovaným handlingem (například z důvodu přenášení hlodavce během čištění podestýlky, kdy dochází k přivyknutí zvířete na fyzický kontakt s člověkem), nebo častým testováním v průběhu vývoje (Jones et al. 2011).

### **3.2.3 Imunitní aktivace**

Maternální expozice infekčním agens v průběhu těhotenství zvyšuje hladinu cirkulujících prozánětlivých cytokinů a dalších mediátorů zánětu a ovlivňuje tak vývoj nervového systému, což následně u potomka zvyšuje riziko výskytu některých neuropsychiatrických onemocnění včetně schizofrenie (Brown 2011). V animálním modelu se tento stav simuluje podáním bakteriálního endotoxinu LPS nebo syntetického analogu dsRNA poly I:C buď v průběhu gestace, nebo v časném postnatálním období (Jones et al. 2011). Také v tomto modelu dochází k behaviorálním změnám připomínajícím schizofrenii, jako jsou zvýšená hyperlokomoce indukovaná amfetaminem (Fortier et al. 2004), metamfetaminem (Ozawa et al. 2006) a dizocilpinem (Zuckerman and Weiner 2005), deficit prepulzní inhibice úlekové reakce (Shi et al. 2003), který je upraven podáním haloperidolu (Romero et al. 2007), redukované sociální chování a příznaky anhedonie (Bitanhirwe et al. 2010).

## **3.3 Modely založené na mozkové lézi**

In vivo zobrazovací metody i post mortem studie odhalily řadu morfologických změn v mozcích pacientů se schizofrenií (Harrison 2000; Haukvik et al. 2013). Tyto změny mohou být v animálních modelech uměle vytvořeny například pomocí injekce excitotoxické látky, aspirací nebo elektrolyticky (Marcotte et al. 2001). Léze v oblasti prefrontálního kortexu, ventrálního hipokampu, thalamu a mozkových komor způsobují u hlodavců schizofrenii podobný behaviorální fenotyp (Marcotte et al. 2001).

Neonatální lézi ventrálního hipokampu způsobenou injekcí excitotoxinu lze zároveň považovat za neurovývojový model schizofrenie (Jones et al. 2011). Behaviorální abnormality se u zvířete v tomto modelu objevují postupně v průběhu dospívání nejprve jako poškození prostorového učení a pracovní paměti (Chambers et

al. 1996), deficit sociální interakce a zvýšená agresivita (Sams-Dodd et al. 1997). Nakonec dochází i k hyperlokomoci v odpovědi na stres (Lipska et al. 1993), zvýšené senzitivitě na dopaminergní agonisty (Lipska and Weinberger 1993) a NMDA antagonisty (Al-Amin et al. 2000) a k deficitu prepulzní inhibice úlekové reakce (Le Pen et al. 2000).

### 3.4 Genetické modely

K vytvoření genetických modelů schizofrenie se využívají metody genetického inženýrství, mezi které patří potlačení funkce (knock-down) nebo inaktivace (knock-out) vybraného genu, nebo naopak inserce sekvence DNA do specifické pozice na chromozomu (knock-in). Většina genetických modelů schizofrenie napodobuje změny mRNA a proteinů, které se vyskytují u tohoto onemocnění (Jones et al. 2011), proto mají kandidátní geny schizofrenie nejčastěji vztah k neuronální plasticitě, synaptogenezi a funkci dopaminergního a glutamatergního systému (Harrison and Weinberger 2005).

Mezi nejznámější genetické modely schizofrenie patří mutace genu kódujícího synaptický protein disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1), který hraje důležitou úlohu v pre- a postnatálním vývoji neuronů. Tento protein je aktivní zejména během synaptogeneze, neuronální migrace a synaptické plasticity (Jaaro-Peled 2009). Dalším kandidátním genem je neuregulin-1 (NRG1) kódující pleiotropní růstový faktor, který ovlivňuje vývoj a funkci nervového systému, zejména excitační a inhibiční neurotransmisi, synaptogenezi, neuronální migraci, myelinizaci, gliogenezi a interakci mezi neuronem a glií (Harrison and Law 2006; Mei and Xiong 2008). Schizofrenie je častěji spojena také s mutací genu dystobrevin-binding protein 1 (DTNBP1) (Williams et al. 2005), který kóduje synaptický protein dysbindin, jenž je zapojen do excitační synaptické neurotransmise (Karlsgodt et al 2011). V animálních modelech se dále využívá mutace genu pro protein reelin, který má vztah k neuronální plasticitě a jehož množství je signifikantně sníženo v mozečku, hipokampu a frontálním kortexu pacientů se schizofrenií (Cassidy et al. 2010). Také v genetických animálních modelech dochází k morfologickým a behaviorálním změnám, které napodobují schizofrenii (Jones et al. 2011).



## **4 SPECIÁLNÍ ČÁST**

### **4.1 Studie 1: Biochemický, histopatologický a morfologický profil animálního modelu časně imunitní stimulace - vztah k psychopatologii**

**Kubešová, A.,** Tejkalová, H., Syslová, K., Kačer, P., Voundroušová, J., Tylš, F., Fujáková, M., Páleníček, T., Horáček, J. Biochemical, Histopathological and Morphological Profiling of a Rat Model of Early Immune Stimulation: Relation to Psychopathology. PLoS ONE 2015; 10(1): e0115439.

#### ***4.1.1 Úvod a hypotézy studie 1***

Negativní vlivy prostředí v průběhu intrauterinního a časněho postnatálního období zvyšují riziko rozvoje neuropsychiatrických onemocnění v dospělosti (Schmitt et al. 2014). V posledních letech se pozornost odborníků zaměřila na časnou imunitní stimulaci vyvolanou maternální nebo perinatální infekcí. Časná bakteriální imunitní stimulace byla v různých modelech indukovaná podáním endotoxinu lipopolysacharidu (LPS) (Wang et al. 2006), který je součástí vnější membrány Gram-negativních bakterií a má schopnost navodit imunitní odpověď (Spencer et al. 2011). LPS je rozeznáván tzv. Toll-like receptorem 4 (TLR4), který je exprimován v centrálním nervovém systému zejména na mikrogliích a v menším množství i na dalších buňkách (Lehnardt et al. 2002; Jack et al. 2005; Rolls et al. 2007). Aktivace TLR4 spouští kaskádu kroků, která následně zvyšuje hladiny prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů (Spencer et al. 2011). Imunitní aktivace v časném postnatálním období vede k trvalé imunitní dysregulaci a k poškození osy hypothalamus-hypofýza-nadledviny (Shanks et al. 1995; Shanks et al. 2000).

Časná imunitní stimulace může být jedním z faktorů vnějšího prostředí, které jsou predisponujícím podkladem k rozvoji schizofrenie (Potvin et al. 2008). V našich předchozích experimentech postnatální aplikace LPS vyvolávala u dospělého potkana schizofrenii podobné chování a zároveň zvyšovala hladiny cirkulujících cytokinů (Tejkalová et al. 2007; Tejkalová et al. 2008; Tejkalová et al. 2010). Schizofrenii

podobné chování, stejně jako chování napodobující úzkost, autismus a depresi u dospělých zvířat po perinatální aplikaci LPS bylo popsáno i ve studiích dalších autorů (Kirsten et al. 2012; Sominsky et al. 2012; Sominsky et al. 2013; Doosti et al. 2013; Zhu et al. 2014).

Přestože spojitost perinatální imunitní aktivace s rozvojem řady neuropsychiatrických onemocnění byla již zdokumentována, o jejím vlivu na biochemické procesy v dospělém mozku je známo jen velmi málo. Histopatologické změny, které mohou být podkladem některých abnormalit v chování, byly sice zkoumány v různých studiích, avšak jejich nálezy byly protichůdné (Bilbo and Schwarz 2009; Fan et al. 2011b; Cai et al. 2013; Smith et al. 2014).

Naše studie si kladla za cíl objasnit vliv časně imunitní stimulace na biochemické a histopatologické změny v mozku dospělého potkana a jejich potenciální vztah k lidské psychopatologii. S ohledem na úlohu hlavních neurotransmiterových systémů v patologii afektivních a psychotických onemocnění jsme se rozhodli stanovit hladiny monoaminů (dopamin, serotonin) a jejich metabolitů a také hladiny hlavního excitačního a inhibičního neurotransmiteru (glutamát, kys.  $\gamma$ -aminomáselná) v mozku. Dále jsme zjišťovali hladiny tryptofanu a metabolitů kynureninové dráhy tryptofanového metabolismu, jejíž enzymy jsou ovlivňovány prozánětlivými cytokiny a jejíž aktivace byla popsána ve spojitosti s řadou neuropsychiatrických onemocnění (Campbell et al. 2014). Vzhledem k tomu, že některé z neurotransmiterů a metabolitů nepřestupují přes hematoencefalickou bariéru (HEB), avšak u lidí je jejich hladina určována z krve, rozhodli jsme se stanovit jejich hladiny také v plasmě. Dalším cílem naší práce byla detekce histopatologických markerů, jejichž změny mohou mít spojitost s patogenezí mozkových onemocnění, jako jsou mikroglie, astrocyty, markery neurodegenerace a markery buněčných jader. Abychom mohli posoudit vliv časně imunitní stimulace na morfologii mozku, hodnotili jsme objem hipokampu. Redukce objemu této struktury je pravidelně popisovaná u pacientů s psychiatrickým onemocněním (Laakso et al. 1996; Bremner et al. 2000; Brambilla et al. 2008; Woon et al. 2010; Haukvik et al. 2013). Naši hypotézu o poškození dopaminergní aktivity jsme doplnili o zhodnocení tyrosinhydroxylázové (TH) imunoreaktivity v substantia nigra (SN) s cílem objasnit interakci mezi hladinami dopaminu a počtem dopaminergních buněk.

### Hypotézy:

1. Časná imunitní stimulace vyvolává v animálním modelu změny mozkových a plasmatických hladin neurotransmiterů a jejich metabolitů.
2. Časná imunitní stimulace vyvolává v animálním modelu aktivaci kynureninové cesty metabolismu tryptofanu.
3. Časná imunitní stimulace vede v animálním modelu k prodloužené aktivaci gliových buněk a k neurodegeneraci.
4. Časná imunitní stimulace způsobuje v animálním modelu v dospělosti objemové změny hipokampu.
5. Časná imunitní stimulace způsobuje v animálním modelu změny v dopaminergní syntéze.

#### **4.1.2 Metodika studie 1**

V experimentu byli použiti potkaní samci kmene Wistar (Velaz s.r.o., ČR). Potkaní mláďata byla umístěna v plastových chovných boxech se svou matkou až do 28. postnatálního dne (PD) a poté byla rozdělena po 3-4 zvířatech. Potkani byli ustájeni ve zvěřinci s regulovanou teplotou, pravidelným dvanáctihodinovým cyklem světlo/tma a neomezeným přístupem k vodě a potravě. Experimenty byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty a při 3. lékařské fakultě UK a Psychiatrickém centru Praha a byly provedeny v souladu s platnou legislativou na ochranu zvířat proti týrání.

PD 5-9 byla potkaní mláďata každý den krátce vyndána z boxu, zvážena a následně jim byl intraperitoneálně aplikován 2 mg/kg/den LPS (*Escherichia coli*, sérotyp 026:B6; Sigma-Aldrich) nebo stejný objem 0,9% NaCl.

PD 90-95 byli dospělí potkani (n=19-24/skupina) dekapitováni. Jejich mozková tkáň (striatum, hipokampus a prefrontální kortex) a plasma byly okamžitě až do dalšího zpracování zmraženy (-80°C). Dopamin (DA), kyselina homovanilová (HVA), 3-metoxytyramin (3-MT), kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (DOPAC), serotonin (5-HT), kyselina 5-hydroxyindoloctová (5-HIAA), glutamát (GLU), kyselina

$\gamma$ -aminomáselná (GABA), tryptofan (TRP), kynurenin (KYN), kyselina kynureninová (KYNA), 3-hydroxykynurenin (3-OH-KYN) a kyselina chinolinová (QUIN) byly v tkáni a plasmě měřeny pomocí kapalinové chromatografie kombinované s elektrosprejovou ionizací-hmotnostní spektrometrie. Tato metoda je detailně popsána zde (Najmanova et al. 2011).

PD 93-97 byli potkani (n=8/skupina) zváženi, uspáni isofluranovou anestézií a transkardiálně perfundováni Ringerovým roztokem a 4% paraformaldehydem v Ringerově roztoku. Mozky byly vyjmuty, fixovány přes noc ve 4% paraformaldehydu a po kryoprotekci v 30% sacharóze nakrájeny na kryostatu na tloušťku řezu 40 $\mu$ m. Řezy byly až do dalšího zpracování skladovány v kryoprotektivním roztoku v -40°C.

Tkáňové řezy byly obarveny 0,1% Toluidinovou modří (Nisslovo barvení; Sigma-Aldrich). Ke zjištění objemu hipokampu jsme použili světelný mikroskop (Olympus BX51) a Cavalieriho princip v programu Stereo Investigator (MBF Bioscience). Analyzován byl každý 6. řez od začátku hipokampu až do konce oblasti CA3 (tj. 1,7 mm až 6,1 mm posteriorně od bregmy dle stereotaktického atlasu mozku potkana) (Paxinos and Watson 2007).

Rozsah neurodegenerace jsme zjišťovali pomocí markeru neurodegenerace Fluoro-Jade B (Millipore/Merck) a markeru buněčných jader Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) ve fluorescenčním mikroskopu (Zeiss Axio Imager Z1).

Aktivace gliových buněk a počet dopaminergních buněk v SN byly zjišťovány imunohistochemicky. Řezy byly inkubovány přes noc při 4°C v následujících primárních protilátkách: polyklonální rabbit anti-Iba1 1:3000 (Wako Pure Chemical Industries) jako marker mikroglíí upregulovaný při jejich aktivaci, polyklonální rabbit anti-GFAP 1:5000 (DAKO Denmark A/S) jako marker astrocytů a polyklonální rabbit anti-TH 1:2000 (Millipore/Merck KGaA) jako marker dopaminergní tvorby. Primární protilátky byly rozpoznány biotinylovanou sekundární protilátkou goat anti-rabbit IgG 1:300 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), která byla detekována pomocí Avidin-Peroxidázového kitu (Vectastain Elite kit standart, Vector Laboratories, Inc.). Imunoreakce byla vizualizovaná pomocí 3,3'-diaminobenzidinu (Millipore/Merck KGaA). Negativní kontroly byly zpracovány s vynecháním primární protilátky.

Kvantifikace Iba1 a GFAP imunoreaktivita byla provedena z mikroskopických fotografií pořízených pomocí světelného mikroskopu (Zeiss Axio Imager Z1). V experimentu jsme se zaměřili na dvě oblasti: hipokampus, který byl zároveň předmětem volumetrické studie, a substantia nigra, kde byly kvantifikovány TH pozitivní buňky. U každého potkana byly vyfoceny 3 náhodně vybrané oblasti v obou strukturách v různých řezech (rozlišení 40x). Fotografie byly pořízeny ve stejný den při stejné intenzitě světla. Pomocí programu ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) bylo ve fotografiích vypočítáno procento oblasti obsahující imunoreaktivitu. Výsledky byly následně zprůměrovány pro každé zvíře a oblast a použity pro statistickou analýzu.

Kvantifikace TH pozitivních buněk v substantia nigra pars compacta (SNpc) byla provedena s použitím světelného mikroskopu (Olympus BX51) a optického frakcionátoru v programu Stereo Investigator (MBF Bioscience). SNpc byla ohraničena při nízkém rozlišení (2x) a následně byl při vysokém rozlišení (60x) analyzován každý 6. řez od začátku do konce SNpc. K výpočtu byly použity následující proměnné: sampling grid 200x200 $\mu\text{m}$ , counting frame 75x75 $\mu\text{m}$ , disector height 8 $\mu\text{m}$  a guard zone 2 $\mu\text{m}$ .

Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu Statistica v.9.0 (Statsoft). Hladiny neurotransmiterů a metabolitů byly analyzovány pomocí dvouvýběrového T-testu. Na základě Bonferroniho korekce byla hladina významnosti stanovena jako  $p < 0,001$ . Výpočty korelace byly provedeny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Váhy zvířat, Iba1 a GFAP imunoreaktivita, objem hipokampu a počet TH pozitivních buněk v SNpc byly analyzovány pomocí Mann-Whitneyho U-testu. Hladina významnosti byla stanovena jako  $p < 0,05$ .

### 4.1.3 Výsledky studie 1

#### Váha zvířat

Postnatální aplikace LPS nevedla u dospělých potkanů PD 93-97 ( $401 \pm 11$ g) v porovnání s kontrolní skupinou ( $413 \pm 18$  g) k váhovému úbytku [ $U(14)=23$ ;  $Z=0,89$ ;  $p=0,37$ ].

#### Biochemické nálezy

Ve skupině LPS jsme ve všech měřených mozkových oblastech zaznamenali zvýšení hladin DOPAC, HVA, 5-HIAA a GLU a snížení hladin 5-HT a 3-MT v porovnání s kontrolní skupinou. Hladina DA byla v LPS skupině zvýšena ve striatu a prefrontálním kortexu a vykazovala zvyšující se trend v hipokampu. Naopak hladina GABA byla snížena v hipokampu a měla snižující se trend v prefrontálním kortexu.

Plasmatické hladiny DA a jeho metabolitů v LPS skupině následovaly mozkové hladiny s výjimkou 3-MT, který měl v plasmě na rozdíl od mozku zvýšenou hladinu. Aplikace LPS neměla žádný vliv na plasmatické hladiny 5-HT, avšak zjistili jsme zvyšující trend v plasmatických hladinách jeho metabolitu 5-HIAA. Plasmatické hladiny GLU i GABA byly v porovnání s kontrolní skupinou v LPS skupině zvýšené.

Hladiny TRP a metabolitů kynureninové dráhy byly v LPS skupině ve všech měřených oblastech v mozku i v plasmě zvýšené. Jedinou výjimkou byla KYNA, u které jsme nezaznamenali žádný vliv aplikace LPS. *Tabulky č. 1-3*

Tabulka č. 1 Hladiny monoaminů a jejich metabolitů v mozku a plasmě. Hodnoty (ng/ml) představují průměr ± SEM.

		<b>Striatum</b>	<b>Hipokampus</b>
<b>DA</b>	Kontrola	51,13±1,10	32,14±1,67
	LPS	80,61±2,79	38,52±1,00
	T-test	t(41)=-10,65; p<0,001	t(41)=-3,07; p<0,01
<b>DOPAC</b>	Kontrola	15,43±0,50	24,91±0,52
	LPS	25,40±1,08	29,30±0,77
	T-test	t(41)=-8,97; p<0,001	t(41)=-4,91; p<0,001
<b>3-MT</b>	Kontrola	7,45±0,27	16,81±0,53
	LPS	4,53±0,17	14,02±0,38
	T-test	t(41)= 8,62; p<0,001	t(41)= 4,07; p<0,001
<b>HVA</b>	Kontrola	12,76±0,38	27,79±1,26
	LPS	21,70±0,69	38,35±1,94
	T-test	t(41)=-11,88; p<0,001	t(41)=-4,73; p<0,001
<b>5-HT</b>	Kontrola	24,80±0,77	33,47±1,50
	LPS	18,62±1,12	22,54±0,90
	T-test	t(41)= 4,68; p<0,001	t(41)= 5,84; p<0,001
<b>5-HIAA</b>	Kontrola	13,59±0,69	17,51±0,48
	LPS	20,00±0,85	22,96±1,57
	T-test	t(41)=-5,91; p<0,001	t(41)=-3,64; p<0,001
		<b>Prefrontální kortex</b>	<b>Plasma</b>
<b>DA</b>	Kontrola	23,81±0,69	160,45±3,70
	LPS	33,26±1,33	213,55±4,51
	T-test	t(41)=-6,68; p<0,001	t(41)=-9,19; p<0,001
<b>DOPAC</b>	Kontrola	16,03±0,46	7,42±0,19
	LPS	22,55±0,78	8,95±0,13
	T-test	t(41)=-7,52; p<0,001	t(41)=-6,39; p<0,001
<b>3-MT</b>	Kontrola	14,84±0,69	4,94±0,18
	LPS	9,28±0,60	7,90±0,30
	T-test	t(41)= 5,91; p<0,001	t(41)=-8,74; p<0,001
<b>HVA</b>	Kontrola	18,77±0,66	5,69±0,28
	LPS	25,73±0,70	9,23±0,24
	T-test	t(41)=-7,19; p<0,001	t(41)=-9,36; p<0,001
<b>5-HT</b>	Kontrola	25,30±0,60	46,33±2,04
	LPS	19,53±0,59	41,89±1,79
	T-test	t(41)= 6,75; p<0,001	t(41)= 1,59; p=0,12
<b>5-HIAA</b>	Kontrola	22,67±1,00	230,50±3,53
	LPS	30,29±0,98	245,32±2,35
	T-test	t(41)=-5,36; p<0,001	t(41)=-3,30; p<0,01

Tabulka č. 2 Hladiny glutamátu a GABA v mozku a plasmě. Hodnoty (ng/ml) představují průměr ± SEM.

		<b>Striatum</b>	<b>Hipokampus</b>
<b>GLU</b>	Kontrola	34,46±0,81	29,25±0,94
	LPS	46,31±1,23	42,49±1,48
	T-test	t(41)=-8,32; p<0,001	t(41)=-7,85; p<0,001
<b>GABA</b>	Kontrola	5,32±0,39	6,28±0,21
	LPS	6,01±0,42	3,62±0,14
	T-test	t(41)=-1,20; p=0,24	t(41)= 9,99; p<0,001
		<b>Prefrontální kortex</b>	<b>Plasma</b>
<b>GLU</b>	Kontrola	30,30±0,58	13,86±0,35
	LPS	40,85±1,09	18,02±0,41
	T-test	t(41)=-9,08; p<0,001	t(41)=-8,07; p<0,001
<b>GABA</b>	Kontrola	5,98±0,16	9,01±0,14
	LPS	4,97±0,37	12,47±0,30
	T-test	t(41)= 2,73; p<0,01	t(41)=-11,21; p<0,001



Tabulka č. 3 Hladiny tryptofanu a metabolitů kynureninové dráhy v mozku a plasmě. Hodnoty (ng/ml) představují průměr ± SEM.

		<b>Striatum</b>	<b>Hipokampus</b>
<b>TRP</b>	Kontrola	6,63±0,26	6,25±0,27
	LPS	20,17±1,08	20,46±1,70
	T-test	t(41)=-13,48; p<0,001	t(41)=-9,25; p<0,001
<b>KYN</b>	Kontrola	63,93±1,00	75,59±1,66
	LPS	111,83±1,89	107,46±2,86
	T-test	t(41)=-23,76; p<0,001	t(41)=-10,10; p<0,001
<b>KYNA</b>	Kontrola	23,15±2,13	23,18±2,11
	LPS	23,89±2,95	23,01±3,15
	T-test	t(41)=-0,20; p=0,84	t(41)= 0,05; p=0,96
<b>3-OH-KYN</b>	Kontrola	17,81±0,74	21,18±0,71
	LPS	36,20±1,15	40,48±0,75
	T-test	t(41)=-13,96; p<0,001	t(41)=-18,50; p<0,001
<b>QUIN</b>	Kontrola	32,84±0,72	32,33±0,52
	LPS	43,41±0,46	41,05±0,78
	T-test	t(41)=-11,88; p<0,001	t(41)=-9,38; p<0,001
		<b>Prefrontální kortex</b>	<b>Plasma</b>
<b>TRP</b>	Kontrola	5,95±0,27	4,09±0,11
	LPS	21,57±1,57	6,67±0,24
	T-test	t(41)=-10,98; p<0,001	t(41)=-10,34; p<0,001
<b>KYN</b>	Kontrola	66,99±0,89	65,13±1,40
	LPS	109,86±1,48	94,58±1,83
	T-test	t(41)=-25,94; p<0,001	t(41)=-12,99; p<0,001
<b>KYNA</b>	Kontrola	23,23±2,08	1,89±0,08
	LPS	22,23±3,08	1,80±0,10
	T-test	t(41)= 0,28; p=0,78	t(41)= 0,71; p=0,48
<b>3-OH-KYN</b>	Kontrola	19,30±0,60	47,88±0,72
	LPS	37,10±1,26	75,21±2,03
	T-test	t(41)=-13,59; p<0,001	t(41)=-13,84; p<0,001
<b>QUIN</b>	Kontrola	32,35±0,61	16,65±0,43
	LPS	40,43±0,96	22,24±0,46
	T-test	t(41)=-7,33; p<0,001	t(41)=-8,83; p<0,001

### Histopatologické a morfologické nálezy

Mikroglie značené protilátkou proti Iba1 byly rozmístěny v celém mozku jak ve skupině LPS, tak i u kontrolních zvířat. V obou skupinách měly Iba1 pozitivní buňky oválné tělo a dlouhé tenké ramifikované výběžky. Hypertrofované mikroglie s atypickým tvarem těla a/nebo širšími výběžky, které představují přechodné stádium k aktivaci, se příležitostně objevovaly v obou testovaných skupinách. Procento oblastí Iba1 imunoreaktivity v hipokampu LPS skupiny ( $8,25 \pm 0,89\%$ ) se nelišilo od kontrolní skupiny ( $7,35 \pm 1,5\%$ ) [U(14)=26; Z=-0,58; p=0,56]. Stejně tak jsme neobjevili žádný rozdíl v SN mezi LPS ( $9,23 \pm 1,1\%$ ) a kontrolní skupinou ( $8,46 \pm 1,37\%$ ) [U(14)=26; Z=-0,58; p=0,56]. *Obrázek č. 2*

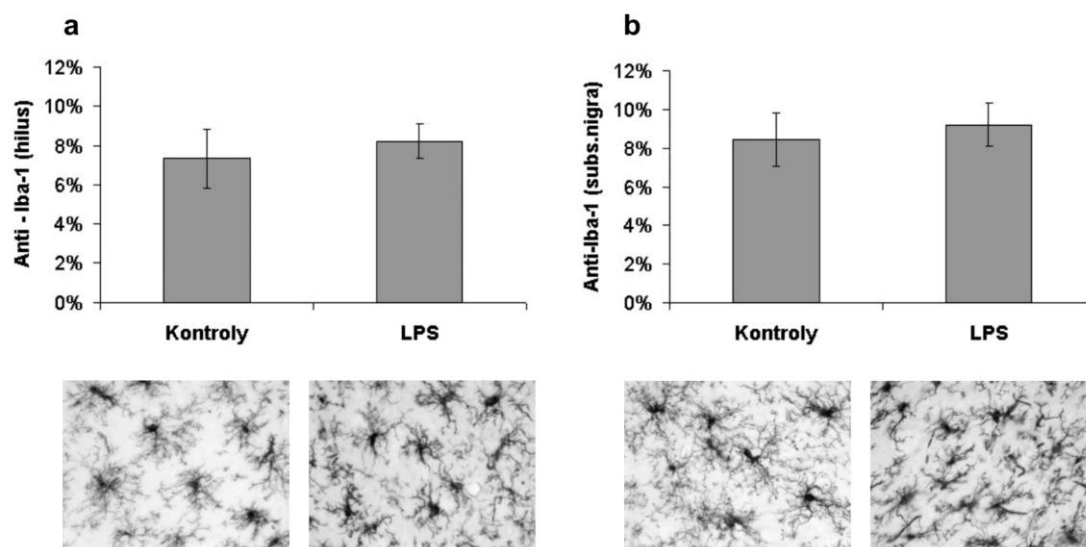
Astrocyty značené protilátkou proti GFAP byly rovněž rozmístěny v celém mozku v obou testovaných skupinách. Nicméně morfologická charakteristika GFAP pozitivních buněk byla odlišná ve skupině LPS (hypertrofické tělo a silnější výběžky) v porovnání se zvířaty z kontrolní skupiny. Přestože hypertrofované astroglie byly přítomné ve více regionech mozku (zejména v periventrikulární oblasti, ale méně v mozkové kůře), nejvýraznější změny se nacházely v hipokampu (hilus gyrus dentatus, stratum lacunosum moleculare a stratum oriens) a v substantia nigra. Procento oblastí GFAP imunoreaktivity bylo v LPS skupině významně vyšší v porovnání s kontrolní skupinou v hipokampu ( $22,97 \pm 2,02\%$  vs.  $9,26 \pm 1,11\%$ ) [U(6)=0; Z=-2,17; p<0,05] i v SN ( $8,75 \pm 1,85\%$  vs.  $3,25 \pm 0,56\%$ ) [U(6)=0; Z=-2,17; p<0,05]. *Obrázek č. 3*

Objem hipokampu byl ve skupině LPS ( $33,9 \pm 1,4 \text{ mm}^3$ ) snížen v porovnání s kontrolní skupinou ( $37,6 \pm 0,9 \text{ mm}^3$ ) [U(14)=11,5; Z=2,1; p<0,05]. Redukce hipokampálního objemu se pohybovala okolo 10%. *Obrázek č. 4*

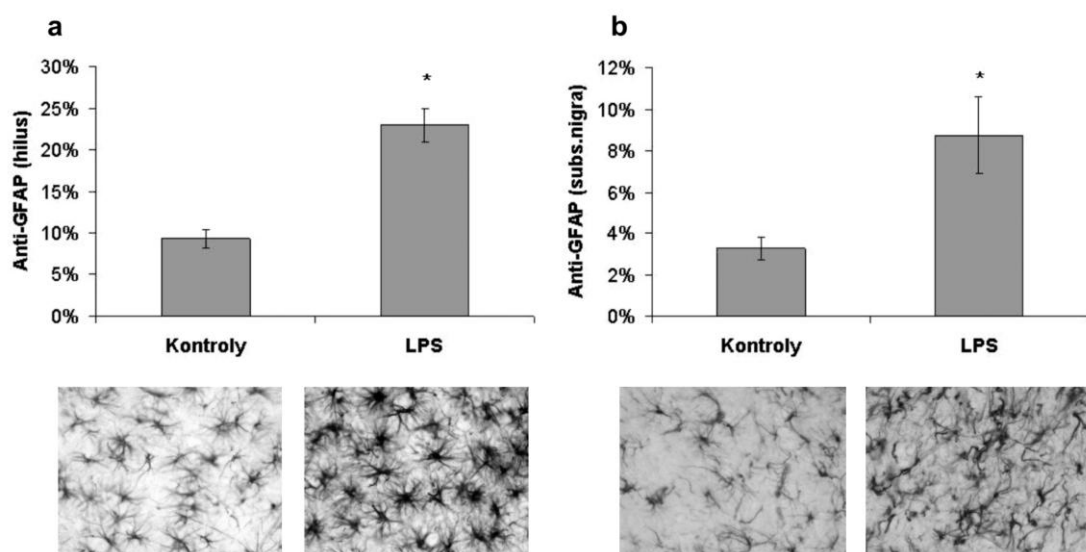
Snížen byl také počet TH pozitivních buněk v SNpc ve skupině LPS ( $23\,172 \pm 2\,438$ ) v porovnání s kontrolní skupinou ( $31\,830 \pm 1\,891$ ) [U(13)=9; Z=2,14; p<0,05]. Redukce počtu TH pozitivních buněk se pohybovala okolo 27%. *Obrázek č. 5*

V naší studii jsme nezaznamenali žádnou Fluoro-Jade B pozitivitu v mozcích dospělých potkanů. Stejně tak analýza buněčných jader neodhalila žádnou jadernou patologii, tedy například smrštění nebo fragmentaci jader. Skupina LPS se z tohoto hlediska nijak nelišila od kontrolní skupiny.

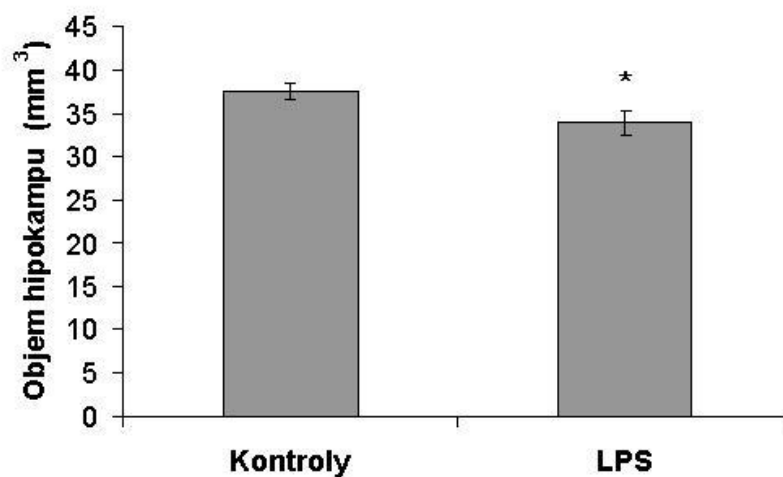
Obrázek č. 2 Procento oblasti Iba1 imunoreaktivity. Hodnoty (%) představují průměr ± SEM. a) hilus gyrus dentatus; b) substantia nigra



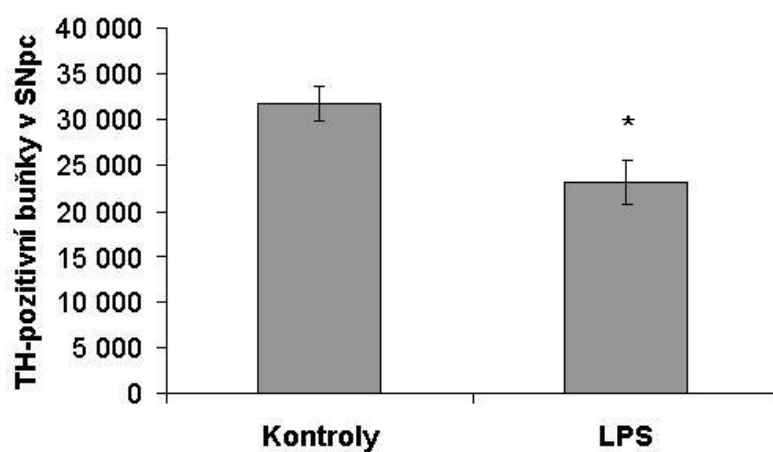
Obrázek č. 3 Procento oblasti GFAP imunoreaktivity. Hodnoty (%) představují průměr ± SEM (\*  $p < 0,05$  od kontrolní skupiny). a) hilus gyrus dentatus; b) substantia nigra



Obrázek č. 4 Vliv časné imunitní stimulace na objem hipokampu. Hodnoty ( $\text{mm}^3$ ) představují průměr  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$  od kontrolní skupiny).



Obrázek č. 5 Vliv časné imunitní stimulace na počet TH pozitivních buněk v substantia nigra, pars compacta. Hodnoty představují průměr  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$  od kontrolní skupiny).



#### **4.1.4 Diskuze studie 1**

Hlavními nálezy této studie jsou biochemické změny a změny mozkové morfologie u dospělých zvířat perinatálně vystavených expozici LPS. V naší studii vedla časná imunitní stimulace k výrazné objemové redukci hipokampu. Pokud je nám známo, tak naše studie je první, která dokumentuje, že hipokampální objem může být výrazně redukován nikoliv pouze po intracerebrální injekci (Wang et al. 2013), ale také po systémové aplikaci LPS, která perinatální infekci napodobuje lépe. Časné postnatální období u potkanů koresponduje přibližně se třetím trimestrem vývoje mozku u člověka (Craig et al. 2003; Feleder et al. 2010). Zvýšení hladin cytokinů během tohoto období narušuje vývoj nervového systému (Ratnayake et al. 2013). Strukturální změny v dospělém mozku (poškození bílé hmoty, dilatace postranních komor, redukce objemu striata), které jsou následkem časné postnatální expozice LPS, jsou obvykle připisovány poruše vývoje oligodendrocytů (Lehnardt et al. 2002; Pang et al. 2003; Wang et al. 2006; Fan et al. 2011b; Wang et al. 2013), která může být podkladem poruchy vývoje mozkových drah nebo dokonce celých mozkových struktur jako je například právě hipokampus. Redukce objemu hipokampu je jedním ze znaků, které jsou u lidí spojeny s celou řadou neuropsychiatrických onemocnění, jako schizofrenie, deprese, bipolární porucha, posttraumatická stresová porucha, Alzheimerova a Parkinsonova choroba nebo vaskulární demence (Laakso et al. 1996; Bremner et al. 2000; Brambilla et al. 2008; Woon et al. 2010; Haukvik et al. 2013).

Zvýšení hladin kynureninu a jeho metabolitů ze zánětlivé části kynureninové dráhy (3-OH-KYN, QUIN) v mozku a plasmě může být zprostředkováno enzymem indol-2,3-dioxygenáza (IDO) a dalšími enzymy zánětlivé části kynureninové dráhy, které jsou aktivovány prozánětlivými cytokiny (Campbell et al. 2014). Naše skupina již dříve popsala přetrvávající zvýšení prozánětlivých cytokinů u dospělých zvířat v tomto modelu časné imunitní stimulace (Tejkalová et al. 2010). Na rozdíl od KYN a 3-OH-KYN, QUIN nepřechází přes HEB (Guillemin 2012), z tohoto důvodu je produkce QUIN v mozku regulována lokální aktivitou enzymů. Hipokampální formace je velmi citlivá na excitotoxicitu, kterou vyvolává QUIN (St'astny et al. 2000), což je v souladu s naším nálezem sníženého hipokampálního objemu ve skupině LPS. Na druhou stranu jsme u dospělých potkanů nezaznamenali žádnou Fluoro-Jade B pozitivitu, ani změny buněčných jader, které jsou typické pro buněčnou smrt, což ukazuje na nepřítomnost

probíhající neurodegenerace v dospělosti zvířat po aplikaci LPS. Tento nálezn odpovídá výsledkům studií, které taktéž nedetekovaly žádnou neurodegeneraci u dospělých potkanů hodiny a týdny po aplikaci LPS (Terrazzino et al. 2002; Chung et al. 2010). Aktivace zánětlivé části kynureninové dráhy byla popsána ve vztahu k depresi, Alzheimerově, Parkinsonově a Huntingtonově chorobě a epilepsii (Campbell et al. 2014). Na druhou stranu zvýšené hladiny KYN byly objeveny post-mortem v prefrontálním kortexu (Schwarcz et al. 2001) a zvýšené hladiny KYN a KYNA byly detekovány v mozkomíšním moku (Linderholm et al. 2012) pacientů se schizofrenií. Přestože jsme v naší studii v LPS skupině objevili zvýšení hladin KYN, nezjistili jsme žádné změny v hladinách KYNA v mozku ani v plasmě v porovnání s kontrolní skupinou.

Zajímavým a neočekávaným výsledkem pro nás byly zvýšené hladiny TRP v mozku i v plasmě v LPS skupině. Neuropsychiatrická onemocnění, jako jsou úzkostné poruchy, deprese a schizofrenie, jsou obvykle spojovány s nízkými hladinami TRP, které následně vedou ke snížení syntézy 5-HT (Almeida-Montes et al. 2000; Bell et al. 2001; Lee et al. 2011; Gauthier et al. 2014). Některé studie však popisují také zvýšené hladiny TRP v krvi, mozkomíšním moku a post-mortem mozkové tkáni pacientů se schizofrenií (Issa et al. 1994; Ravikumar et al. 2000b; Miller et al. 2008). Esenciální aminokyselina TRP je vstřebávána z potravy v trávicím traktu pomocí specializovaného transportního proteinu a následně je přenášena krví ve vazbě na albumin nebo ve volné formě, která je schopná prostupovat přes HEB (Pratt 1979; Bohmer et al. 2005). Jedno z našich vysvětlení spočívá v možnosti, že odchylky v hladině TRP ve skupině LPS zvířat mohou být způsobeny gastrointestinální poruchou, která by vedla ke změně absorpce TRP z potravy. Další možností je porucha vazby TRP na albumin, která by způsobila zvýšení plasmatických hladin volného TRP, případně porucha katabolismu TRP. Poslední navrhovaná možnost je podle nás nejméně pravděpodobná, protože imunitní odpověď aktivuje enzymy zánětlivé části kynureninové kaskády, což vede ke snížení hladin TRP a následně také 5-HT (Maes et al. 2011). IDO, regulační enzym, který se podílí na spuštění kynureninové dráhy, nekatalyzuje pouze přeměnu TRP na kynurenin, ale také přeměnu 5-HT na formyl 5-HT (Stone and Darlington 2002; Stone et al. 2012), což by mohlo vysvětlovat snížené hladiny 5-HT u zvířat v LPS skupině i přes zvýšené hladiny TRP. Alternativním vysvětlením snížení hladin 5-HT je také

zvýšená přeměna 5-HT na 5-HIAA pomocí enzymu monoaminoxidáza (MAO). V nedávné studii, jejímž cílem bylo mimo jiné změřit hladiny hipokampálních neurotransmiterů v modelu deprese u myší, se ukázal zvýšený poměr 5-HIAA k 5-HT, což odráží zvýšený obrát 5-HT a tedy zvýšenou serotonergní aktivitu u depresivních myší (Huang et al. 2014). Také v naší studii jsme objevili negativní korelaci mezi hladinami 5-HT a 5-HIAA ( $r=-0,69$ ;  $p=0,001$ ) v hipokampu zvířat v LPS skupině, avšak nikoliv v kontrolní skupině.

Potlačení TH imunoreaktivity v SN a ve ventrální tegmentální oblasti (VTA) bylo u dospělých zvířat po perinatální expozici LPS popsáno již v dřívějších studiích (Fan et al. 2011a; Fan et al. 2011b; Cai et al. 2013) a je v souladu také s naším nálezem sníženého počtu TH pozitivních buněk v SNpc. My jsme ovšem kromě výše zmíněného objevili i zvýšení hladin DA v mozku i plasmě zvířat ve skupině LPS. Expozice LPS v průběhu perinatálního období vyvolává zvýšenou fosforylaci a aktivitu TH v nadledvinách, která přetrvává až do dospělosti (Ong et al. 2012; Sominsky et al. 2013). TH katalyzuje přeměnu aminokyseliny L-tyrosinu na DA prekurzor L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA), který prochází přes HEB. Možným vysvětlením zvýšených hladin DA ve skupině LPS zvířat je zvýšená syntéza L-DOPA na periférii a její následný přechod přes HEB. Schizofrenie je spojená s hyperaktivitou mesolimbických dopaminergních neuronů a prefrontální hypodopaminergií (Brisch et al. 2014). Zvýšení hladin DA ve striatu a hipokampu podporuje hypotézu časné imunitní stimulace jako animálního modelu schizofrenie, nicméně snížená TH imunoreaktivita v SNpc má spíše vztah k patogenezi Parkinsonovy choroby (Fan et al. 2011a; Fan et al. 2011b; Cai et al. 2013).

Předpokládáme, že zvýšení hladin DA metabolitů (DOPAC 3-MT, HVA) ve skupině LPS může být spojeno s vyšší dostupností DA v plasmě. Nárůst mozkových hladin DOPAC a HVA lze vysvětlit aktivací monoaminoxidázy B, která byla popsána u proliferujících a reaktivních astrocytů (Gulyas et al. 2011). Toto vysvětlení je v souladu také s naším nálezem aktivovaných astrocytů v mozcích LPS zvířat.

Redukce TH imunoreaktivity v SN a VTA u dospělých zvířat po perinatální LPS expozici je obvykle připisována chronické mikrogliaální aktivaci v této oblasti (Fan et al. 2011a; Fan et al. 2011b; Cai et al. 2013). Nicméně v naší studii se v obou testovaných

skupinách v SN i v hipokampu vyskytovaly hlavně neaktivované mikroglie nebo ojediněle mikroglie v přechodném stádiu k aktivaci. Autoři většiny publikovaných studií se přiklánějí k názoru, že intracerebrální i systémová postnatální aplikace LPS vyvolává mikrogliální aktivaci, která přetrvává až do dospělosti (Pang et al. 2003; Sominsky et al. 2012; Wang et al. 2013; Patro et al. 2013). Nedávno publikovaná studie naopak popsala zvýšenou mikrogliální denzitu v hipokampu 48 hodin po postnatální aplikaci (PD 5), avšak zvířata PD 21 a PD 74 měla již mikrogliální denzitu i počet mikroglíí stejný jako kontrolní skupina (Smith et al. 2014). Autoři této studie, jejíž výsledky se blíží našim nálezům, spekulují nad možnou cílovou nebo maximální denzitou, kterou mohou mikroglie v mozku dosáhnout (Smith et al. 2014).

Astrocyty ovlivňují celou řadu postnatálních vývojových kroků, mezi něž patří tvorba neuronálních synapsí, myelinizace nebo homeostáza centrálního nervového systému (Meyer-Franke et al. 1999; Dong and Benveniste 2001; Molofsky et al. 2012). Přechod astrocytů do reaktivního stavu, tak jak jsme popsali v SN a v hipokampu zvířat ze skupiny LPS, může interferovat s jejich funkcí, vzhledem k tomu, že astrocyty in vitro produkují neurotoxické molekuly jako NO, TNF $\alpha$  a reaktivní formy kyslíku (Carson et al. 2006). Na druhou stranu, mediátory zánětu produkované mikroglie podporují neuroprotektivní odpověď astrocytů (Okada et al. 2005; Bsibsi et al. 2006). Zvýšená denzita astrocytů byla popsána u pacientů se schizofrenií, autismem a neurodegenerativními chorobami jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (Wisniewski and Wegiel 1991; Forno et al. 1992; Vargas et al. 2005; Catts et al. 2014). Pro depresi je naopak příznačné snížení denzity astrocytů (Rajkowska and Stockmeier 2013).

Mediátory zánětu aktivují syntézu QUIN, která je neurotoxickou látkou a působí jako agonista glutamátergního NMDA receptoru (Campbell et al. 2014). Vysoké hladiny QUIN vyvolávají v neuronech zvýšený výdej GLU, zabraňují jeho zpětnému vychytávání astrocyty a inhibují astrogliální glutamin syntetázu (GS) - tyto děje ve výsledku vedou k hromadění GLU (Guillemin 2012) podobně jako v naší studii. GLU je prekurzorem hlavního inhibičního neurotransmiteru GABA. Možným vysvětlením našeho nálezu snížených hladin GABA v hipokampu a v prefrontálním kortexu v LPS skupině může být právě inhibice enzymu GS (Guillemin 2012). Inhibice tohoto enzymu je mimo jiné vyvolána také reaktivní astrogliózou (Ortinski et al. 2010). Naše vysvětlení



je podpořeno negativní korelací mezi hladinami GLU a GABA ( $r=-0,51$ ;  $p=0,03$ ), kterou jsme objevili v hipokampu v LPS skupině, ale nikoliv u kontrolních zvířat. Plasmatické hladiny GABA byly v naší studii - na rozdíl od hladin v mozku - zvýšené. Domníváme se, že zvýšené hladiny GABA v plasmě mají souvislost se zvýšenou syntézou GLU v periferních tkáních (White 1981; van Bemmelen et al. 1985). Abnormality glutamatergního a GABAergního systému jako je kombinace zvýšených hladin GLU a snížených hladin GABA v mozku jsou asociovány s poruchami nálady, úzkostnými poruchami a autismem (Krystal et al. 2002; Pollack et al. 2008; Quaak et al. 2013; Meyerhoff et al. 2014).

#### **4.1.5 Závěr studie 1**

V našem modelu časné imunitní stimulace jsme demonstrovali významné změny mozkových nebo plazmatických hladin všech měřených neurotransmiterů a jejich metabolitů. Stejně tak jsme prokázali, že perinatální aplikace LPS vyvolává u dospělých jedinců změny také v metabolismu tryptofanu, kdy dochází k aktivaci zánětlivé části kynureninové metabolické dráhy a k tvorbě neurotoxických metabolitů, které mohou mít spojitost s některými neuropsychiatrickými onemocněními.

Částečně jsme potvrdili i další z našich hypotéz. V našem modelu časné imunitní stimulace došlo u dospělých zvířat k hypertrofii astrocytů v hipokampu a substantia nigra, avšak nenalezli jsme mikrogliální aktivaci, tak jak ji popisují studie jiných autorů. Stejně tak jsme neobjevili žádné známky akutně probíhající neurodegenerace ani patologii buněčných jader.

Volumetrická studie odhalila vliv časné imunitní stimulace na objem hipokampu u dospělých potkanů. Pokud je nám známo, tak naše studie je první, která popsala redukcii objemu hipokampu po systémové postnatální aplikaci LPS, která dle našeho názoru napodobuje postnatální infekci lépe než intracerebroventrikulární aplikace.

Na základě změn popsanych v biochemické části naší studie jsme se rozhodli zhodnotit také vliv časné imunitní stimulace na dopaminergní syntézu v substantia nigra. Stejně jako u jiných autorů, tak i v našem modelu docházelo k úbytku dopaminergních buněk v substantia nigra, který ale nevyvolával snížení hladin dopaminu v mozku.

Naše výsledky podporují patogenetickou souvislost mezi časnou imunitní stimulací a neuropsychiatrickými onemocněními jako jsou schizofrenie, poruchy nálady, úzkostné poruchy, autismus a Parkinsonova a Alzheimerova choroba.

## **4.2 Studie 2: Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a senzomotorické zpracování informací - animální model psychózy**

Páleníček, T., Fujáková, M., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Brunovský, M., Horáček, J. Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a senzomotorické zpracování informací - animální model psychózy. *Psychiatrie* 2011; 15 (suppl. 2): 44-48.

### **4.2.1 Úvod a hypotézy studie 2**

Halucinogeny psilocin a mezkalin představují zástupce dvou velkých rodin psychedelik - tryptaminů a fenyletylaminů (Nichols 2004). Mechanismus účinku těchto látek spočívá v agonismu serotoninových 5-HT<sub>2A/C</sub> a v případě tryptaminů i 5-HT<sub>1A</sub> receptorů (Palenicek et al. 2008). Jak již bylo popsáno v obecné části této práce, narušení serotonergního systému je jednou z uvažovaných příčin vzniku schizofrenie. Vzhledem k fenomenologické podobnosti účinků halucinogenů s příznaky psychóz u lidí může být aplikace těchto látek využívána jako serotoninový model schizofrenie (Vollenweider et al. 1998; Palenicek et al. 2008).

Cílem této studie je verifikovat účinky psilocinu a mezkalinu jako validní model schizofrenie pomocí testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce. Deficit v tomto testu v animálních i humánních modelech odráží poškození senzomotorického zpracování informací, které se vyskytuje u pacientů se schizofrenií (Ludewig et al. 2002). Schizofrenie je mimo jiné charakterizována také poměrně konzistentními nálezy EEG, jako je nárůst pomalých aktivit v pásmu delta a deficit v pásmu gama (Gerez and Tello 1995; Begic et al. 2000). Popsáno je i snížení koherence EEG signálu zejména mezi frontálním a temporálním kortexem (Tauscher et al. 1998; Winterer et al. 2001), které je považováno za snížení funkční konektivity mezi těmito oblastmi. Druhým parametrem, který byl předmětem této studie, je tedy funkční konektivita mozku měřená pomocí kvantitativního EEG (qEEG).

### Hypotézy:

1. Aplikace halucinogenů psilocinu a mezkalinu vyvolává v animálním modelu deficit v testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce.
2. Aplikace halucinogenů psilocinu a mezkalinu vyvolává v animálním modelu deficit funkční konektivity mozku.

#### **4.2.2 Metodika studie 2**

V experimentu byli použiti dospělí potkaní samci kmene Wistar (Biotest Konárovice, ČR) o hmotnosti 200-250 g (n=10-14/skupina). Potkani byli ustájeni v plastových boxech ve zvěřinci s regulovanou teplotou, pravidelným dvanáctihodinovým cyklem světlo/tma a neomezeným přístupem k vodě a potravě. Všechny experimenty byly prováděny během světelné periody a všechna zvířata byla testována pouze jednou. Experimenty byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. lékařské fakultě UK a Psychiatrickém centru Praha a byly provedeny v souladu s platnou legislativou na ochranu zvířat proti týrání.

Psilocin (THC-Pharm) v dávce 0,25 mg/kg, 1 mg/kg a 4 mg/kg a mezkalin hydrochlorid (Farmaceutická fakulta UK) v dávce 10 mg/kg, 20 mg/kg a 100 mg/kg byly naředěny v 0,9% NaCl a aplikovány subkutánně v objemu 2 ml/kg. Kontrolním zvířatům bylo podáno vehikulum. Psilocin byl aplikován 15 minut a mezkalin 60 minut před začátkem PPI experimentů. V EEG experimentu byly aplikovány pouze nejvyšší dávky a to 10 minut po začátku registrace.

Úleková reakce a prepulzní inhibice akustické úlekové reakce byly měřeny v testovacích boxech systému SRLAB (San Diego Instruments). Testovací boxy byly ventilované, rovnoměrně osvětlené a obsahovaly průhledný válec (průměr 8,7 cm) ležící na piezoelektrickém akcelérátoru. 24 cm nad podložkou byl umístěn vysokofrekvenční reproduktor, který produkoval kontinuální šum (75 dB) a další akustické stimuly. Samotný experiment začal pětiminutovou aklimatizační periodou a čtyřmi iniciačními úlekovými stimuly (125 dB), které nebyly zahrnuty do výpočtu PPI. Poté byly použity následující intenzity stimulů v pseudonáhodném pořadí:

- 1) samotný pulz - 125 dB, trvání 20 ms
- 2) prepulz-pulz - 13 dB nad intenzitou pozadí, trvání 20 ms, prezentovaný 100 ms před začátkem samotného pulzu
- 3) samotný prepulz - 13 dB nad intenzitou pozadí, trvání 20 ms
- 4) žádní stimul

Každý podnět se opakoval v průběhu měření 5x s průměrným intervalem mezi jednotlivými podněty 30 s. PPI ASR byla vyjádřena jako procentuální podíl:

$$100 - (\text{průměrná ASR na prepulz-pulz podněty} / \text{ASR na samostatné pulzy}) \times 100$$

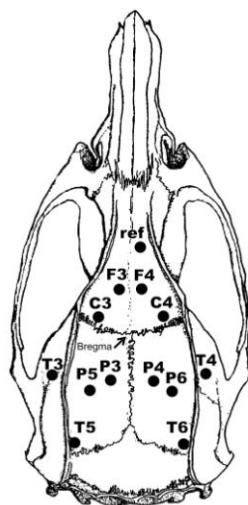
Zvířata s průměrnou velikostí ASR menší než 10 mikroV byla označena jako non-respondéři a vyřazena z analýzy. Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu Sigmatat v. 3.0 pomocí jednocestné analýzy rozptylu (one-way ANOVA) s Newman-Keuls post hoc testem. Hladina významnosti byla stanovena jako  $p < 0,05$ .

Stereotaktická implantace 14 stříbrných elektrod (12 aktivních + referenční + zemní) byla provedena v celkové isofluranové anestézii 7 dní před vlastní registrací EEG. Aktivní elektrody byly implantovány subdurálně nad homologními částmi obou hemisfér. Koordináty pro implantaci elektrod byly převzaty ze stereotaktického atlasu The Rat Brain (Paxinos and Watson 2007):

- F3/4 5,0 mm anteriorně,  $\pm 2,0$  mm laterálně od bregmy (frontální asociační kortex)
- C3/4 2,2 mm anteriorně,  $\pm 3,2$  mm laterálně od bregmy (primární motorický kortex)
- P3/4 3,8 mm posteriorně,  $\pm 2,5$  mm laterálně od bregmy (parietální asociační kortex)
- P5/6 4,5 mm posteriorně,  $\pm 4,5$  mm laterálně od bregmy (parietální asociační kortex)
- T3/4 3,6 mm posteriorně,  $\pm 7,2$  mm laterálně od bregmy (spánkový asociační kortex)
- T5/6 8,8 mm posteriorně,  $\pm 5,8$  mm laterálně od bregmy (sekundární sluchový kortex)

Referenční elektroda (REF) byla implantována subdurálně nad čichový lalok a zemní elektroda byla umístěna subkutánně v okcipitální oblasti. Elektrody byly ke kalvě připevněny pomocí zubního cementu. Den před zahájením registrace byl k elektrodám v krátkodobé isofluranové anestézii připojen konektor k registračnímu setu.

Obrázek č. 6 Lokalizace elektrod na povrchu kalvy potkana. Přesné umístění viz text.



EEG záznam byl registrován pomocí zesilovače BrainScope (UniMedis) po dobu 100 minut. Testovaná látka byla potkanů aplikována po 10 minutovém klidovém záznamu. Během registrace se potkani mohli volně pohybovat. Spolu s registrací EEG bylo u potkanů zaznamenáváno chování pomocí programu Activities - aktivní (běhání, chození, čištění) a pasivní (imobilita, čenichání bez pohybu těla, malé pohyby hlavou). Z analýzy byly vyřazeny všechny aktivní úseky a úseky spánku a buzení.

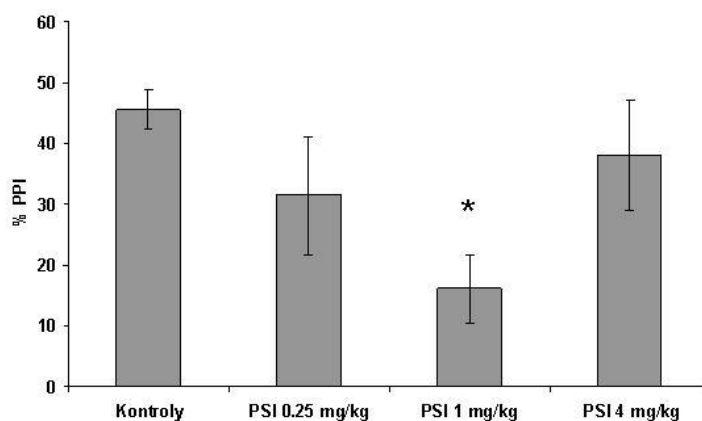
Pomocí programu WaveFinder (UniMedis) byly odděleny úseky aktivního a pasivního chování a následně byl signál odpovídající pasivním úsekům importován do softwaru Neuroguide v.2.4.6 (Applied Neuroscience Inc.). K vlastní analýze byly použity 2 úseky: kontrolní úsek před aplikací látky a úsek po aplikaci látky. Po rychlé Fourierově transformaci byla z každého analyzovaného úseku vypočítána spektra mezi 1 a 40 Hz s rozlišením 0,5 Hz: delta (1-4 Hz), theta (4-7 Hz), alfa (8-12 Hz), beta (12-25 Hz), vysoká beta (25-30 Hz), gama (30-40 Hz). EEG koherence byly vypočítány pro 30 intrahemisferálních (F3-C3, F3-P3, F3-P5, F3-T3, F3-T5, C3-P3, C3-P5, C3-T3, C3-T5, P3-P5, P3-T3, P3-T5, P5-T3, P5-T5, T3-T5) na levé hemisféře a analogicky na pravé) a 6 interhemisferálních elektrodových párů (F3-F4, C3-C4, P3-P4, P5-P6, T3-T4, T5-T6). Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programu Sigmastat v. 3.0 pomocí párového T-testu (úsek záznamu před aplikací látky vs. úsek 20-30 minut po aplikaci látky). Hladina významnosti byla stanovena jako  $p < 0,05$ .

### 4.2.3 Výsledky studie 2

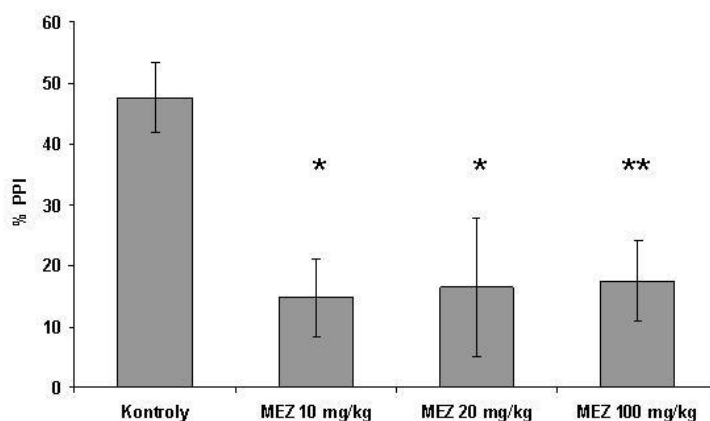
#### Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce

One-way ANOVA ukázala signifikantní rozdíl mezi aplikací vehikula a psilocinu ( $F(3,41)=3,137$ ;  $p<0,05$ ) v testu PPI ASR, nicméně dle post hoc testu pouze psilocin v dávce 1 mg/kg narušoval PPI. Také mezkalin měl signifikantní vliv na PPI ( $F(3,51)=4,198$ ;  $p<0,01$ ) a to dle post hoc testu ve všech testovaných dávkách. *Obrázek č. 7a-b*

*Obrázek č. 7a* Vliv psilocinu na prepulzní inhibici úlekové reakce potkana. Hodnoty (%PPI) představují průměr  $\pm$  SEM (\*  $p<0,05$  od kontrolní skupiny).



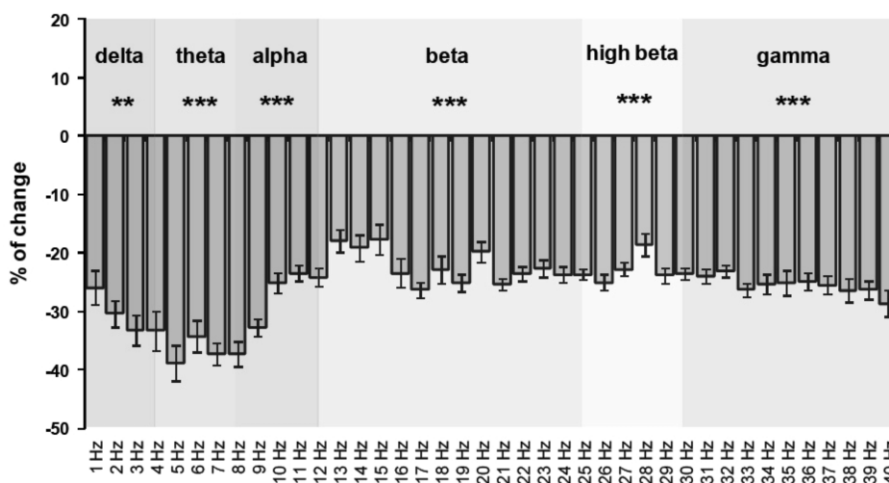
*Obrázek č. 7b* Vliv mezkalinu na prepulzní inhibici úlekové reakce potkana. Hodnoty (%PPI) představují průměr  $\pm$  SEM (\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$  od kontrolní skupiny).



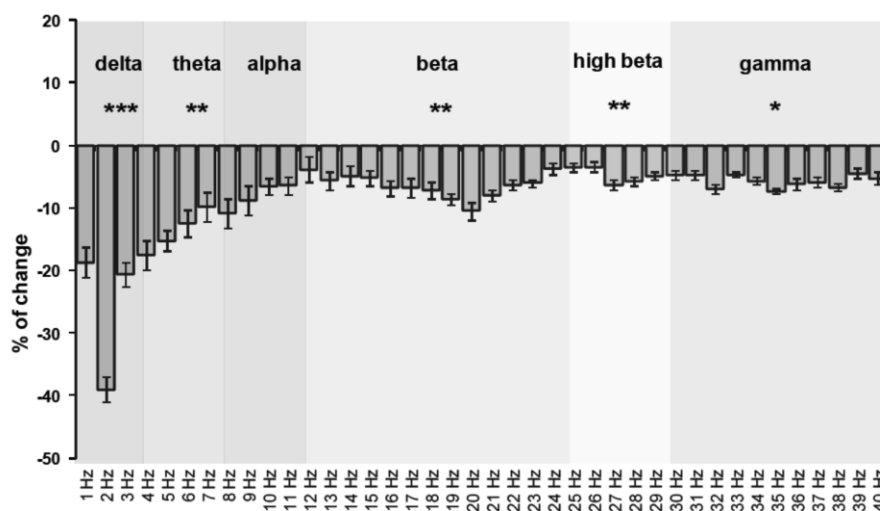
## EEG spektra

Psilocin i mezkalin snižovaly průměrný výkon v téměř celém frekvenčním rozsahu. Nejvýznamnější pokles byl u psilocinu zaznamenán v pásmu theta, zatímco u mezkalinu v pásmu delta. Aplikace mezkalinu na rozdíl od psilocinu neindukovala snížení výkonu v pásmu alfa. *Obrázek č.8a-b*

*Obrázek č. 8a* Výkonná spektra u psilocinu 4 mg/kg. Hodnoty (% změny) představují průměr ± SEM (\*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 od klidového záznamu).



*Obrázek č. 8b* Výkonná spektra u mezkalinu 100 mg/kg. Hodnoty (% změny) představují průměr ± SEM (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 od klidového záznamu).

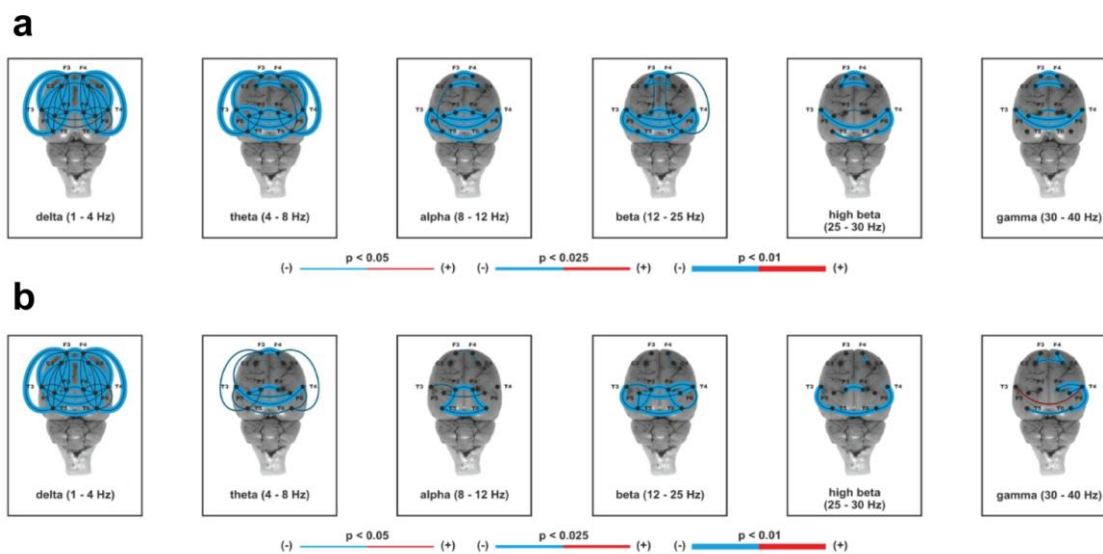




## EEG koherence

Psilocin významně snižoval koherence ve všech frekvenčních pásmech - intra- i interhemisféralně. Nejpatrnější byly změny v pásmech delta a theta, v ostatních pásmech byly změny méně významné s převažujícími změnami v interhemisferálních koherencích. Mezkalin indukoval podobné změny jako psilocin, nicméně v pásmu theta byly změny méně výrazné. Mezkalin navíc snižoval intrahemisferální koherence v pásmech beta a gama. *Obrázek č. 9*

*Obrázek č. 9* Signifikantní změny intra- a interhemisferálních koherencí po podání a) psilocinu 4 mg/kg a b) mezkalinu 100 mg/kg ve srovnání s klidovým záznamem (před aplikací látek). Modrá barva vyznačuje snížení koherencí, červená zvýšení koherencí. Síla čáry určuje statistickou významnost.



#### 4.2.4 Diskuze studie 2

Náš nález deficitu PPI po aplikaci psilocinu a mezkalinu je v souladu s nálezy, které byly publikovány v našich ostatních pracích i pracích jiných autorů, kde obecně podání psychedelických látek vede k narušení sensorimotorického zpracování informací (Vollenweider et al. 1998; Palenicek et al. 2008). Pravděpodobným podkladem těchto změn je již zmíněný agonismus psychedelických látek na 5-HT<sub>2A</sub> receptorech (Marek and Aghajanian 1996; Nichols 2004). Změny PPI, které jsme popsali v této práci, jsou srovnatelné se změnami, které jsou popisovány u pacientů se schizofrenií. Z tohoto důvodu lze hovořit o fenomenologické validitě námi použitého serotoninového modelu. Srovnáním našeho modelu s modely dopaminergními a glutamatergními jsme nezjistili významnější rozdíly z hlediska narušení sensorimotorického zpracování informací (Sipes and Geyer 1994; Páleníček et al. 2007). Naše výsledky naznačují, že mezkalin narušuje PPI o něco výrazněji než psilocin. Je ovšem možné, že námi použité dávky psilocinu jsou příliš nízké k narušení PPI a stejně tak čas, kdy psilocin po subkutánní aplikaci dosahuje nejvyšších hladin v mozku, může být jiný. Mezkalin po subkutánní aplikaci dosahuje v mozku nejvyšších hladin za 60 minut, u psilocinu tyto informace nemáme k dispozici.

Porovnat nálezy z našich EEG pokusů s jinými animálními daty není téměř možné, vzhledem k tomu, že obdobná data z jiných laboratoří neexistují. Naše výsledky ze serotoninového modelu lze nicméně porovnat s našimi nálezy v glutamatergním modelu, kde registrace EEG proběhla stejným způsobem. V serotoninovém modelu docházelo ke snížení výkonu ve všech pásmech, zatímco v glutamatergním modelu vyvolaném podáním NMDA antagonistů ketaminu a dizocilpinu došlo především ke zvýšení výkonu v pásmu gama (Palenicek et al. 2011a). Dizocilpin navíc vyvolával snížení výkonu v pásmu theta a beta (Tyls et al. 2011). Stejně jako v serotoninovém modelu, tak i v glutamatergním docházelo k snížení EEG koherencí. Zdá se tedy, že z hlediska konektivity oba modely indukují obdobné změny. Příčinu těchto změn z hlediska farmakologického mechanismu účinku v tuto chvíli bez použití selektivních ligandů blokujících účinky halucinogenů nelze objasnit. Domníváme se, že příčina snížení EEG výkonu může být vyvolána dvěma základními mechanismy. První možností je menší počet aktivních neuronů v kortexu, tedy jakýsi útlum, druhou možností je desynchronizace neuronů. Druhé variantě nasvědčuje i fakt, že snížení

koherenci je odrazem snížení funkční konektivity a odráží míru desynchronizace neuronů.

Srovnání našich výsledků z EEG pokusů s nálezy u pacientů se schizofrenií ukazuje na nápadnou podobnost ve snížení výkonu v pásmu gama (Williams and Boksa 2010). Gama oscilace se zdají být klíčové pro řadu kognitivních funkcí a jejich snížení u nemocných je spojeno s kognitivním poškozením (Gonzalez-Burgos et al. 2010; Gandal et al. 2012). Stejně tak je u pacientů se schizofrenií popisováno snížení frontotemporální konektivity, které je taktéž spojena s deficitem kognitivních funkcí a deficitem ve zpracování informací.

#### **4.2.5 Závěr studie 2**

Naše výsledky potvrzují naši hypotézu, že akutní aplikace halucinogenů psilocinu a mezkalinu v animálním modelu vyvolává deficit prepulzní inhibice akustické úlekové reakce. Vzhledem k tomu, že obdobný deficit se vyskytuje i u pacientů se schizofrenií, lze tvrdit, že naše serotoninové modely jsou fenomenologicky validní.

Výsledky naší studie podporují i naši druhou hypotézu. Z hlediska EEG vede aplikace psilocinu ke snížení výkonu ve všech pásmech, nejvíce v pásmu theta. Podobný trend se objevil také u mezkalinu, nicméně v tomto případě bylo nejvýraznější snížení výkonu v pásmu delta a naopak v pásmu alfa nebyly pozorovány téměř žádné změny. Psilocin i mezkalin snižovali EEG koherence a to nejvýrazněji v pásmu delta, kde došlo ke snížení prakticky mezi všemi elektrodovými páry.

Námi vytvořené serotoninové modely vykazují významnou podobnost s nálezy u pacientů se schizofrenií. Domníváme se, že by tyto modely mohly do budoucna mít i významnou prediktivní validitu pro testování účinků antipsychotik.

### 4.3 Studie 3: Behaviorální, neurochemický a EEG profil psychedelické drogy 4-bromo-2,5-dimetoxyfenyletylaminu (2C-B) u potkana

Páleníček, T., Fujáková, M., Brunovský, M., Horáček, J., Gorman, I., Balíková, M., Rambousek, L., Syslová, K., Kačer, P., Zach, P., Bubeníková-Valešová, V., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Puskarčíková, J., Höschl, C. Behavioral, Neurochemical and Pharmacology EEG Profiles of the Psychedelic Drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in Rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2013; 225 (1): 75-93.

#### 4.3.1 Úvod a hypotézy studie 3

2C-B patří do skupiny tzv. 2C fenyletylaminových derivátů, u kterých byly popsány psychedelické a entaktogenní účinky na člověka (Shulgin and Carter 1975). Ačkoliv je tato látka - podobně jako entaktogen MDMA (3,4-metylendioxy-N-metylamfetamin) známý pod slangovým označením *Extáze* - příležitostně užívána jako rekreační droga (de Boer and Bosman 2004; Caudevilla-Galligo et al. 2012), ve vědecké literatuře chybí dostatek informací o jejím mechanismu účinku a vlivu na chování. Kromě účinků, které byly popsány v 70. letech Shulginem a Carterem (Shulgin and Carter 1975), je momentálně dostupná pouze jedna behaviorální studie na kuřatech (Bronson et al. 1995). Přestože 2C-B u člověka vyvolává stavy podobné stavům po požití MDMA, farmakologickým profilem se tato látka blíží spíše halucinogenům - vazebné studie popisují 2C-B jako agonistu serotoninových 5-HT<sub>2C</sub> a parciálního agonistu nebo dokonce antagonistu 5-HT<sub>2A</sub> receptorů (Acuna-Castillo et al. 2002; Villalobos et al. 2004; Moya et al. 2007).

Vzhledem k výše zmíněným faktům bylo cílem naší práce popsat účinky aplikace 2C-B v animálním modelu. V behaviorální části studie jsme se zaměřili na lokomoční aktivitu a prepulzní inhibici akustické úlekové reakce. Oba tyto parametry chování jsou typicky poškozené po aplikaci / požití psychedelik nebo entaktogenů (Krebs-Thomson et al. 1998; Bubenikova et al. 2005) a umožňují zhodnotit centrální aktivaci či útlum, habituaci na nové prostředí, explorační chování a schopnost filtrovat a

reagovat na vlivy okolního prostředí (Lat 1973; Koch and Schnitzler 1997; Swerdlow et al. 2001). Dále jsme provedli kvantitativní analýzu EEG (EEG spektra a koherence) - tato metoda odráží funkční konektivitu mozku a představuje tak nový přístup k hodnocení psychoaktivních látek (Shaw et al. 1978; Thatcher et al. 1986). Hladiny dopaminu, který je klíčový pro adiktivní potenciál, stimulační účinky a regulaci sensorimotorického zpracování informací (Geyer et al. 2001; Lingford-Hughes and Nutt 2003), a jeho metabolitů jsme v našem experimentu měřili pomocí mikrodialýzy v obou částech nukleus accumbens (NAc): medioventrální - *shell*, plášť (emoce, motivace, adikce) a laterodorsální - *core*, dřev (lokomoce, sensorimotorické zpracování informací) (Deutch and Cameron 1992; Pontieri et al. 1995). Amfetamin, psychostimulant strukturou podobný 2C-B, v tomto pokusu sloužil jako referenční látka, která umožnila rozlišit entaktogenní a/nebo halucinogenní účinky (aktivace serotonergního systému) od potenciálních stimulačních účinků (aktivace dopaminergního systému).

#### Hypotézy:

1. Aplikace 2C-B vede v animálním modelu k lokomočním změnám v testu otevřeného pole.
2. Aplikace 2C-B vyvolává v animálním modelu deficit v testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce
3. Aplikace 2C-B vyvolává v animálním modelu deficit ve funkční konektivě mozku.
4. Aplikace 2C-B ovlivňuje v animálním modelu metabolismus dopaminu.

#### **4.3.2 Metodika studie 3**

V experimentu byli použiti dospělí potkaní samci kmene Wistar (Biotest Konárovice, ČR) o hmotnosti 200-250 g. Potkani byli ustájeni v plastových boxech ve zvěřinci s regulovanou teplotou, pravidelným dvanáctihodinovým cyklem světlo/tma a neomezeným přístupem k vodě a potravě. Všechny experimenty byly prováděny během světelné periody a všechna zvířata byla testována pouze jednou. V behaviorálních experimentech bylo použito 9-11 zvířat ve skupině, v EEG experimentech 12 zvířat ve

skupině a pro mikrodialýzu bylo použito 7 zvířat ve skupině. Experimenty byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. lékařské fakultě UK a Psychiatrickém centru Praha a byly provedeny v souladu s platnou legislativou na ochranu zvířat proti týrání.

2C-B hydrochlorid (Farmaceutická fakulta UK) byl naředěn v 0,9% NaCl a aplikován subkutánně v objemu 2 ml/kg. Jako kontrolní látka bylo použito vehikulum. V behaviorálních experimentech byly použity 4 dávky 2C-B: 2,5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg a 50 mg/kg, které byly aplikovány 15 (začátek působení látky) nebo 60 (nejvyšší mozková koncentrace) minut před začátkem měření. V EEG experimentech byly použity dávky 10 mg/kg a 50 mg/kg a pro mikrodialýzu pouze dávka 25 mg/kg.

Amfetamin sulfát (Sigma-Aldrich) byl naředěn v 0,9% NaCl a aplikován subkutánně v objemu 2 ml/kg a dávce 1 mg/kg nebo 4 mg/kg. V behaviorálních experimentech byl amfetamin aplikován 15 minut před začátkem měření. V EEG experimentech byla použita pouze vyšší dávka.

Lokomoční aktivita (délka trajektorie) a její prostorová charakteristika (thigmotaxe a čas strávený v centru arény) v novém prostředí byly měřeny a analyzovány automatickým nahrávacím systémem EthoVision Color Pro v. 3.1.1 (Noldus). Černá čtvercová plastická aréna (68 x 68 x 30 cm) byla umístěna ve zvukotěsné a rovnoměrně osvětlené místnosti. Potkani byli umístěni doprostřed arény 15 nebo 60 minut po aplikaci látky a lokomoční aktivita byla registrována následujících 30 minut. Program Ethovision analyzoval aktivitu zvířete v pětiminutových intervalech a také prostorovou charakteristiku pohybu. K tomuto účelu byla aréna virtuálně rozdělena na 5 x 5 stejně velkých čtverců, z nichž 16 bylo periferních a 9 centrálních. Program spočítal frekvenci ( $f$ ) vstupu potkana do každé zóny. Thigmotaxe ( $i$ ) byla následně vypočítána podle vzorce:

$$i = f_{\text{periferní zóny}} / f_{\text{všechny zóny}}$$

Thigmotaxe nabývá hodnoty od 0 do 1 a ukazuje pravděpodobnost výskytu potkana v periferní zóně arény. Komplementárním parametrem je čas strávený v centru arény ( $T_{\text{centre}}$ ), který je vypočítán jako součet času strávený v devíti centrálních zónách.

Senzorimotorické zpracování informací bylo měřeno pomocí testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce (PPI ASR), který je podrobně popsán v kapitole 4.2.2 Metodika studie 2.

Výsledky behaviorálních experimentů byly zpracovány ve statistickém programu Sigmastat v. 3.0. Celková lokomoce a PPI ASR byly analyzovány pomocí dvoucestné analýzy rozptylu (two-way ANOVA), kde dávka 2C-B byla jedním a čas po aplikaci látky druhým faktorem. Lokomoce v pětiminutových intervalech byla hodnocena pomocí dvojcestné RM (repeated measures) analýzy rozptylu (ANOVA), kde dávka 2C-B byla faktor mezi subjekty a časový interval faktor opakovaného měření. K analýze behaviorálních změn vyvolaných amfetaminem byla použita jednocestná analýza rozptylu (one-way ANOVA). Všechny analýzy byly následovány Newman-Keuls post hoc testem. Hladina významnosti byla stanovena jako  $p < 0,05$ .

Stereotaktická implantace elektrod, registrace EEG záznamu a následná analýza jsou podrobně popsány v kapitole 4.2.2 Metodika studie 2. Celková délka registrace EEG se v této studii lišila: 2C-B skupiny byly nahrávány 75 minut a amfetaminová skupina 45 minut. Testovaná látka byla aplikována v 10. minutě záznamu. K vlastní analýze EEG signálu byly použity následující úseky:

- 1) 0-10 minut (2C-B, amfetamin a vehikulum)
- 2) 25-35 minut (2C-B a vehikulum), 20-30 minut (amfetamin)
- 3) 35-45 minut (amfetamin a vehikulum)
- 4) 65-75 minut (2C-B a vehikulum)

V EEG experimentech každé zvíře sloužilo samo sobě jako kontrola. Data z prvních 10 minut záznamu (před aplikací látky) byla porovnávána s daty z dalších analyzovaných úseků (po aplikaci látky). Výsledky byly statisticky zhodnoceny v programech Neuroguide v. 2.4.6 (Applied Neuroscience Inc.) a Sigmastat v. 3.0. Výkonná spektra pro každé spektrální pásmo byla analyzována pomocí jednosměrné RM analýzy rozptylu (one-way RM ANOVA) s následným Newman-Keuls post hoc testem. Průměrný výkon byl vypočítán z individuálních hodnot jednotlivých elektrod u každého zvířete. EEG koherence byly analyzovány pomocí párového T testu. Hladina

významnosti byla stanovena jako  $p < 0,05$ . Family-wise error (FWE) a Bonferroniho korekce snížily hladinu významnosti na  $p < 0,015$ .

Kanyla pro mikrodialyzační experimenty byla potkanům zavedena v celkové isofluranové anestézii 7 dní před vlastní mikrodialýzou. Koordináty pro zavedení kanyly byly převzaty ze stereotaktického atlasu (Paxinos and Watson 2007):

NAc *shell*      anteriorně 1,2 mm, laterálně 2,0 mm, vertikálně -6,0 mm od bregmy

NAc *core*      anteriorně 2,0 mm, laterálně 1,2 mm, vertikálně -6,2 mm od bregmy

Dialyzační proby byly do kanyl zavedeny v mírné isofluranové anestézii. Proby byly následně spojeny s injekčními pumpami a perfundovány umělou cerebrospinální tekutinou rychlostí 2  $\mu$ l/min. Po 60 minutách proplachování byly dialyzáty sbírány v dvacetiminutových intervalech do plastických vialek obsahujících 15  $\mu$ l 0,1 M kyseliny chlorovodíkové, která zabraňuje dekompozici analytů. Bazální hladina dopaminu a jeho metabolitů byla stanovena z 3 vzorků, které byly odebrány před aplikací látky. Po aplikaci 2C-B 25 mg/kg s.c. bylo odebráno k analýze dalších 12 vzorků. Po skončení odběru vzorků byli potkani předávkováni isofluranovou anestézií, jejich mozky byly odebrány, fixovány v 10% formalínu a nakrájeny na kryostatu ve 40  $\mu$ m intervalech. Pomocí Nisslova barvení byla ve světelném mikroskopu Zeiss Axio Imager Z1 ověřena poloha dialyzačních prob. K stanovení hladin dopaminu a jeho metabolitů v NAc *core* byli po této verifikaci použiti 4 potkani a v NAc *shell* 5 potkanů. Ostatní potkani byli z analýzy vyřazeni.

Dopamin a jeho metabolity kyselina homovanilová (HVA), 3-metoxytyramin (3-MT) a kyselina 3,4-dihydroxyfenyloctová (DOPAC) byli ve vzorcích měřeny pomocí kapalinové chromatografie-hmotnostní spektrometrie (LC-MS), která je detailně popsána jinde (Syslova et al. 2011).

Vzhledem k nízkým počtům zvířat ve skupinách NAc *shell* a NAc *core* byly skupiny spojeny a analyzovány společně. Výsledky byly zpracovány v programu Statistica v. 9.0 (Statsoft) pomocí Friedmanovy RM analýzy rozptylu (RM ANOVA) s následným Wilcoxonovým párovým testem. Jako faktor opakovaného měření byl použit čas odebrání vzorku. Hladina významnosti byla stanovena jako  $p < 0,05$ .

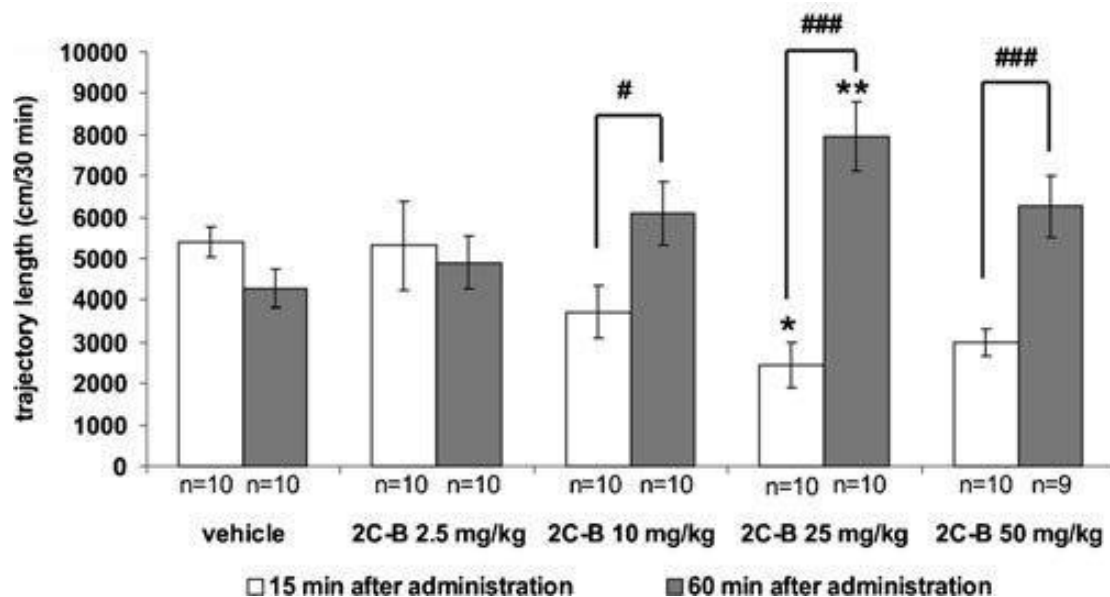


### 4.3.3 Výsledky studie 3

#### Lokomoce

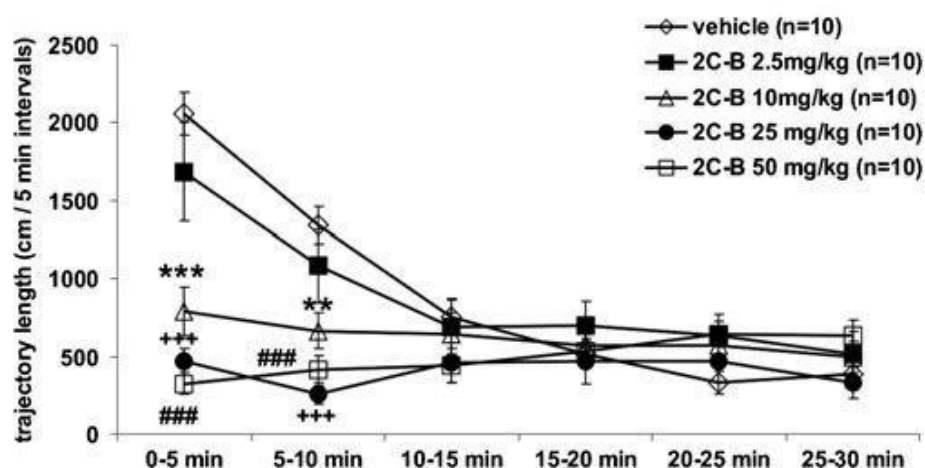
Two-way ANOVA odhalila interakci mezi faktory dávka a čas po aplikaci 2C-B ( $F(4,89)=8,15$ ;  $p<0,001$ ). Čas po aplikaci měl efekt na celkovou lokomoci ( $F(1,89)=20,24$ ;  $p<0,001$ ), nicméně dávka ne ( $F(4,89)=0,23$ ;  $p=0,92$ ). Post hoc analýza ukázala, že aplikace 2C-B 15 minut před měřením vedla ke snížení celkové lokomoce po dávce 25 mg/kg ( $p<0,05$ ), klesající trend byl přítomen i po dávce 50 mg/kg ( $p=0,06$ ). Ostatní dávky se v tomto časovém intervalu nelišily od kontrolní skupiny. Na druhou stranu, aplikace 2C-B 60 minut před měřením zvyšovala lokomoci po dávce 25 mg/kg ( $p<0,01$ ), zatímco ostatní dávky se nelišily od kontrolní skupiny. Porovnání obou časových designů ukázalo významně delší trajektorii 60 minut po aplikaci vyšších dávek 2C-B ( $p<0,05$  -  $p<0,001$ ). *Obrázek č. 10*

*Obrázek č. 10* Vliv 2C-B na lokomoci. Hodnoty (délka trajektorie v cm) představují průměr  $\pm$  SEM (\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$  od kontrolní skupiny; #  $p<0,05$ ; ###  $p<0,001$  mezi časovými intervaly).



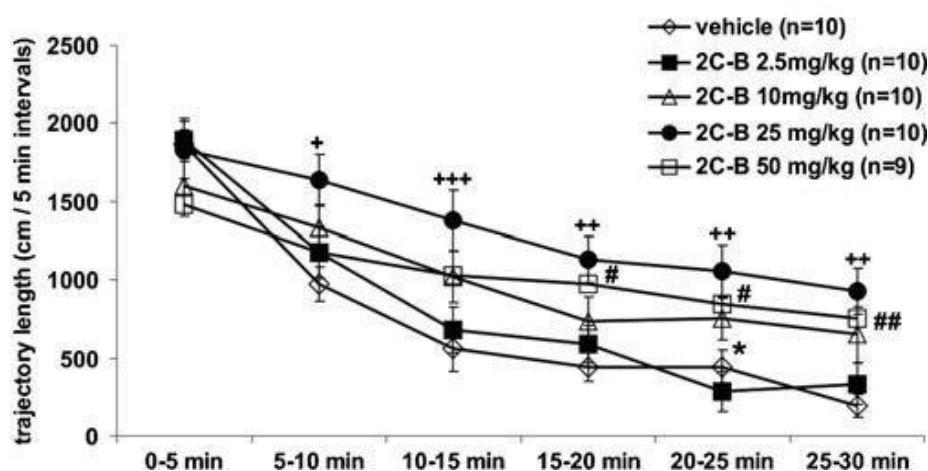
Analýza pětiminutových intervalů u potkanů s aplikací 2C-B 15 minut před experimentem (two-way RM ANOVA) zjistila interakci mezi faktory dávka a časový interval ( $F(20,225)=14,13$ ;  $p<0,001$ ) a stejně tak významný efekt dávky ( $F(4,225)=4,26$ ;  $p<0,01$ ) i časového intervalu ( $F(5,225)=30,32$ ;  $p<0,001$ ). Post hoc testy časového efektu ukázaly, že aplikace vehikula a 2C-B v dávce 2,5 mg/kg vedla k významnému zkrácování lokomoce ve všech následujících časových intervalech v porovnání s prvním (0-5 min;  $p<0,001$  pro všechny intervaly) a stejně tak druhým intervalem (5-10 min;  $p<0,01$  -  $p<0,001$ ). Po aplikaci vehikula se totéž ukázalo i u třetího intervalu (10-15 min) v porovnání s následujícími ( $p<0,01$ ). Lokomoce v pětiminutových intervalech byla u všech dalších dávek 2C-B téměř konstantní. Post hoc testy ukázaly, že během prvních dvou časových intervalů 2C-B v dávce 10 mg/kg, 25 mg/kg a 50 mg/kg významně zkracovalo trajektorii v porovnání s kontrolní skupinou ( $p<0,01$  -  $p<0,001$ ). *Obrázek č. 11a*

*Obrázek č. 11a* Vliv 2C-B podaného 15 minut před začátkem měření na lokomoci v pětiminutových intervalech. Hodnoty (délka trajektorie v cm/5 minut) představují průměr  $\pm$  SEM (\*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$  od kontrolní skupiny pro 2C-B 10 mg/kg; +++  $p<0,001$  od kontrolní skupiny pro 2C-B 25 mg/kg; ###  $p<0,001$  od kontrolní skupiny pro 2C-B 50 mg/kg).



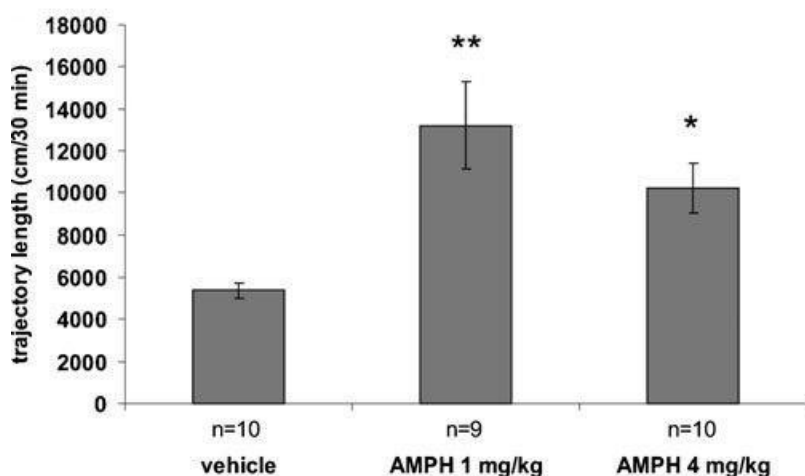
Analýza pětiminutových intervalů u potkanů s aplikací 2C-B 60 minut před experimentem (two-way RM ANOVA) také zjistila interakci mezi faktory dávka a časový interval ( $F(20,220)=3,54$ ;  $p<0,001$ ) a stejně tak významný efekt dávky ( $F(4,220)=4,14$ ;  $p<0,01$ ) i časového intervalu ( $F(5,220)=103,07$ ;  $p<0,001$ ). Podobně jako ve skupině aplikace 15 minut před experimentem, tak i v této dle post hoc testů vedla aplikace vehikula a 2C-B v dávce 2,5 mg/kg k postupnému zkracování lokomoce během druhého a třetího pětiminutového intervalu ( $p<0,05$  -  $p<0,001$ ). U vyšších dávek 2C-B docházelo na rozdíl od skupiny potkanů aplikovaných 15 minut před experimentem také ke zkracování lokomoce, ale méně výraznému než v nejnižší dávce ( $p<0,05$  -  $p<0,001$  v porovnání k prvním dvěma intervalům). Post hoc testy ukázaly, že od třetího intervalu až do konce měření 2C-B v dávce 10 mg/kg, 25 mg/kg a 50 mg/kg významně prodlužovalo trajektorii v porovnání s kontrolní skupinou ( $p<0,05$  -  $p<0,001$ ). *Obrázek č. 11b*

*Obrázek č. 11b* Vliv 2C-B podaného 60 minut před začátkem měření na lokomoci v pětiminutových intervalech. Hodnoty (délka trajektorie v cm/5 minut) představují průměr  $\pm$  SEM (\*  $p<0,05$  od kontrolní skupiny pro 2C-B 10 mg/kg; +  $p<0,05$ ; ++  $p<0,01$ ; +++  $p<0,001$  od kontrolní skupiny pro 2C-B 25 mg/kg; #  $p<0,05$ ; ##  $p<0,01$  od kontrolní skupiny pro 2C-B 50 mg/kg).



One-way ANOVA ukázala významný vliv dávky amfetaminu na lokomoci ( $F(2,28)=8,72$ ;  $p<0,001$ ). Dle post hoc testu obě dávky amfetaminu prodlužovaly trajektorii v porovnání s kontrolní skupinou ( $p<0,01$  -  $p < 0,001$ ). *Obrázek č. 12*

*Obrázek č. 12* Vliv amfetaminu na lokomoci. Hodnoty (délka trajektorie v cm) představují průměr  $\pm$  SEM (\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$  od kontrolní skupiny).



#### Thigmotaxe (*i*) a čas strávený v centru arény ( $T_{centre}$ )

Two-way ANOVA neodhalila žádnou interakci mezi faktory ( $F(4,89)=1,42$ ;  $p=0,23$ ), ani žádný vliv dávky 2C-B ( $F(4,89)=0,99$ ;  $p=0,42$ ) nebo času po aplikaci látky ( $F(1,89)=2,27$ ;  $p=0,14$ ) na thigmotaxi.

Nicméně two-way ANOVA zjistila interakci mezi faktory ( $F(4,89)=3,36$ ;  $p<0,05$ ) a vliv dávky 2C-B ( $F(4,89)=3,88$ ;  $p<0,01$ ) na čas strávený v centru arény. Vliv času po aplikaci látky nebyl významný ( $F(1,89)=2,17$ ;  $p=0,14$ ). Post hoc testy ukázaly, že dávka 50 mg/kg aplikovaná 15 minut před měřením zvyšovala čas strávený v centru arény (vehikulum 68,8 s vs. 2C-B 282,4 s;  $p<0,001$ ). Aplikace 2C-B 60 minut před měřením nevedla v porovnání s kontrolní skupinou k žádné změně.

### Akustická úleková reakce a prepulzní inhibice

Two-way ANOVA odhalila vliv dávky 2C-B ( $F(4,90)=6,22$ ;  $p<0,001$ ) a času po aplikaci ( $F(1,90)=11,14$ ;  $p<0,001$ ) na ASR, nicméně nezjistila žádnou interakci faktorů ( $F(1,90)=0,77$ ;  $p=0,55$ ). Post hoc test ukázal, že 2C-B významně snižuje úlekovou reakci u zvířat 15 i 60 minut po aplikaci ( $p<0,05$  -  $p<0,01$  s výjimkou skupiny 2C-B 50 mg/kg testované 60 minut po aplikaci). Efekt byl výraznější ve skupině 15 minut po aplikaci. *Tabulka č. 4*

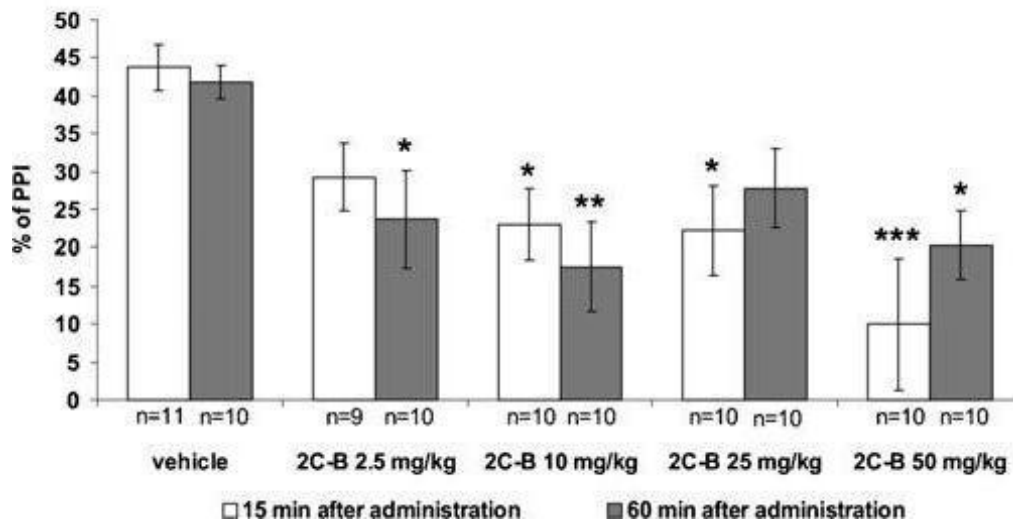
*Tabulka č. 4* Vliv 2C-B na ASR potkana. Hodnoty představují průměr amplitudy (arbitrární jednotky)  $\pm$  SEM (\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$  od kontrolní skupiny).

Čas aplikace	Vehikulum	2C-B			
		2,5 mg/kg	10 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
15 min	84,80 $\pm$ 7,67	53,78 $\pm$ 8,11 *	37,48 $\pm$ 7,92 **	44,40 $\pm$ 8,47 *	35,54 $\pm$ 5,25 **
60 min	103,62 $\pm$ 22,51	58,92 $\pm$ 8,49 *	60,86 $\pm$ 6,33 *	65,80 $\pm$ 7,67 *	77,20 $\pm$ 11,32

Two-way ANOVA dále ukázala vliv dávky 2C-B na PPI ( $F(4,90)=7,86$ ;  $p<0,001$ ), ale nikoliv vliv času po aplikaci látky ( $F(1,90)=0,027$ ;  $p=0,87$ ) ani žádnou interakci faktorů ( $F(4,90)=0,87$ ;  $p=0,48$ ). Dle post hoc testu se od kontrolní skupiny výrazně lišila zvířata s dávkami 10 mg/kg, 25 mg/kg a 50 mg/kg s aplikací 15 minut před měřením ( $p<0,05$  -  $p<0,001$ ). Ve skupině s aplikací 60 minut před měřením se výrazně od kontrolní skupiny lišila zvířata s dávkami 2,5 mg/kg, 10 mg/kg a 50 mg/kg ( $p<0,05$  -  $p<0,01$ ), zatímco ve skupině s dávkou 25 mg/kg byl pozorován pouze trend ( $p=0,06$ ). *Obrázek č. 13*

V případě amfetaminu one-way ANOVA prokázala významné snížení ASR ( $F(2,27)=4,75$ ;  $p<0,05$ ), nicméně pouze u dávky 4 mg/kg byl tento výsledek signifikantní ( $p<0,05$ ). Stejně tak je poškozena i PPI ( $F(2,27)=3,94$ ;  $p<0,05$ ), ale opět pouze u dávky 4 mg/kg ( $p<0,05$ ). *Tabulka č. 5 a Obrázek č. 14*

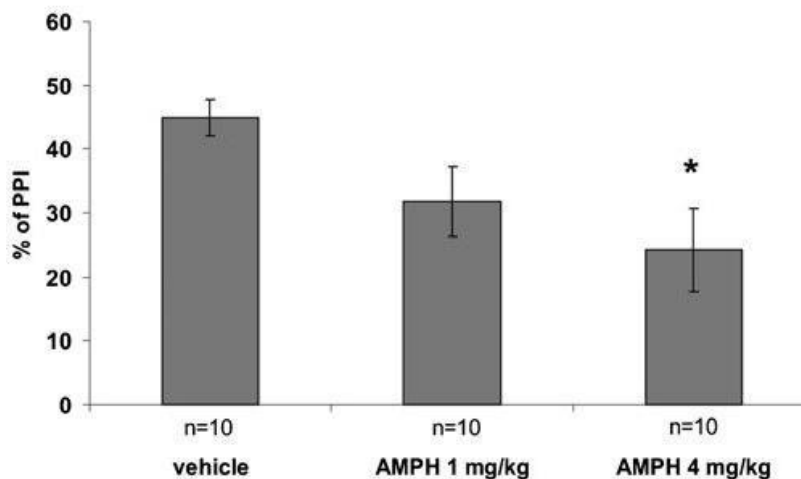
Obrázek č. 13 Vliv 2C-B na PPI ASR potkana. Hodnoty (%PPI) představují průměr ± SEM (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 od kontrolní skupiny).



Tabulka č. 5 Vliv amfetaminu na ASR potkana. Hodnoty představují průměr amplitudy (arbitrární jednotky) ± SEM (\* p<0,05 od kontrolní skupiny).

Vehikulum	Amfetamin 1 mg/kg	Amfetamin 4 mg/kg
83,26±10,21	91,38±18,08	149,12±21,41 *

Obrázek č. 14 Vliv amfetaminu na PPI ASR potkana. Hodnoty (%PPI) představují průměr ± SEM (\* p<0,05 od kontrolní skupiny).

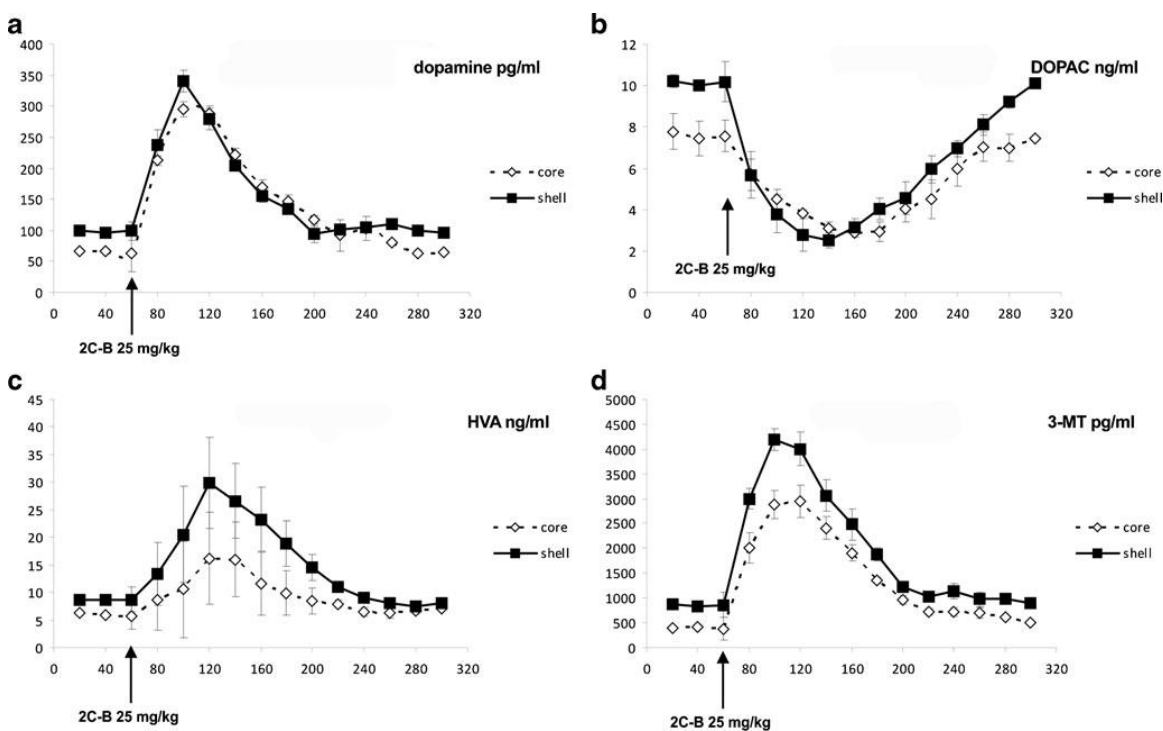


## Hladiny dopaminu a jeho metabolitů v mikrodialyzátu

Friedmanova RM ANOVA zjistila vliv aplikace 2C-B na hladiny dopaminu a všech jeho metabolitů ( $X^2=99,3$  (dopamin), 108,8 (DOPAC), 65,5 (HVA), 113,6 (3-MT),  $sv=14$ ,  $p<0,001$  pro všechny monoaminy).

2C-B v dávce 25 mg/kg významně zvýšilo hladiny dopaminu v obou sledovaných kompartmentech NAc (až 4,5x více v porovnání s bazální hodnotou;  $p<0,05$  -  $p<0,001$ ). Zvýšení hladin dopaminu v dialyzátu přetrvalo 120 minut po aplikaci látky. Podobné změny byly pozorovány i u metabolitů dopaminu HVA (až 6x více v porovnání s bazální hodnotou;  $p<0,05$  -  $p<0,001$ ) a 3-MT (až 7x více v porovnání s bazální hodnotou;  $p<0,05$  -  $p<0,001$ ). Naopak hladiny DOPAC poklesly na 38% bazální hodnoty v NAc *core* a 25% v NAc *shell*. Obrázek č. 15

Obrázek č. 15 Vliv 2C-B v dávce 25 mg/kg na hladiny dopaminu, DOPAC, HVA a 3-MT v NAc *core* a *shell* v mozkových mikrodialyzátech. První tři body každé křivky představují bazální hladinu. Hodnoty (pg/ml nebo ng/ml) představují průměr  $\pm$  SEM. a) dopamin, b) DOPAC, c) HVA, d) 3-MT



## EEG spektra

One-way RM ANOVA odhalila vliv 2C-B 10 mg/kg na průměrný výkon v pásmu beta ( $F(2,16)=4,96$ ;  $p<0,05$ ), vysoká beta ( $F(2,16)=9,63$ ;  $p<0,01$ ) a gama ( $F(2,16)=16,81$ ;  $p<0,001$ ). Dle post hoc testu došlo k významnému snížení výkonu v pásmech beta, vysoká beta a gama ( $p<0,05$  -  $p<0,001$ ). Tento efekt se objevil téměř nad všemi elektrodami obou hemisfér v počáteční fázi působení látky (15-25 minut po aplikaci) i později (55-65 minut po aplikaci). *Obrázek č. 16a*

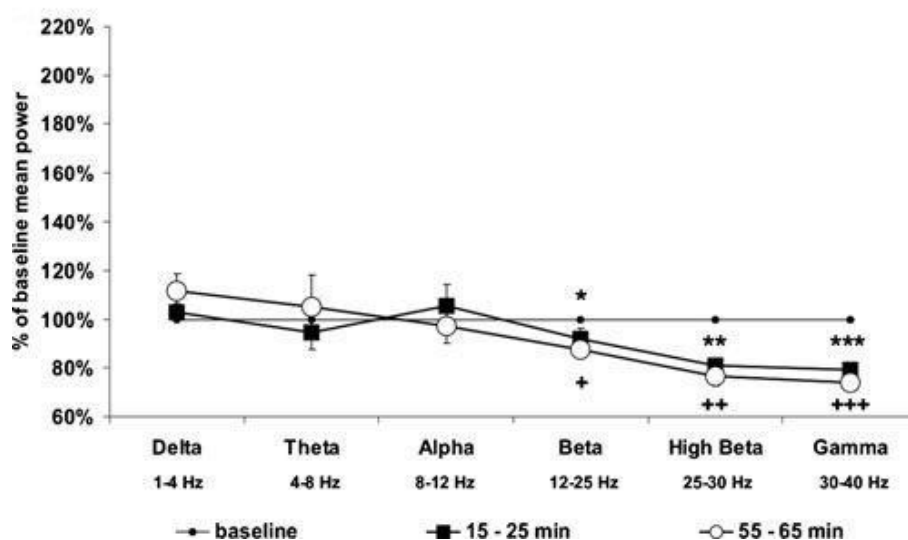
2C-B 50 mg/kg mělo vliv na průměrný výkon v pásmech theta ( $F(2,14)=4,44$ ,  $p<0,05$ ), beta ( $F(2,14)=6,24$ ;  $p<0,05$ ), vysoká beta ( $F(2,14)=6,74$ ;  $p<0,01$ ) a gama ( $F(2,14)=4,97$ ;  $p<0,05$ ). Post hoc test zjistil, že v počáteční fázi působení látky (15-25 minut po aplikaci) došlo k významnému poklesu výkonu až na 76,3% bazální hodnoty v pásmech beta, vysoká beta a gama ( $p<0,05$  -  $p<0,01$ ), zatímco v pozdější fázi (55-65 minut po aplikaci) byl významný pokles výkonu pouze v pásmu vysoká beta ( $p<0,05$ ) a naopak zvýšení v pásmu theta ( $p<0,05$ ). Změny výkonu (zvýšení či snížení) byly přítomné téměř nad všemi elektrodami obou hemisfér. *Obrázek č. 16b*

Amfetamin 4 mg/kg měl vliv na výkon v pásmech theta ( $F(2,18)=6,66$ ;  $p<0,01$ ), alfa ( $F(2,18)=4,58$ ;  $p<0,05$ ) a beta ( $F(2,18)=4,03$ ;  $p<0,05$ ). Dle post hoc testu, v počáteční fázi působení látky (10-20 minut po aplikaci) amfetamin významně zvýšil průměrný výkon v pásmech theta ( $p<0,01$ ) a alfa ( $p<0,05$ ). Toto zvýšení přetrvávalo v obou pásmech ( $p<0,05$ ) i v pozdější fázi (25-35 minut po aplikaci). Zároveň se objevilo snížení výkonu v pásmu beta ( $p<0,05$ ). Nejvýrazněji se zvýšení výkonu projevilo nad parietálními elektrodami obou hemisfér, zatímco snížení v pásmu beta nad parietálními a frontálními elektrodami. *Obrázek č. 17*

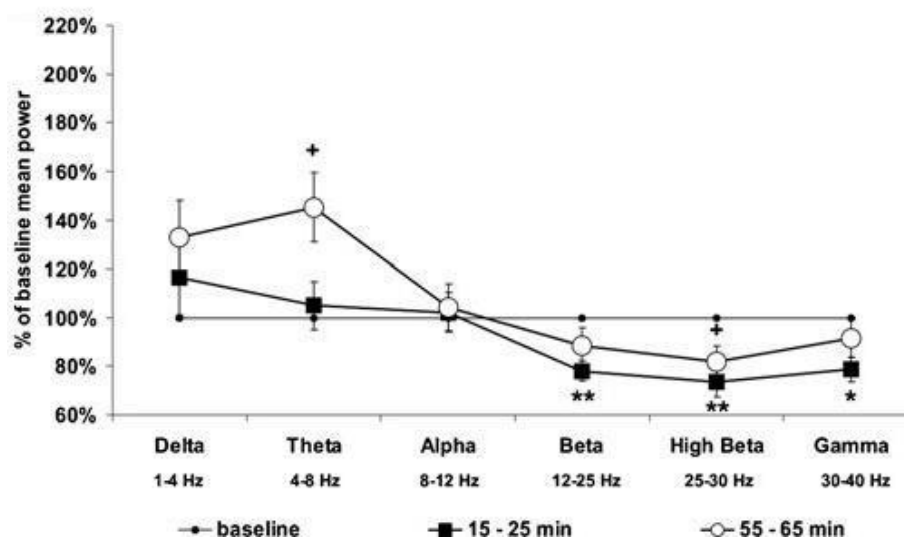
Aplikace vehikula vedla ke změnám výkonu v pásmech vysoká beta ( $F(3,27)=5,07$ ;  $p<0,01$ ) a gama ( $F(3,27)=4,57$ ;  $p=0,01$ ). Post hoc test ukázal, že nedošlo k žádným významným změnám v časných fázích (15-25 minut a 25-35 minut po aplikaci), nicméně později (55-65 minut po aplikaci) poklesl průměrný výkon v pásmech vysoká beta a gama ( $p<0,01$ ). Pokles v pásmu beta byl konkrétně pozorován nad frontálními a parietálními elektrodami, kdežto v pásmu gama nad všemi elektrodami. *Obrázek č. 18*



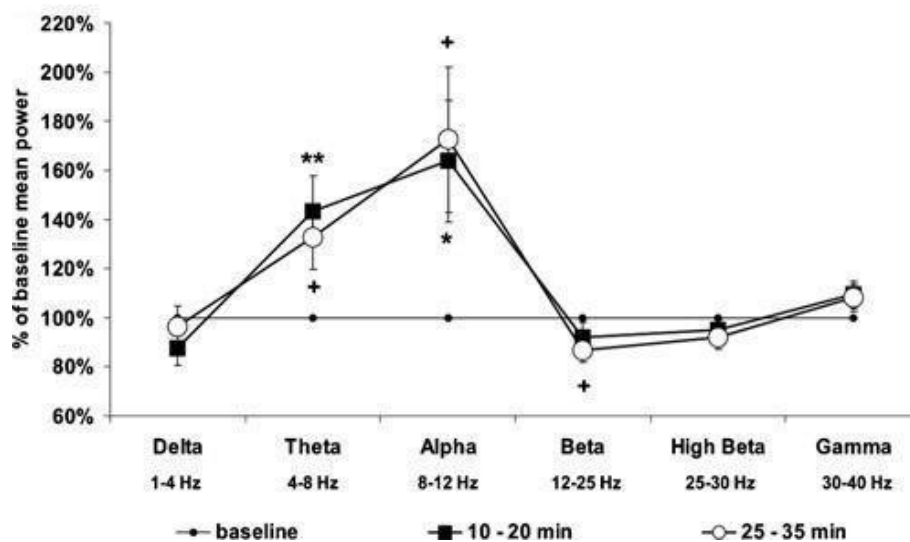
Obrázek č. 16a Výkonná spektra u 2C-B 10 mg/kg. Hodnoty (% změny) představují průměr ± SEM (\* 0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001 od klidového záznamu 15-25 minut po aplikaci; + 0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001 od klidového záznamu 55-65 minut po aplikaci).



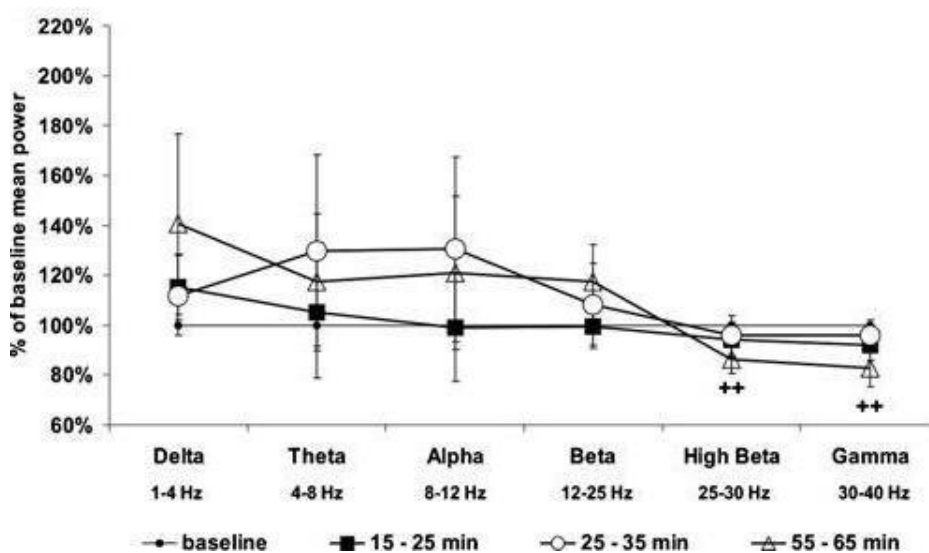
Obrázek č. 16b Výkonná spektra u 2C-B 50 mg/kg. Hodnoty (% změny) představují průměr ± SEM (\* 0,05; \*\* p<0,01 od klidového záznamu 15-25 minut po aplikaci; + p<0,05 od klidového záznamu 55-65 minut po aplikaci).



Obrázek č. 17 Výkonná spektra u amfetaminu. Hodnoty (% změny) představují průměr  $\pm$  SEM (\*\*  $p < 0,01$  od klidového záznamu 10-20 minut po aplikaci; +  $p < 0,05$  od klidového záznamu 25-35 minut po aplikaci).



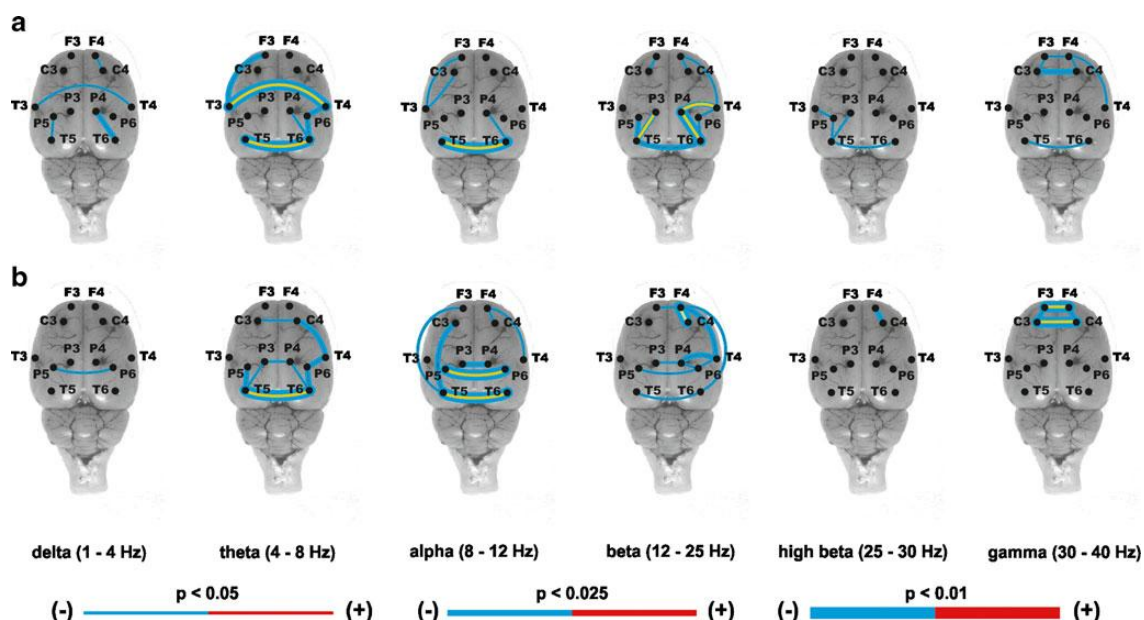
Obrázek č. 18 Výkonná spektra u vehikula. Hodnoty (% změny) představují průměr  $\pm$  SEM (++)  $p < 0,01$  od klidového záznamu 55-65 minut po aplikaci).



## EEG koherence

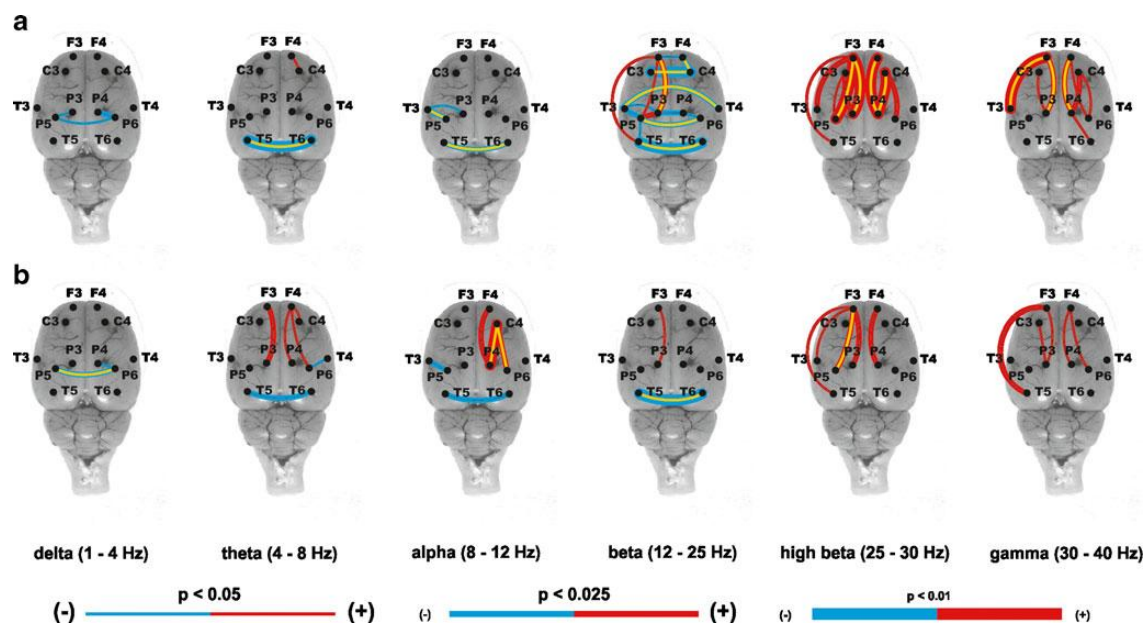
Aplikace 2C-B 10 mg/kg vyvolala pokles koherencí ve všech frekvenčních pásmech. Během počáteční fáze (15-25 minut po aplikaci) byl nejvýraznější pokles pozorován v interhemisferálních temporálních koherencích a intrahemisferálních parieto-temporálních a fronto-temporálních koherencích. V pásmech beta, vysoká beta a gama došlo také k poklesu inter- a intrahemisferálních koherencí frontálně. V pozdější fázi (55-65 minut po aplikaci) tento trend pokračoval. Navíc poklesly interhemisferální temporální a parietální koherence a intrahemisferální parieto-temporální a fronto-temporální koherence. *Obrázek č. 19*

*Obrázek č. 19* Signifikantní změny intra- a interhemisferálních koherencí po podání 2C-B 10mg/kg a) 15-25 minut a b) 55-65 minut po aplikaci ve srovnání s klidovým záznamem (před aplikací látek). Modrá barva vyznačuje snížení koherencí, červená zvýšení koherencí. Síla čáry určuje statistickou významnost. Žlutá čára značí, že data přežila FWE korekci.



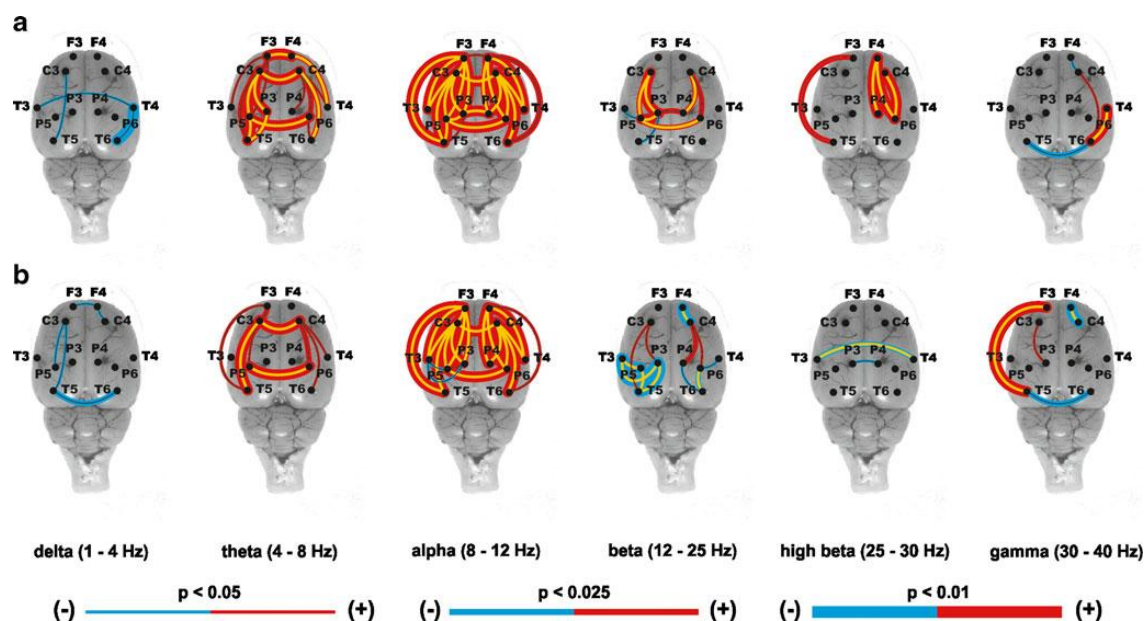
Aplikace 2C-B v dávce 50 mg/kg indukovala pokles i vzestup koherencí mezi elektrodami. Během počáteční fáze (15-25 minut po aplikaci) došlo k poklesu frontálních, temporálních a parietálních interhemisferálních koherencí v pásmech delta, theta, alfa a nejvýrazněji v pásmu beta. Ve vyšších frekvenčních pásmech (beta a vyšší) došlo k dominantnímu zvýšení intrahemisferálních fronto-temporálních a fronto-parietálních koherencí. V pozdější fázi (55-65 minut po aplikaci) se objevovaly podobné změny. Pokles v temporálních interhemisferálních koherencích pokračoval, avšak v pásmu beta se objevovalo méně změn. Vzestup intrahemisferálních fronto-parietálních koherencí byl méně významný a posunul se také do nižších spekter (theta a alfa). *Obrázek č. 20*

*Obrázek č. 20* Signifikantní změny intra- a interhemisferálních koherencí po podání 2C-B 50mg/kg a) 15-25 minut a b) 55-65 minut po aplikaci ve srovnání s klidovým záznamem (před aplikací látek). Modrá barva vyznačuje snížení koherencí, červená zvýšení koherencí. Síla čáry určuje statistickou významnost. Žlutá čára značí, že data přežila FWE korekci.



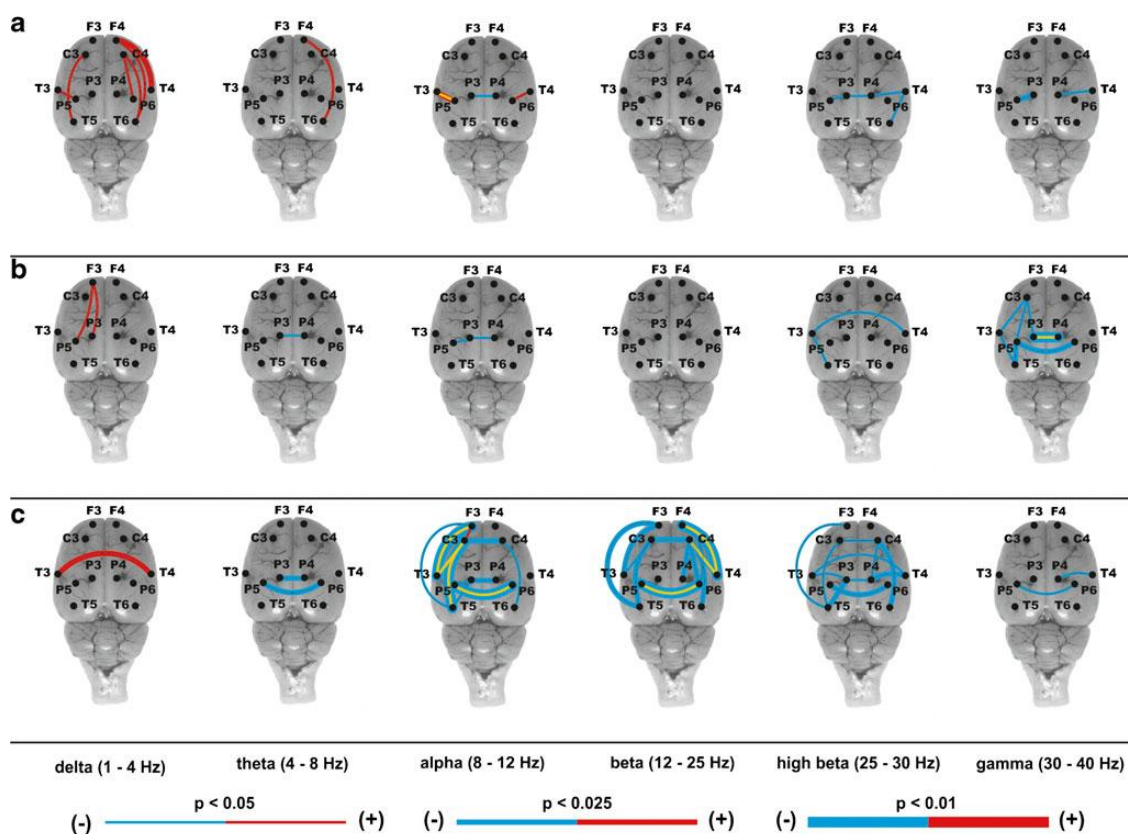
Aplikace amfetaminu v dávce 4 mg/kg v časné fázi (10-20 minut po aplikaci) globálně zvyšovala koherence v pásmech theta a alfa. Zvýšení bylo také patrné v pásmech beta, vysoká beta a gama. Malá snížení se vyskytovala pouze v pásmech delta, beta a gama. V pozdější fázi (25-35 minut po aplikaci) byl směr změn podobný v pásmech delta, theta, alfa a gama, ovšem v pásmech beta a vysoká beta došlo k výraznému poklesu koherencí. *Obrázek č. 21*

*Obrázek č. 21* Signifikantní změny intra- a interhemisferálních koherencí po podání amfetaminu a) 10-20 minut a b) 25-35 minut po aplikaci ve srovnání s klidovým záznamem (před aplikací látky). Modrá barva vyznačuje snížení koherencí, červená zvýšení koherencí. Síla čáry určuje statistickou významnost. Žlutá čára značí, že data přežila FWE korekci.



Aplikace vehikula vyvolala pouze mírné změny koherencí v časných fázích (15-25 minut a 25-35 minut po aplikaci). Jednalo se zejména o zvýšení intrahemisferálních fronto-temporálních koherencí v pásmech delta a theta. Byl pozorován také pokles koherencí v pásmech vysoká beta a gama, zejména 25-35 minut po aplikaci. V pozdější fázi (55-65 minut) se objevil vzestup interhemisferálních temporálních koherencí v pásmu delta a pokles koherencí v pásmech alfa, beta a vysoká beta. Jednalo se o interhemisferální frontální, parietální a temporální koherence a intrahemisferální fronto-temporální a fronto-parietální koherence. Malé poklesy byly pozorovány také v pásmech theta a gama. *Obrázek č. 22*

*Obrázek č. 22* Signifikantní změny intra- a interhemisferálních koherencí po podání vehikula a) 15-25 minut, b) 25-35 minut a c) 55-65 minut po aplikaci ve srovnání s klidovým záznamem (před aplikací látky). Modrá barva vyznačuje snížení koherencí, červená zvýšení koherencí. Síla čáry určuje statistickou významnost. Žlutá čára značí, že data přežila FWE korekci.



#### 4.3.4 Diskuze studie 3

Aplikace 2C-B vedla k počátečnímu poklesu lokomoce s následným vzestupem po 60 minutách. Hyperlokomoce, nejvýraznější u dávky 25 mg/kg, časově korelovala s výdejem dopaminu a předpokládanou maximální koncentrací 2C-B v mozku (Rohanova et al. 2008). Snížení habituace po vyšších dávkách je jasně viditelné na lokomoční křivce. Podobný efekt jsme ve stejném testu objevili i u dalšího halucinogenu mezkalinu (Palenicek et al. 2008). Časově a dávkově závislý bifázický účinek (hypolokomoce následovaná hyperlokomocí) byl popsán i u dalších psychedelik (Geyer et al. 1979; Krebs-Thomson et al. 1998; Palenicek et al. 2010), avšak nikoliv u entaktogenů a amfetaminu. Méně výrazné zvýšení lokomoce a více času stráveného v centru arény u dávky 50 mg/kg lze připsat výskytu stereotypického chování, které je pro psychedelika, entaktogeny a stimulanty charakteristické (Gold et al. 1989; Paulus and Geyer 1992), nebo také snížení úzkosti (Bourin et al. 2007; Palenicek et al. 2008).

Deficit PPI je odrazem poškození sensorimotorického zpracování informací (Swerdlow et al. 2000), které je typicky vyvoláváno halucinogeny, entaktogeny a stimulanty - tedy látkami, které primárně ovlivňují serotonergní a dopaminergní systém (Swerdlow et al. 2003; Bubenikova et al. 2005; Palenicek et al. 2008). V našem experimentu vedla aplikace 2C-B k deficitu PPI, který byl zejména při nástupu účinku doprovázen poklesem úlekové reakce. Možným vysvětlením snížené úlekové reakce je pokles úzkosti (Bourin et al. 2007), tedy podobný mechanismus, jaký vedl k prodloužení času stráveného v centru arény v testu otevřeného pole. Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že 2C-B snižuje úzkost také v testu ultrasonické vokalizace (Kubesova et al. 2011) a že jeho amfetaminový derivát 4-iodo-2,5-dimetylamfetamin (DOI) vykazuje anxiolytické účinky v různých testech (Masse et al. 2007a; Masse et al. 2007b). Měření úlekové reakce 60 minut po aplikaci 2C-B ukázalo sice menší změny, nicméně deficit PPI přetrvával.

Aplikace 2C-B v dávce 25 mg/kg v našem experimentu vedla ke zvýšení výdeje dopaminu v NAc, z čehož usuzujeme, že tato struktura je pravděpodobně funkčně zapojena do pozorovaných změn lokomoce a sensorimotorického zpracování informací, stejně jako do psychomimetického a adiktivního potenciálu 2C-B. Pozorovaný pokles hladin metabolitu DOPAC nás dovedl k závěru, že aplikace 2C-B má inhibiční vliv na

enzym monoaminoxidáza (MAO). Zvýšení hladiny 3-MT naopak ukazuje na to, že funkce enzymu katechol-O-metyltransferáza (COMT) zůstala zachována. Neobjasněno zůstává, jak došlo ke zvýšení hladiny finálního produktu metabolismu dopaminu HVA. Konverze 3-MT na HVA je katalyzována pomocí MAO (Youdim and Riederer 2004), která má 2 izoformy. Je možné, že 2C-B ovlivňuje pouze jednu z nich (Kalgutkar et al. 2001). Vzhledem ke strukturální podobnosti 2C-B a amfetaminu je dalším možným vysvětlením zvýšených hladin dopaminu v našem experimentu změna funkce dopaminového transportéru.

Analýza dat z EEG části našeho experimentu ukazuje, že v prvních 30 minutách po aplikaci vehikula u kontrolních zvířat nedocházelo k žádným specifickým změnám. Hodinu po aplikaci se však začal objevovat pokles výkonu v pásmech vysoká beta a gama, zvýšení výkonu v pásmu delta a pokles koherencí v pásmech alfa až vysoká beta. Předpokládáme, že podkladem těchto nálezů jsou spánkové změny (Maloney et al. 1997; Vyazovskiy et al. 2004). Potkani v kontrolní skupině museli být během pozdějších fází nahrávání opakovaně buzení. Docházelo tak u nich pravděpodobně k mírné spánkové deprivaci, která mohla vyvolat výše zmíněné EEG změny (Everson et al. 1989a; Everson et al. 1989b).

Aplikace 2C-B vyvolala pokles EEG výkonu ve vysokých frekvenčních pásmech s výjimkou dávky 50 mg/kg 60 minut po aplikaci, kdy došlo ke zvýšení výkonu v pásmu theta. Stejně zvýšení, spolu se zvýšením v pásmu alfa, je popisováno u amfetaminu jako theta/alfa peak a nejspíše odráží lokomoční aktivitu zvířat (Young 1988). Je možné, že theta/alfa peak je zároveň korelátem zvýšené bdělosti (Ambrosini et al. 1994). Některé z našich behaviorálních nálezů, kdy se při aktivitě zvířat objevuje 7-8 Hz peak, tuto hypotézu podporují (Palenicek et al. 2011b). Ve stejném časovém úseku, tedy přibližně hodinu po aplikaci 2C-B, dochází také k maximálnímu výdeji dopaminu v NAc, což může být neurobiologickým podkladem těchto změn. Také další studie s fenyletylaminy a LSD popsaly zvýšení výkonu v pásmu alfa spíše v pozdějších fázích a nikoliv při nástupu účinku látek (Dimpfel et al. 1988; Dimpfel et al. 1989), podobně je tomu i se zvýšením behaviorální aktivity (Geyer et al. 1979; Marona-Lewicka et al. 2005). S výjimkou theta/alfa peaku byl celkový pokles EEG výkonu, jaký v našem experimentu vyvolala aplikace 2C-B, popsán i u dalších psychedelik (LSD, DOB, mezkalin, psilocin) a entaktogenů (MBDB, MDMA) (Dimpfel et al. 1988;



Dimpfel et al. 1989; Tyls et al. 2011; Fujakova et al. 2011). Pravděpodobným vysvětlením tohoto poklesu může být serotonergní mechanismus psychedelických látek, jako je například stimulace serotoninových 5-HT<sub>2A/C</sub> receptorů.

Stejně jako změny v behaviorálních experimentech, tak i změny mozkové konektivity byly závislé na dávce a čase. Hlavním nálezem byla konzistentní diskonekce po aplikaci 2C-B v dávce 10 mg/kg, kdežto dávka 50 mg/kg vedla ke zvýšení konektivity ve vyšších částech spektra. Vzhledem k nedostatku podobných experimentů je obtížné porovnat naše výsledky s výsledky jiných autorů. V našem předchozím experimentu jsme objevili zvýšení koherencí po aplikaci ketaminu, kterou doprovázela zvýšená lokomoční aktivita (Palenicek et al. 2011a). Zvýšená koherence spojená se zvýšenou behaviorální aktivitou byla pozorovaná také v dalších studiích (Maloney et al. 1997; Palenicek et al. 2011b). Zvýšení koherencí po aplikaci 2C-B v dávce 50 mg/kg a po aplikaci amfetaminu může být odrazem hyperlokomočního účinku těchto látek a zároveň může mít spojitost se zvýšením hladin dopaminu v NAc. Snížení koherencí u nižší dávky 2C-B (10 mg/kg) je obdobné jako u jiných serotonergních halucinogenů (LSD, DOB, mezkalin, psilocin) (Tyls et al. 2011; Fujakova et al. 2011).

Synchronní gama a theta oscilace mají spojitost s kognitivními funkcemi a zpracováním prostorové reprezentace (Lisman and Buzsaki 2008). Poruchy oscilací, které jsme pozorovali v naší spektrální a koherenční analýze, mohou mít tedy vztah k poškozenému zpracování informací a lze je asociovat s našimi pozorovanými behaviorálními změnami (změny lokomoce, stereotypie, poškození PPI) a předpokládat, že odrážejí psychedelický potenciál 2C-B.

#### **4.3.5 Závěr studie 3**

2C-B je účinná centrálně aktivní látka, která vyvolává behaviorální, neurochemické a elektrofyziologické změny srovnatelné s účinky dalších halucinogenů, ale také entaktogenů a psychostimulantů. Tato látka má časově a dávkově závislý bifázický mechanismus účinku, který je pravděpodobně spojen s rozdíly v časovém zapojení serotonergního a dopaminergního systému.

2C-B ovlivnilo oba behaviorální parametry, na které jsme se v naší studii zaměřili. Aplikace této látky vedla k časově a dávkově bifázickému účinku na lokomoci, kdy hypolokomoce byla následována hyperlokomocí, a k poškození sensorimotorického zpracování informací v testu prepulzní inhibice akustické úlekové reakce. Tyto behaviorální nálezy potvrzují první dvě z našich hypotéz.

EEG nálezy v této studii dále ukázaly významný vliv 2C-B na funkční konektivitu mozku, což potvrzuje další z našich hypotéz. Změny ve funkční konektivitě lze dát do spojitosti s poškozením sensorimotorického zpracování informací a s psychedelickým potenciálem látky. Stejně jako v behaviorálních, tak i v EEG experimentech byl pozorován bifázický účinek. EEG změny zároveň vykazovaly velmi zajímavou časovou spojitost s lokomočními změnami.

Také poslední z našich hypotéz se potvrdila. Pomocí mikrodialýzy jsme prokázali změny hladin dopaminu a jeho metabolitů v NAc. Předpokládáme, že 2C-B ovlivňuje metabolismus dopaminu zejména inhibicí MAO. Změny v dopaminergním systému mohou být podkladem adiktivního a psychomimetického účinku této látky.

## 5 SPOLEČNÁ DISKUZE A ZHODNOCENÍ CÍLŮ PRÁCE

Předkládaná disertační práce je souborem tří původních publikací věnovaných studiu schizofrenie z hlediska histomorfologického, biochemického a behaviorálního profilu animálních modelů.

Cílem studie 1 bylo objasnění vlivu časně imunitní stimulace na biochemické, histopatologické a morfologické změny v mozku dospělého potkana a jejich potenciální vztah k psychopatologii. V této studii jsme potvrdili naši hypotézu, že v animálním modelu vyvolaném časnou imunitní stimulací dochází ke změnám mozkových a plasmatických hladin neurotransmiterů, které mají úlohu v patologii psychotických onemocnění. Dále dochází k aktivaci kynureninové cesty metabolismu tryptofanu projevující se jako zvýšení hladin kynureninu a metabolitů z inflamatorní části kynureninové dráhy. Toto zvýšení může být zprostředkováno enzymy, které jsou aktivovány prozánětlivými cytokiny (Campbell et al. 2014), jejichž elevace byla naší skupinou v tomto modelu popsána již dříve (Tejkalová et al. 2010). Perinatální expozice LPS vedla u dospělých zvířat v několika studiích k redukci počtu dopaminergních buněk v substantia nigra, která byla dávana do spojitosti s chronickou mikroglální aktivací v této oblasti (Fan et al. 2011a; Fan et al. 2011b; Cai et al. 2013). V naší studii jsme potvrdili snížení počtu dopaminergních buněk v substantia nigra, nicméně morfologie mikroglíí v celém mozku odpovídala klidovému stavu. Dospěli jsme tak k podobnému výsledku jako nedávná studie, která u dospělých myší po perinatální expozici LPS nezjistila změny v mikroglální denzitě a počtu mikroglíí v porovnání s kontrolní skupinou (Smith et al. 2014). Úbytek dopaminergních buněk může mít nicméně spojitost s přechodem astrocytů do reaktivního stavu, tak jak jsme popsali v substantia nigra a v hipokampu zvířat ze skupiny LPS, vzhledem k tomu, že astrocyty in vitro produkují neurotoxické molekuly jako NO, TNF $\alpha$  a reaktivní formy kyslíku (Carson et al. 2006). Jedním z nejzajímavějších nálezů naší studie je redukce hipokampálního objemu v dospělosti potkanů. Pokud je nám známo, tak naše studie je první, která tuto redukci popisuje nikoliv pouze po intracerebrální injekci (Wang et al. 2013), ale po systémové postnatální aplikaci, která lépe napodobuje perinatální infekci. Redukce objemu hipokampu je spojená s celou řadou neuropsychiatrických onemocnění

včetně schizofrenie (Laakso et al. 1996; Bremner et al. 2000; Brambilla et al. 2008; Woon et al. 2010; Haukvik et al. 2013) a může být podkladem kognitivního poškození u pacientů (Small et al. 2011).

Cílem studie 2 bylo porovnání vlivu psilocinu a mezkalinu na prepulzní inhibici akustické úlekové reakce a funkční konektivitu mozku u dospělého potkana. Deficit prepulzní inhibice akustické úlekové reakce vyvolaný podáním halucinogenů psilocinu a mezkalinu byl popsán u halucinogenů již dříve (Vollenweider et al. 1998; Palenicek et al. 2008). Tento behaviorální znak, který je pravděpodobně zprostředkovaný agonismem na 5-HT<sub>2A</sub> receptoru (Marek and Aghajanian 1996; Nichols 2004), se vyskytuje i u pacientů se schizofrenií a lze tak hovořit o fenomenologické validitě tohoto modelu. Mezkalin v naší studii narušoval prepulzní inhibici poněkud výrazněji než psilocin. Možné však je, že námi zvolené dávky psilocinu byly příliš nízké, nebo že časový interval nahrávání neodpovídal dobře, kdy psilocin dosahuje nejvyšších hladin v mozku. Dalším znakem podporujícím validitu tohoto serotoninového modelu schizofrenie jsou změny v EEG výkonových spektrech, zejména snížení výkonu v pásmu gama (Williams and Boksa 2010), a snížení frontotemporální konektivity. Tyto znaky jsou u nemocných asociovány s kognitivním poškozením a deficitem ve zpracování informací (Gonzalez-Burgos et al. 2010; Gandal et al. 2012).

Cílem studie 3 byla analýza vlivu 2C-B na lokomoci, prepulzní inhibici akustické úlekové reakce, hladiny dopaminu a jeho metabolitů v nucleus accumbens a funkční konektivitu mozku u dospělého potkana. Časově a dávkově bifázický účinek 2C-B na lokomoci (hypolokomoce následovaná hyperlokomocí) byl popsán i u dalších halucinogenů (Geyer et al. 1979; Krebs-Thomson et al. 1998; Palenicek et al. 2010). Hyperlokomoce v této studii navíc korelovala s výdejem dopaminu a předpokládanou maximální koncentrací 2C-B v mozku (Rohanova et al. 2008). V souladu s naším očekáváním byl také deficit prepulzní inhibice akustické úlekové reakce, který je typický pro látky ovlivňující serotonergní a dopaminergní systém (Swerdlow et al. 2003; Bubenikova et al. 2005; Palenicek et al. 2008). Zvýšení výdeje dopaminu v nucleus accumbens po aplikaci 2C-B ukazuje na pravděpodobné zapojení této struktury do pozorovaných behaviorálních změn. Naopak pokles hladiny metabolitu DOPAC je odrazem možného inhibičního vlivu 2C-B na enzym monoaminoxidáza. Maximální výdej dopaminu navíc u vyšší dávky 2C-B časově koreloval se zvýšením EEG výkonu

v pásmu theta. Tzv. theta/alfa peak byl popsán i po aplikaci amfetaminu a nejspíš odráží zvýšenou lokomoční aktivitu (Young 1988) nebo bdělost zvířat (Ambrosini et al. 1994). S výjimkou theta/alfa peaku docházelo spíše k celkovému poklesu EEG výkonu, který je charakteristický pro látky se serotonergním mechanismem účinku (Dimpfel et al. 1988; Dimpfel et al. 1989; Tyls et al. 2011; Fujakova et al. 2011). Zajímavým nálezem bylo snížení EEG konektivity v nižších dávkách, obdobné jako u jiných serotonergních halucinogenů (Tyls et al. 2011; Fujakova et al. 2011), a naopak zvýšení EEG konektivity ve vyšších dávkách, které je pravděpodobně odrazem zvýšené behaviorální aktivity a výdeje dopaminu (Maloney et al. 1997; Palenicek et al. 2011a; Palenicek et al. 2011b).

## 6 SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

### Publikace in extenso se vztahem k tématu disertační práce

#### a) s IF

**Kubešová, A.**, Tejkalová, H., Syslová, K., Kačer, P., Voundroušová, J., Tylš, F., Fujáková, M., Páleníček, T., Horáček, J. Biochemical, Histopathological and Morphological Profiling of a Rat Model of Early Immune Stimulation: Relation to Psychopathology. PLoS ONE 2015; 10(1): e0115439. **IF (2013) 3.534**

Páleníček, T., Fujáková, M., Brunovský, M., Horáček, J., Gorman, I., Balíková, M., Rambousek, L., Syslová, K., Kačer, P., Zach, P., Bubeníková-Valešová, V., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Puskarčíková, J., Höschl, C. Behavioral, Neurochemical and Pharmacological EEG Profiles of the Psychedelic Drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in Rats. Psychopharmacology (Berl) 2013; 225 (1): 75-93. **IF (2013) 3.988**

#### b) bez IF

Páleníček, T., Fujáková, M., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Brunovský, M., Horáček, J. Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a sensorimotorické zpracování informací - animální model psychózy. Psychiatrie 2011; 15 (suppl. 2): 44-48.

### Publikace in extenso bez vztahu k tématu disertační práce

#### a) s IF

Fujáková, M., Páleníček, T., Brunovský, M., Gorman, I., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Řípková, D., Krajča, V., Horáček, J. The effect of ((-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid (LY379268), an mGlu2/3 receptor agonist, on EEG power spectra and coherence in ketamine model of psychosis. Pharmacol Biochem Behav 2014; 122C: 212-221. **IF (2014) 2.781**

**Kubešová, A.**, Bubeníková-Valešová, V., Mertlová, M., Páleníček, T., Horáček, J. Impact of psychotropic drugs on adult hippocampal neurogenesis. Neurosci Res 2012; 72 (2): 93-98. **IF (2012) 2.204**

**b) bez IF**

Nováková, P., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Kadeřábek, L., Fujáková, M., Páleníček, T. Role kanabinoidů a kanabinoidního systému v indukci, neurobiologii a terapii psychotických onemocnění. *Psychiatrie*, 2014; 18(4):186-192.

**Kubešová, A.**, Horáček, J. Vliv psychotropních látek na neurogenezi v dospělém savčím hipokampu. *Psychiatrie* 2013; 17 (1): 18-21.

**Kubešová, A.** Vliv kofeinové terapie u předčasně narozených dětí na neuroprotektci. *Psychiatrie* 2012; 16 (2): 120.

## LITERATURA

- Acuna-Castillo,C, Villalobos,C, Moya,PR, Saez,P, Cassels,BK, Huidobro-Toro,JP. Differences in potency and efficacy of a series of phenylisopropylamine/phenylethylamine pairs at 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2002;136: 510-519.
- Adriano,F, Caltagirone,C, Spalletta,G. Hippocampal volume reduction in first-episode and chronic schizophrenia: a review and meta-analysis. *Neuroscientist.* 2012;18: 180-200.
- Aghajanian,GK, Marek,GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2000;31: 302-312.
- Akbarian,S, Huntsman,MM, Kim,JJ, Tafazzoli,A, Potkin,SG, Bunney,WE, Jr., Jones,EG. GABAA receptor subunit gene expression in human prefrontal cortex: comparison of schizophrenics and controls. *Cereb. Cortex* 1995;5: 550-560.
- Akbarian,S, Sucher,NJ, Bradley,D, Tafazzoli,A, Trinh,D, Hetrick,WP, Potkin,SG, Sandman,CA, Bunney,WE, Jr., Jones,EG. Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J. Neurosci.* 1996;16: 19-30.
- Al-Amin,HA, Weinberger,DR, Lipska,BK. Exaggerated MK-801-induced motor hyperactivity in rats with the neonatal lesion of the ventral hippocampus. *Behav. Pharmacol.* 2000;11: 269-278.
- Almeida-Montes,LG, Valles-Sanchez,V, Moreno-Aguilar,J, Chavez-Balderas,RA, Garcia-Marin,JA, Cortes Sotres,JF, Hheinze-Martin,G. Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and to suicide attempts. *J. Psychiatry Neurosci.* 2000;25: 371-377.
- Altamura,CA, Mauri,MC, Ferrara,A, Moro,AR, D'Andrea,G, Zamberlan,F. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. *Am. J. Psychiatry* 1993;150: 1731-1733.
- Ambrosini,MV, Gambelunghe,C, Mariucci,G, Bruscellini,G, Adami,M, Giuditta,A. Sleep-wake variables and EEG power spectra in Mongolian gerbils and Wistar rats. *Physiol Behav* 1994;56: 963-968.
- Andreasen,NC, Nopoulos,P, Magnotta,V, Pierson,R, Ziebell,S, Ho,BC. Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2011;70: 672-679.
- Andreasen,NC, Paradiso,S, O'Leary,DS. "Cognitive dysmetria" as an integrative theory of schizophrenia: a dysfunction in cortical-subcortical-cerebellar circuitry? *Schizophr. Bull.* 1998;24: 203-218.
- Angrist,BM, Gershon,S. The phenomenology of experimentally induced amphetamine psychosis--preliminary observations. *Biol. Psychiatry* 1970;2: 95-107.
- Angrist,BM, Schweitzer,JW, Gershon,S, Friedhoff,AJ. Mephentermine psychosis: misuse of the Wyamine inhaler. *Am. J. Psychiatry* 1970;126: 1315-1317.
- Arrue,A, Davila,R, Zumarraga,M, Basterreche,N, Gonzalez-Torres,MA, Goienetxea,B, Zamalloa,MI, Anguiano,JB, Guimon,J. GABA and homovanillic acid in the plasma of Schizophrenic and bipolar I patients. *Neurochem. Res.* 2010;35: 247-253.
- Austin,CP, Ky,B, Ma,L, Morris,JA, Shughrue,PJ. Expression of Disrupted-In-Schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development. *Neuroscience* 2004;124: 3-10.



- Bankovská-Motlová,L, Spaniel,F. Schizofrenie: Jak předejít relapsu aneb terapie pro 21.století. Mladá fronta a.s., 2011.
- Bayer,TA, Buslei,R, Havas,L, Falkai,P. Evidence for activation of microglia in patients with psychiatric illnesses. *Neurosci. Lett.* 1999;271: 126-128.
- Bechter,K. Updating the mild encephalitis hypothesis of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2013;42: 71-91.
- Bechter,K, Reiber,H, Herzog,S, Fuchs,D, Tumani,H, Maxeiner,HG. Cerebrospinal fluid analysis in affective and schizophrenic spectrum disorders: identification of subgroups with immune responses and blood-CSF barrier dysfunction. *J. Psychiatr. Res.* 2010;44: 321-330.
- Becker,A, Grecksch,G. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 2004;28: 1267-1277.
- Begic,D, Hotujac,L, Jokic-Begic,N. Quantitative EEG in 'positive' and 'negative' schizophrenia. *Acta Psychiatr. Scand.* 2000;101: 307-311.
- Bell,C, Abrams,J, Nutt,D. Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Br. J. Psychiatry* 2001;178: 399-405.
- Benes,FM. Neurobiological investigations in cingulate cortex of schizophrenic brain. *Schizophr. Bull.* 1993;19: 537-549.
- Benes,FM. Evidence for altered trisynaptic circuitry in schizophrenic hippocampus. *Biol. Psychiatry* 1999;46: 589-599.
- Bernstein,HG, Steiner,J, Guest,PC, Dobrowolny,H, Bogerts,B. Glial cells as key players in schizophrenia pathology: recent insights and concepts of therapy. *Schizophr. Res.* 2014.
- Bilbo,SD, Schwarz,JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav. Neurosci.* 2009;3: 14.
- Bitanirhwe,BK, Peleg-Raibstein,D, Mouttet,F, Feldon,J, Meyer,U. Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2010;35: 2462-2478.
- Bloomfield,C, French,SJ, Jones,DN, Reavill,C, Southam,E, Cilia,J, Totterdell,S. Chandelier cartridges in the prefrontal cortex are reduced in isolation reared rats. *Synapse* 2008;62: 628-631.
- Bohmer,C, Broer,A, Munzinger,M, Kowalczyk,S, Rasko,JE, Lang,F, Broer,S. Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19). *Biochem. J.* 2005;389: 745-751.
- Bourin,M, Petit-Demouliere,B, Dhonnchadha,BN, Hascoet,M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2007;21: 567-574.
- Boutros,NN, Arfken,C, Galderisi,S, Warrick,J, Pratt,G, Iacono,W. The status of spectral EEG abnormality as a diagnostic test for schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2008;99: 225-237.
- Braff,DL, Geyer,MA. Acute and chronic LSD effects on rat startle: data supporting an LSD--rat model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 1980;15: 909-916.

- Brambilla,P, Hatch,JP, Soares,JC. Limbic changes identified by imaging in bipolar patients. *Curr. Psychiatry Rep.* 2008;10: 505-509.
- Bremner,JD, Narayan,M, Anderson,ER, Staib,LH, Miller,HL, Charney,DS. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am. J. Psychiatry* 2000;157: 115-118.
- Brisch,R, Saniotis,A, Wolf,R, Bielau,H, Bernstein,HG, Steiner,J, Bogerts,B, Braun,AK, Jankowski,Z, Kumaritlake,J, Henneberg,M, Gos,T. The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Front Psychiatry* 2014;5: 47.
- Bronson,ME, Jiang,W, DeRuiter,J, Clark,CR. A behavioral comparison of Nexus, cathinone, BDB, and MDA. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995;51: 473-475.
- Brown,AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* 2011;93: 23-58.
- Bsibsi,M, Persoon-Deen,C, Verwer,RW, Meeuwssen,S, Ravid,R, Van Noort,JM. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia* 2006;53: 688-695.
- Bubenikova,V, Votava,M, Horacek,J, Palenicek,T. Relation of sex and estrous phase to deficits in prepulse inhibition of the startle response induced by ecstasy (MDMA). *Behav Pharmacol* 2005;16: 127-130.
- Bubenikova-Valesova,V, Horacek,J, Vrajova,M, Hoschl,C. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008;32: 1014-1023.
- Burnet,PW, Eastwood,SL, Harrison,PJ. 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1996;15: 442-455.
- Burnet,PW, Eastwood,SL, Harrison,PJ. [3H]WAY-100635 for 5-HT1A receptor autoradiography in human brain: a comparison with [3H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem. Int.* 1997;30: 565-574.
- Busse,S, Busse,M, Schiltz,K, Bielau,H, Gos,T, Brisch,R, Mawrin,C, Schmitt,A, Jordan,W, Muller,UJ, Bernstein,HG, Bogerts,B, Steiner,J. Different distribution patterns of lymphocytes and microglia in the hippocampus of patients with residual versus paranoid schizophrenia: further evidence for disease course-related immune alterations? *Brain Behav. Immun.* 2012;26: 1273-1279.
- Cacci,E, Claasen,JH, Kokaia,Z. Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* 2005;80: 789-797.
- Cai,HL, Zhu,RH, Li,HD, Zhang,XH, Hu,L, Yang,W, Ye,HS. Elevated plasma gamma-aminobutyrate/glutamate ratio and responses to risperidone antipsychotic treatment in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 2010;34: 1273-1278.
- Cai,Z, Fan,LW, Kaizaki,A, Tien,LT, Ma,T, Pang,Y, Lin,S, Lin,RC, Simpson,KL. Neonatal systemic exposure to lipopolysaccharide enhances susceptibility of nigrostriatal dopaminergic neurons to rotenone neurotoxicity in later life. *Dev. Neurosci.* 2013;35: 155-171.
- Cameron,HA, Gould,E. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience* 1994;61: 203-209.
- Campbell,BM, Charych,E, Lee,AW, Moller,T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front Neurosci.* 2014;8: 12.

- Carlsson,A, Waters,N, Holm-Waters,S, Tedroff,J, Nilsson,M, Carlsson,ML. Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 2001;41: 237-260.
- Carpenter,WT, Koenig,JI. The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. *Neuropsychopharmacology* 2008;33: 2061-2079.
- Carson,MJ, Thrash,JC, Walter,B. The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin. Neurosci. Res.* 2006;6: 237-245.
- Casanova,MF, Stevens,JR, Kleinman,JE. Astrocytosis in the molecular layer of the dentate gyrus: a study in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1990;35: 149-166.
- Cassidy,AW, Mulvany,SK, Pangalos,MN, Murphy,KJ, Regan,CM. Developmental emergence of reelin deficits in the prefrontal cortex of Wistar rats reared in social isolation. *Neuroscience.* 2010;166: 377-385.
- Cattabeni,F, Abbracchio,MP, Cimino,M, Cocchi,D, Di,LM, Mennuni,L, Rosi,F, Zaratini,P. Methylazoxymethanol-induced microencephaly: persistent increase of cortical somatostatin-like immunoreactivity. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1989;47: 156-159.
- Cattabeni,F, DiLuca,M. Developmental models of brain dysfunctions induced by targeted cellular ablations with methylazoxymethanol. *Physiol Rev.* 1997;77: 199-215.
- Catts,VS, Wong,J, Fillman,SG, Fung,SJ, Weickert,CS. Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: Association with neuroinflammation. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* 2014.
- Caudevilla-Galligo,F, Riba,J, Ventura,M, Gonzalez,D, Farre,M, Barbanj,MJ, Bouso,JC. 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): presence in the recreational drug market in Spain, pattern of use and subjective effects. *J. Psychopharmacol.* 2012;26: 1026-1035.
- Chambers,RA, Moore,J, McEvoy,JP, Levin,ED. Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1996;15: 587-594.
- Chiarugi,A, Meli,E, Moroni,F. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *J. Neurochem.* 2001;77: 1310-1318.
- Chung,DW, Yoo,KY, Hwang,IK, Kim,DW, Chung,JY, Lee,CH, Choi,JH, Choi,SY, Youn,HY, Lee,IS, Won,MH. Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus. *Cell Mol. Neurobiol.* 2010;30: 531-541.
- Colin-Gonzalez,AL, Maldonado,PD, Santamaria,A. 3-Hydroxykynurenine: an intriguing molecule exerting dual actions in the central nervous system. *Neurotoxicology* 2013;34: 189-204.
- Cosenza-Nashat, M, Zhao, ML, Suh, HS, Morgan, J, Natividad, R, Morgello, S, Lee SC. Expression of the translocator protein of 18 kDa by microglia, macrophages and astrocytes based on immunohistochemical localization in abnormal human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2009;35: 306-328.
- Cosgrove,J, Newell,TG. Recovery of neuropsychological functions during reduction in use of phencyclidine. *J. Clin. Psychol.* 1991;47: 159-169.

- Craig,A, Ling,LN, Beardsley,DJ, Wingate-Pearse,N, Walker,DW, Hohimer,AR, Back,SA. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp. Neurol.* 2003;181: 231-240.
- Creese,I, Burt,DR, Snyder,SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 1976;192: 481-483.
- Davis,KL, Stewart,DG, Friedman,JI, Buchsbaum,M, Harvey,PD, Hof,PR, Buxbaum,J, Haroutunian,V. White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch. Gen. Psychiatry* 2003;60: 443-456.
- de Boer,D, Bosman,I. A new trend in drugs-of-abuse; the 2C-series of phenethylamine designer drugs. *Pharm. World Sci.* 2004;26: 110-113.
- Deutch,AY, Cameron,DS. Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience* 1992;46: 49-56.
- Dimpfel,W, Spuler,M, Borbe,HO. Monitoring of the effects of antidepressant drugs in the freely moving rat by radioelectroencephalography (tele-stereo-EEG). *Neuropsychobiology* 1988;19: 116-120.
- Dimpfel,W, Spuler,M, Nichols,DE. Hallucinogenic and stimulatory amphetamine derivatives: fingerprinting DOM, DOI, DOB, MDMA, and MBDB by spectral analysis of brain field potentials in the freely moving rat (Tele-Stereo-EEG). *Psychopharmacology (Berl)* 1989;98: 297-303.
- Dold,M, Li,C, Tardy,M, Khorsand,V, Gillies,D, Leucht,S. Benzodiazepines for schizophrenia. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* 2012;11: CD006391.
- Dong,Y, Benveniste,EN. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001;36: 180-190.
- Doorduyn, J, de Vries, EF, Willemsen, AT, de Groot, JC, Dierckx, RA, Klein, HC. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. *J Nucl Med.* 2009;50: 1801-1807.
- Doosti,MH, Bakhtiari,A, Zare,P, Amani,M, Majidi-Zolbanin,N, Babri,S, Salari,AA. Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2013;43: 55-65.
- Duan,X, Chang,JH, Ge,S, Faulkner,RL, Kim,JY, Kitabatake,Y, Liu,XB, Yang,CH, Jordan,JD, Ma,DK, Liu,CY, Ganesan,S, Cheng,HJ, Ming,GL, Lu,B, Song,H. Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 2007;130: 1146-1158.
- Dursun,SM, Szemis,A, Andrews,H, Whitaker,P, Reveley,MA. Effects of clozapine and typical antipsychotic drugs on plasma 5-HT turnover and impulsivity in patients with schizophrenia: a cross-sectional study. *J. Psychiatry Neurosci.* 2000;25: 347-352.
- Dworkin,RH, Opler,LA. Simple schizophrenia, negative symptoms, and prefrontal hypodopaminergia. *Am. J. Psychiatry* 1992;149: 1284-1285.
- Egerton,A, Reid,L, McKerchar,CE, Morris,BJ, Pratt,JA. Impairment in perceptual attentional set-shifting following PCP administration: a rodent model of set-shifting deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179: 77-84.
- Eriksson,PS, Perfilieva,E, Bjork-Eriksson,T, Alborn,AM, Nordborg,C, Peterson,DA, Gage,FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 1998;4: 1313-1317.

- Everson,CA, Bergmann,BM, Rechtschaffen,A. Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 1989a;12: 13-21.
- Everson,CA, Gilliland,MA, Kushida,CA, Pilcher,JJ, Fang,VS, Refetoff,S, Bergmann,BM, Rechtschaffen,A. Sleep deprivation in the rat: IX. Recovery. *Sleep* 1989b;12: 60-67.
- Eyjolfsson,EM, Brenner,E, Kondziella,D, Sonnewald,U. Repeated injection of MK801: an animal model of schizophrenia? *Neurochem. Int.* 2006;48: 541-546.
- Falkai,P, Honer,WG, Kamer,T, Dustert,S, Vogeley,K, Schneider-Axmann,T, Dani,I, Wagner,M, Rietschel,M, Muller,DJ, Schulze,TG, Gaebel,W, Cordes,J, Schonell,H, Schild,HH, Block,W, Traber,F, Steinmetz,H, Maier,W, Tepest,R. Disturbed frontal gyrification within families affected with schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 2007;41: 805-813.
- Fan,LW, Tien,LT, Lin,RC, Simpson,KL, Rhodes,PG, Cai,Z. Neonatal exposure to lipopolysaccharide enhances vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neurons to rotenone neurotoxicity in later life. *Neurobiol. Dis.* 2011a;44: 304-316.
- Fan,LW, Tien,LT, Zheng,B, Pang,Y, Lin,RC, Simpson,KL, Ma,T, Rhodes,PG, Cai,Z. Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity. *Brain Behav. Immun.* 2011b;25: 286-297.
- Featherstone,RE, Rizos,Z, Kapur,S, Fletcher,PJ. A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behav. Brain Res.* 2008;189: 170-179.
- Feleder,C, Tseng,KY, Calhoon,GG, O'Donnell,P. Neonatal intrahippocampal immune challenge alters dopamine modulation of prefrontal cortical interneurons in adult rats. *Biol. Psychiatry* 2010;67: 386-392.
- Fiore,M, Grace,AA, Korf,J, Stampachiachiere,B, Aloe,L. Impaired brain development in the rat following prenatal exposure to methylazoxymethanol acetate at gestational day 17 and neurotrophin distribution. *Neuroreport* 2004;15: 1791-1795.
- Fletcher,PJ, Tenn,CC, Rizos,Z, Lovic,V, Kapur,S. Sensitization to amphetamine, but not PCP, impairs attentional set shifting: reversal by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;183: 190-200.
- Fone,KC, Porkess,MV. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2008;32: 1087-1102.
- Forno,LS, DeLanney,LE, Irwin,I, Di,MD, Langston,JW. Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 1992;94: 429-436.
- Fortier,ME, Joobar,R, Luheshi,GN, Boksa,P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *J. Psychiatr. Res.* 2004;38: 335-345.
- Fujakova,M, Palenicek,T, Tyls,F, Kubesova,A, Brunovsky,M, Krajca,V, Horacek,J. The effect of phenylethylamine hallucinogens on quantitative electroencephalography and behavior in rats. *Behav Pharmacol* 22, 38. 2011.
- Gandal,MJ, Edgar,JC, Klook,K, Siegel,SJ. Gamma synchrony: towards a translational biomarker for the treatment-resistant symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology* 2012;62: 1504-1518.

- Gauthier,C, Hassler,C, Mattar,L, Launay,JM, Callebert,J, Steiger,H, Melchior,JC, Falissard,B, Berthoz,S, Mourier-Soleillant,V, Lang,F, Delorme,M, Pommereau,X, Gerardin,P, Bioulac,S, Bouvard,M, Godart,N. Symptoms of depression and anxiety in anorexia nervosa: links with plasma tryptophan and serotonin metabolism. *Psychoneuroendocrinology* 2014;39: 170-178.
- Gerez,M, Tello,A. Selected quantitative EEG (QEEG) and event-related potential (ERP) variables as discriminators for positive and negative schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 1995;38: 34-49.
- Geyer,MA. Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry* 1998;31 Suppl 2: 73-79.
- Geyer,MA, Braff,DL. Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. *Schizophr. Bull.* 1987;13: 643-668.
- Geyer,MA, Krebs-Thomson,K, Braff,DL, Swerdlow,NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156: 117-154.
- Geyer,MA, Light,RK, Rose,GJ, Petersen,LR, Horwitt,DD, Adams,LM, Hawkins,RL. A characteristic effect of hallucinogens on investigatory responding in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1979;65: 35-40.
- Gold,LH, Geyer,MA, Koob,GF. Neurochemical mechanisms involved in behavioral effects of amphetamines and related designer drugs. *NIDA Res. Monogr* 1989;94: 101-126.
- Gonzalez-Burgos,G, Hashimoto,T, Lewis,DA. Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Curr. Psychiatry Rep.* 2010;12: 335-344.
- Guillemin,GJ. Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J.* 2012;279: 1356-1365.
- Gulyas,B, Pavlova,E, Kasa,P, Gulya,K, Bakota,L, Varszegi,S, Keller,E, Horvath,MC, Nag,S, Hermeecz,I, Magyar,K, Halldin,C. Activated MAO-B in the brain of Alzheimer patients, demonstrated by [<sup>11</sup>C]-L-deprenyl using whole hemisphere autoradiography. *Neurochem. Int.* 2011;58: 60-68.
- Haroutunian,V, Davis,KL. Introduction to the special section: Myelin and oligodendrocyte abnormalities in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007;10: 499-502.
- Harrison,PJ. Neurochemical alterations in schizophrenia affecting the putative receptor targets of atypical antipsychotics. Focus on dopamine (D1, D3, D4) and 5-HT<sub>2a</sub> receptors. *Br. J. Psychiatry Suppl* 1999; 12-22.
- Harrison,PJ. Postmortem studies in schizophrenia. *Dialogues. Clin. Neurosci.* 2000;2: 349-357.
- Harrison,PJ. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174: 151-162.
- Harrison,PJ, Law, AJ. Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology. *Biol Psychiatry.* 2006;60: 132-140.
- Harrison,PJ, McLaughlin,D, Kerwin,RW. Decreased hippocampal expression of a glutamate receptor gene in schizophrenia. *Lancet* 1991;337: 450-452.
- Harrison,PJ, Weinberger,DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry* 2005;10: 40-68.

- Hartberg,CB, Sundet,K, Rimol,LM, Haukvik,UK, Lange,EH, Nesvag,R, Melle,I, Andreassen,OA, Agartz,I. Subcortical brain volumes relate to neurocognition in schizophrenia and bipolar disorder and healthy controls. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2011;35: 1122-1130.
- Harte,MK, Powell,SB, Swerdlow,NR, Geyer,MA, Reynolds,GP. Deficits in parvalbumin and calbindin immunoreactive cells in the hippocampus of isolation reared rats. *J. Neural Transm.* 2007;114: 893-898.
- Haukvik,UK, Hartberg,CB, Agartz,I. Schizophrenia--what does structural MRI show? *Tidsskr. Nor Laegeforen.* 2013;133: 850-853.
- Haukvik,UK, McNeil,T, Nesvag,R, Soderman,E, Jonsson,E, Agartz,I. No effect of obstetric complications on basal ganglia volumes in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2010;34: 619-623.
- Haukvik,UK, Westlye,LT, Morch-Johnsen,L, Jorgensen,KN, Lange,EH, Dale,AM, Melle,I, Andreassen,OA, Agartz,I. In Vivo Hippocampal Subfield Volumes in Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Biol. Psychiatry* 2014.
- Heidbreder,CA, Weiss,IC, Domeney,AM, Pryce,C, Homberg,J, Hedou,G, Feldon,J, Moran,MC, Nelson,P. Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 2000;100: 749-768.
- Hertz,L, Schousboe,I, Hertz,L, Schousboe,A. Receptor expression in primary cultures of neurons or astrocytes. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1984;8: 521-527.
- Hertzmann,M, Reba,RC, Kotlyarov,EV. Single photon emission computed tomography in phencyclidine and related drug abuse. *Am. J. Psychiatry* 1990;147: 255-256.
- Heyes,MP, Chen,CY, Major,EO, Saito,K. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochem. J.* 1997;326 ( Pt 2): 351-356.
- Heyes,MP, Saito,K, Major,EO, Milstien,S, Markey,SP, Vickers,JH. A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease. Attenuation of synthesis from L-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Brain* 1993;116 ( Pt 6): 1425-1450.
- Hof,PR, Haroutunian,V, Copland,C, Davis,KL, Buxbaum,JD. Molecular and cellular evidence for an oligodendrocyte abnormality in schizophrenia. *Neurochem. Res.* 2002;27: 1193-1200.
- Hof,PR, Haroutunian,V, Friedrich,VL, Jr., Byne,W, Buitron,C, Perl,DP, Davis,KL. Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2003;53: 1075-1085.
- Holub,D, Flegel,J, Dragomirecka,E, Rodriguez,M, Preiss,M, Novak,T, Cermak,J, Horacek,J, Kodym,P, Libiger,J, Hoschl,C, Motlova,LB. Differences in onset of disease and severity of psychopathology between toxoplasmosis-related and toxoplasmosis-unrelated schizophrenia. *Acta Psychiatr. Scand.* 2013;127: 227-238.
- Horacek,J, Flegel,J, Tintera,J, Verebova,K, Spaniel,F, Novak,T, Brunovsky,M, Bubenikova-Valesova,V, Holub,D, Palenicek,T, Hoschl,C. Latent toxoplasmosis reduces gray matter density in schizophrenia but not in controls: voxel-based-morphometry (VBM) study. *World J. Biol. Psychiatry* 2012;13: 501-509.

- Horga,G, Bernacer,J, Dusi,N, Entis,J, Chu,K, Hazlett,EA, Haznedar,MM, Kemether,E, Byne,W, Buchsbaum,MS. Correlations between ventricular enlargement and gray and white matter volumes of cortex, thalamus, striatum, and internal capsule in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2011;261: 467-476.
- Huang,F, Li,J, Shi,HL, Wang,TT, Muhtar,W, Du,M, Zhang,BB, Wu,H, Yang,L, Hu,ZB, Wu,XJ. Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC-MS/MS. *J. Neurosci. Methods* 2014;229: 8-14.
- Issa,F, Gerhardt,GA, Bartko,JJ, Suddath,RL, Lynch,M, Gamache,PH, Freedman,R, Wyatt,RJ, Kirsh,DG. A multidimensional approach to analysis of cerebrospinal fluid biogenic amines in schizophrenia: I. Comparisons with healthy control subjects and neuroleptic-treated/unmedicated pairs analyses. *Psychiatry Res.* 1994;52: 237-249.
- Jaaro-Peled,H. Gene models of schizophrenia: DISC1 mouse models. *Prog Brain Res.* 2009;179: 75-86.
- Jack,CS, Arbour,N, Manusow,J, Montgrain,V, Blain,M, McCrea,E, Shapiro,A, Antel,JP. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J. Immunol.* 2005;175: 4320-4330.
- Japha,K, Koch,M. Picrotoxin in the medial prefrontal cortex impairs sensorimotor gating in rats: reversal by haloperidol. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;144: 347-354.
- Javitt,DC, Zukin,SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 1991;148: 1301-1308.
- Jones,CA, Watson,DJ, Fone,KC. Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 2011;164: 1162-1194.
- Kalgutkar,AS, Dalvie,DK, Castagnoli,N, Jr., Taylor,TJ. Interactions of nitrogen-containing xenobiotics with monoamine oxidase (MAO) isozymes A and B: SAR studies on MAO substrates and inhibitors. *Chem. Res. Toxicol.* 2001;14: 1139-1162.
- Kalinichev,M, Robbins,MJ, Hartfield,EM, Maycox,PR, Moore,SH, Savage,KM, Austin,NE, Jones,DN. Comparison between intraperitoneal and subcutaneous phencyclidine administration in Sprague-Dawley rats: a locomotor activity and gene induction study. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008;32: 414-422.
- Karl,T, Arnold,JC. Schizophrenia: a consequence of gene-environment interactions? *Front Behav Neurosci.* 2014;8: 435.
- Karlsodt,KH, Robleto,K, Trantham-Davidson,H, Jairl,C, Cannon,TD, Lavin,A, Jentsch,JD. Reduced dysbindin expression mediates N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction and impaired working memory performance. *Biol Psychiatry.* 2011;69: 28-34.
- Kempermann,G, Jessberger,S, Steiner,B, Kronenberg,G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci.* 2004;27: 447-452.
- Kerns,D, Vong,GS, Barley,K, Dracheva,S, Katsel,P, Casaccia,P, Haroutunian,V, Byne,W. Gene expression abnormalities and oligodendrocyte deficits in the internal capsule in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2010;120: 150-158.
- Kim,YK, Kim,L, Lee,MS. Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. *Schizophr. Res.* 2000;44: 165-175.



- Kirsten,TB, Chaves-Kirsten,GP, Chaible,LM, Silva,AC, Martins,DO, Britto,LR, Dagli,ML, Torrao,AS, Palermo-Neto,J, Bernardi,MM. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. *J. Neurosci. Res.* 2012;90: 1903-1912.
- Koch,M, Schnitzler,HU. The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res.* 1997;89: 35-49.
- Kokkinidis,L, Anisman,H. Amphetamine models of paranoid schizophrenia: an overview and elaboration of animal experimentation. *Psychol. Bull.* 1980;88: 551-579.
- Kolomeets,NS, Orlovskaya,DD, Uranova,NA. Decreased numerical density of CA3 hippocampal mossy fiber synapses in schizophrenia. *Synapse* 2007;61: 615-621.
- Konradi,C, Yang,CK, Zimmerman,EI, Lohmann,KM, Gresch,P, Pantazopoulos,H, Berretta,S, Heckers,S. Hippocampal interneurons are abnormal in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2011;131: 165-173.
- Koo,JW, Duman,RS. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2008;105: 751-756.
- Krebs-Thomson,K, Paulus,MP, Geyer,MA. Effects of hallucinogens on locomotor and investigatory activity and patterns: influence of 5-HT2A and 5-HT2C receptors. *Neuropsychopharmacology* 1998;18: 339-351.
- Krystal,JH, Karper,LP, Seibyl,JP, Freeman,GK, Delaney,R, Bremner,JD, Heninger,GR, Bowers,MB, Jr., Charney,DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 1994;51: 199-214.
- Krystal,JH, Sanacora,G, Blumberg,H, Anand,A, Charney,DS, Marek,G, Epperson,CN, Goddard,A, Mason,GF. Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Mol. Psychiatry* 2002;7 Suppl 1: S71-S80.
- Kubesova,A, Bubenikova-Valesova,V, Mertlova,M, Palenicek,T, Horacek,J. Impact of psychotropic drugs on adult hippocampal neurogenesis. *Neurosci. Res.* 2012;73: 93-98.
- Kubesova,A, Palenicek,T, Votava,M, Fujakova,M, Tyls,F, Sustkova,M, Krsiak,M. The influence of 5-HT 1A/2A antagonists on changes in ultrasonic vocalization in rats induced by administration of MDMA and 2C-B. *Behav Pharmacol* 22, e71. 2011.
- Kubesova,A, Tejkalova,H, Syslova,K, Kacer,P, Vondrousova,J, Tyls,F, Fujakova,M, Palenicek,T, Horacek,J. Biochemical, histopathological and morphological profiling of a rat model of early immune stimulation: relation to psychopathology. *PLoS. One.* 2015;10: e0115439.
- Laakso,MP, Partanen,K, Riekkinen,P, Lehtovirta,M, Helkala,EL, Hallikainen,M, Hanninen,T, Vainio,P, Soininen,H. Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: An MRI study. *Neurology* 1996;46: 678-681.
- Lat,J. The analysis of habituation. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars. )* 1973;33: 771-789.
- Le Pen,G, Gourevitch,R, Hazane,F, Hoareau,C, Jay,TM, Krebs,MO. Peri-pubertal maturation after developmental disturbance: a model for psychosis onset in the rat. *Neuroscience* 2006;143: 395-405.

- Le Pen,G, Grottick,AJ, Higgins,GA, Martin,JR, Jenck,F, Moreau,JL. Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behav. Pharmacol.* 2000;11: 257-268.
- Le Strat,Y, Ramoz,N, Gorwood,P. The role of genes involved in neuroplasticity and neurogenesis in the observation of a gene-environment interaction (GxE) in schizophrenia. *Curr. Mol. Med.* 2009;9: 506-518.
- Lee,M, Jayathilake,K, Dai,J, Meltzer,HY. Decreased plasma tryptophan and tryptophan/large neutral amino acid ratio in patients with neuroleptic-resistant schizophrenia: relationship to plasma cortisol concentration. *Psychiatry Res.* 2011;185: 328-333.
- Lehnardt,S, Lachance,C, Patrizi,S, Lefebvre,S, Follett,PL, Jensen,FE, Rosenberg,PA, Volpe,JJ, Vartanian,T. The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J. Neurosci.* 2002;22: 2478-2486.
- Lewis,DA, Levitt,P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002;25: 409-432.
- Lieberman,JA, Alvir,J, Geisler,S, Ramos-Lorenzi,J, Woerner,M, Novacenko,H, Cooper,T, Kane,JM. Methylphenidate response, psychopathology and tardive dyskinesia as predictors of relapse in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1994;11: 107-118.
- Lieberman,JA, Kane,JM, Alvir,J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 1987;91: 415-433.
- Linderholm,KR, Skogh,E, Olsson,SK, Dahl,ML, Holtze,M, Engberg,G, Samuelsson,M, Erhardt,S. Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 2012;38: 426-432.
- Lingford-Hughes,A, Nutt,D. Neurobiology of addiction and implications for treatment. *Br. J. Psychiatry* 2003;182: 97-100.
- Lipska,BK, Jaskiw,GE, Weinberger,DR. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1993;9: 67-75.
- Lipska,BK, Weinberger,DR. Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 1993;75: 213-222.
- Lipska,BK, Weinberger,DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 2000;23: 223-239.
- Lisman,J, Buzsaki,G. A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr. Bull.* 2008;34: 974-980.
- Ludewig,K, Geyer,MA, Etzensberger,M, Vollenweider,FX. Stability of the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and habituation in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2002;55: 129-137.
- Maas,JW, Contreras,SA, Miller,AL, Berman,N, Bowden,CL, Javors,MA, Seleshi,E, Weintraub,S. Studies of catecholamine metabolism in schizophrenia/psychosis--I. *Neuropsychopharmacology* 1993;8: 97-109.

- Maes,M, Leonard,BE, Myint,AM, Kubera,M, Verkerk,R. The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2011;35: 702-721.
- Maloney,KJ, Cape,EG, Gotman,J, Jones,BE. High-frequency gamma electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience* 1997;76: 541-555.
- Mansbach,RS, Geyer,MA. Effects of phencyclidine and phencyclidine biologs on sensorimotor gating in the rat. *Neuropsychopharmacology* 1989;2: 299-308.
- Marcotte,ER, Pearson,DM, Srivastava,LK. Animal models of schizophrenia: a critical review. *J. Psychiatry Neurosci.* 2001;26: 395-410.
- Marek,GJ, Aghajanian,GK. LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT<sub>2A</sub> receptors on interneurons in rat piriform cortex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996;278: 1373-1382.
- Markianos,M, Botsis,A, Arvanitis,Y. Biogenic amine metabolites in plasma of drug-naive schizophrenic patients: associations with symptomatology. *Biol. Psychiatry* 1992;32: 288-292.
- Marona-Lewicka,D, Thisted,RA, Nichols,DE. Distinct temporal phases in the behavioral pharmacology of LSD: dopamine D<sub>2</sub> receptor-mediated effects in the rat and implications for psychosis. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;180: 427-435.
- Marsden,CA, King,MV, Fone,KC. Influence of social isolation in the rat on serotonergic function and memory--relevance to models of schizophrenia and the role of 5-HT(6) receptors. *Neuropharmacology* 2011;61: 400-407.
- Masse,F, Hascoet,M, Bourin,M. Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT(2A/2C) agonist) in the four-plate test in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2007a;17: 483-491.
- Masse,F, Nic Dhonnchadha,BA, Hascoet,M, Bourin,M. Anxiolytic-like effect of 5-HT(2) ligands and benzodiazepines co-administration: comparison of two animal models of anxiety (the four-plate test and the elevated plus maze). *Behav Brain Res.* 2007b;177: 214-226.
- Matsumoto,H, Higa,HH. Studies on methylazoxymethanol, the aglycone of cycasin: methylation of nucleic acids in vitro. *Biochem. J.* 1966;98: 20C-22C.
- McCullumsmith,RE, Gupta,D, Beneyto,M, Kreger,E, Haroutunian,V, Davis,KL, Meador-Woodruff,JH. Expression of transcripts for myelination-related genes in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2007;90: 15-27.
- McGrath,J, Saha,S, Chant,D, Welham,J. Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol. Rev.* 2008;30: 67-76.
- McLean,SL, Woolley,ML, Neill,JC. Effects of subchronic phencyclidine on behaviour of female rats on the elevated plus maze and open field. *J. Psychopharmacol.* 2010;24: 787-790.
- Mei,L, Xiong,WC. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9: 437-452.

- Meltzer,HY, Roth,B. The Role of Serotonin in Schizophrenia. In: Bloom,FE, Kupfer,DJ, editors. Psychopharmacology - 4th Generation of Progress. New York: Raven Press, 1995.
- Meng,ZH, Feldpaush,DL, Merchant,KM. Clozapine and haloperidol block the induction of behavioral sensitization to amphetamine and associated genomic responses in rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998;61: 39-50.
- Meyer-Franke,A, Shen,S, Barres,BA. Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons. *Mol. Cell Neurosci.* 1999;14: 385-397.
- Meyerhoff,DJ, Mon,A, Metzler,T, Neylan,TC. Cortical gamma-aminobutyric Acid and glutamate in posttraumatic stress disorder and their relationships to self-reported sleep quality. *Sleep* 2014;37: 893-900.
- Miller,CL, Llenos,IC, Cwik,M, Walkup,J, Weis,S. Alterations in kynurenine precursor and product levels in schizophrenia and bipolar disorder. *Neurochem. Int.* 2008;52: 1297-1303.
- Miller,CL, Llenos,IC, Dulay,JR, Weis,S. Upregulation of the initiating step of the kynurenine pathway in postmortem anterior cingulate cortex from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Res.* 2006;1073-1074: 25-37.
- Moldin,SO. Sponsoring initiatives in the molecular genetics of mental disorders. Genetics and mental disorders: report of the NIMH Genetic Workgroup Bethesda (MD): NIH, 1998, p 98-4268.
- Molofsky,AV, Krencik,R, Ullian,EM, Tsai,HH, Deneen,B, Richardson,WD, Barres,BA, Rowitch,DH. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 2012;26: 891-907.
- Monje,ML, Toda,H, Palmer,TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 2003;302: 1760-1765.
- Monji,A, Kato,T, Kanba,S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2009;63: 257-265.
- Moore,H, Jentsch,JD, Ghajarnia,M, Geyer,MA, Grace,AA. A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2006;60: 253-264.
- Moya,PR, Berg,KA, Gutierrez-Hernandez,MA, Saez-Briones,P, Reyes-Parada,M, Cassels,BK, Clarke,WP. Functional selectivity of hallucinogenic phenethylamine and phenylisopropylamine derivatives at human 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007;321: 1054-1061.
- Muck-Seler,D, Pivac,N, Mustapic,M, Crncevic,Z, Jakovljevic,M, Sagud,M. Platelet serotonin and plasma prolactin and cortisol in healthy, depressed and schizophrenic women. *Psychiatry Res.* 2004;127: 217-226.
- Myint,AM, Schwarz,MJ, Verkerk,R, Mueller,HH, Zach,J, Scharpe,S, Steinbusch,HW, Leonard,BE, Kim,YK. Reversal of imbalance between kynurenic acid and 3-hydroxykynurenine by antipsychotics in medication-naive and medication-free schizophrenic patients. *Brain Behav Immun.* 2011;25: 1576-1581.
- Myslivečková,J, Rokyta,R. Limbický systém. *Fyziologie ISV*, 2000, p 317-321.

- Najmanova,V, Rambousek,L, Syslova,K, Bubenikova,V, Slamberova,R, Vales,K, Kacer,P. LC-ESI-MS-MS Method for Monitoring Dopamine, Serotonin and Their Metabolites in Brain Tissue. *Chromatographia* 73(1), 143-149. 2011.
- Nichols,DE. Hallucinogens. *Pharmacol. Ther.* 2004;101: 131-181.
- Nilsson,LK, Linderholm,KR, Engberg,G, Paulson,L, Blennow,K, Lindstrom,LH, Nordin,C, Karanti,A, Persson,P, Erhardt,S. Elevated levels of kynurenic acid in the cerebrospinal fluid of male patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2005;80: 315-322.
- Noda,Y, Yamada,K, Furukawa,H, Nabeshima,T. Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 1995;116: 2531-2537.
- Oades,RD, Klimke,A, Henning,U, Rao,ML. Relations of clinical features, subgroups and medication to serum monoamines in schizophrenia. *Hum. Psychopharmacol.* 2002;17: 15-27.
- Okada,K, Yamashita,U, Tsuji,S. Modulation of Na(+)-dependent glutamate transporter of murine astrocytes by inflammatory mediators. *J. UOEH.* 2005;27: 161-170.
- Ong,LK, Sominsky,L, Dickson,PW, Hodgson,DM, Dunkley,PR. The sustained phase of tyrosine hydroxylase activation in vivo. *Neurochem. Res.* 2012;37: 1938-1943.
- Ortinski,PI, Dong,J, Mungenast,A, Yue,C, Takano,H, Watson,DJ, Haydon,PG, Coulter,DA. Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat. Neurosci.* 2010;13: 584-591.
- Ozawa,K, Hashimoto,K, Kishimoto,T, Shimizu,E, Ishikura,H, Iyo,M. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2006;59: 546-554.
- Palenicek,T, Balikova,M, Bubenikova-Valesova,V, Horacek,J. Mescaline effects on rat behavior and its time profile in serum and brain tissue after a single subcutaneous dose. *Psychopharmacology (Berl)* 2008;196: 51-62.
- Palenicek,T, Fujakova,M, Brunovsky,M, Balikova,M, Horacek,J, Gorman,I, Tyls,F, Tislerova,B, Sos,P, Bubenikova-Valesova,V, Hoschl,C, Krajca,V. Electroencephalographic spectral and coherence analysis of ketamine in rats: correlation with behavioral effects and pharmacokinetics. *Neuropsychobiology* 2011a;63: 202-218.
- Palenicek,T, Fujakova,M, Brunovsky,M, Horacek,J, Gorman,I, Balikova,M, Rambousek,L, Syslova,K, Kacer,P, Zach,P, Bubenikova-Valesova,V, Tyls,F, Kubesova,A, Puskarcikova,J, Hoschl,C. Behavioral, neurochemical and pharmaco-EEG profiles of the psychedelic drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2013;225: 75-93.
- Palenicek,T, Fujakova,M, Tyls,F, Brunovsky,M, Kubesova,A, Horacek,J, Krajca,V. Quantitative EEG in animal models of psychosis: the impact of behaviour. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, S317. 2011b.
- Palenicek,T, Hlinak,Z, Bubenikova-Valesova,V, Novak,T, Horacek,J. Sex differences in the effects of N,N-diethyllysergamide (LSD) on behavioural activity and prepulse inhibition. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 2010;34: 588-596.
- Páleníček,T, Bubeníková-Valešová,V, Horáček,J. Srovnání amfetaminu, ketaminu, MK801, meskalinu, psilocinu, LSD a 2C-B v animálním modelu schizofrenie. *Psychiatrie* 11(Suppl.2), 61-62. 2007.

- Páleníček,T, Fujáková,M, Tylš,F, Kubešová,A, Brunovský,M, Horáček,J. Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a senzomotorické zpracování informací - animální model psychózy. *Psychiatrie* 15(Suppl.2), 44-48. 2011.
- Palomino,A, Gonzalez-Pinto,A, Aldama,A, Gonzalez-Gomez,C, Mosquera,F, Gonzalez-Garcia,G, Matute,C. Decreased levels of plasma glutamate in patients with first-episode schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr. Res.* 2007;95: 174-178.
- Pang,Y, Cai,Z, Rhodes,PG. Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2003;140: 205-214.
- Patro,N, Singh,K, Patro,I. Differential microglial and astrocytic response to bacterial and viral infection in the developing hippocampus of neonatal rats. *Indian J. Exp. Biol.* 2013;51: 606-614.
- Paulus,MP, Geyer,MA. The effects of MDMA and other methylenedioxy-substituted phenylalkylamines on the structure of rat locomotor activity. *Neuropsychopharmacology* 1992;7: 15-31.
- Paxinos,G, Watson,C. *The Rat Brain In Stereotactic Coordinates*. Elsevier Inc., 2007.
- Petrovický,P. Limbický systém. *Klinická neuroanatomie CNS s aplikovanou neurologií a neurochirurgií TRITON*, 2008, p 556.
- Petty,F, Fulton,M, Kramer,GL, Kram,M, Davis,LL, Rush,AJ. Evidence for the segregation of a major gene for human plasma GABA levels. *Mol. Psychiatry* 1999;4: 587-589.
- Petty,F, Sherman,AD. Plasma GABA levels in psychiatric illness. *J. Affect. Disord.* 1984;6: 131-138.
- Pickar,D, Breier,A, Hsiao,JK, Doran,AR, Wolkowitz,OM, Pato,CN, Konicki,PE, Potter,WZ. Cerebrospinal fluid and plasma monoamine metabolites and their relation to psychosis. Implications for regional brain dysfunction in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 1990;47: 641-648.
- Pijnenburg,AJ, Honig,WM, Van Rossum,JM. Inhibition of d-amphetamine-induced locomotor activity by injection of haloperidol into the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacologia*. 1975;41: 87-95.
- Pollack,MH, Jensen,JE, Simon,NM, Kaufman,RE, Renshaw,PF. High-field MRS study of GABA, glutamate and glutamine in social anxiety disorder: response to treatment with levetiracetam. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2008;32: 739-743.
- Pontieri,FE, Tanda,G, Di,CG. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1995;92: 12304-12308.
- Popov, NT, Stoyanova, VK, Madzhirova, NP, Vachev TI. Epigenetic aspects in schizophrenia etiology and pathogenesis. *Folia Med (Plovdiv)*. 2012;54: 12-16.
- Potvin,S, Stip,E, Sepehry,AA, Gendron,A, Bah,R, Kouassi,E. Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol. Psychiatry* 2008;63: 801-808.
- Pratt,OE. Kinetics of tryptophan transport across the blood-brain barrier. *J. Neural Transm. Suppl* 1979; 29-42.

- Quaak,I, Brouns,MR, Van de,BM. The dynamics of autism spectrum disorders: how neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013;10: 3384-3408.
- Radewicz,K, Garey,LJ, Gentleman,SM, Reynolds,R. Increase in HLA-DR immunoreactive microglia in frontal and temporal cortex of chronic schizophrenics. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000;59: 137-150.
- Rajkowska,G, Stockmeier,CA. Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr. Drug Targets.* 2013;14: 1225-1236.
- Ratnayake,U, Quinn,T, Walker,DW, Dickinson,H. Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. *Front Neurosci.* 2013;7: 180.
- Ravikumar,A, Deepadevi,KV, Arun,P, Manojkumar,V, Kurup,PA. Tryptophan and tyrosine catabolic pattern in neuropsychiatric disorders. *Neurol. India* 2000b;48: 231-238.
- Ravikumar,A, Deepadevi,KV, Arun,P, Manojkumar,V, Kurup,PA. Tryptophan and tyrosine catabolic pattern in neuropsychiatric disorders. *Neurol. India* 2000a;48: 231-238.
- Regenold,WT, Phatak,P, Marano,CM, Gearhart,L, Viens,CH, Hisley,KC. Myelin staining of deep white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and unipolar major depression. *Psychiatry Res.* 2007;151: 179-188.
- Reif,A, Fritzen,S, Finger,M, Strobel,A, Lauer,M, Schmitt,A, Lesch,KP. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol. Psychiatry* 2006;11: 514-522.
- Rimol,LM, Hartberg,CB, Nesvag,R, Fennema-Notestine,C, Hagler,DJ, Jr., Pung,CJ, Jennings,RG, Haukvik,UK, Lange,E, Nakstad,PH, Melle,I, Andreassen,OA, Dale,AM, Agartz,I. Cortical thickness and subcortical volumes in schizophrenia and bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* 2010;68: 41-50.
- Rimol,LM, Nesvag,R, Hagler,DJ, Jr., Bergmann,O, Fennema-Notestine,C, Hartberg,CB, Haukvik,UK, Lange,E, Pung,CJ, Server,A, Melle,I, Andreassen,OA, Agartz,I, Dale,AM. Cortical volume, surface area, and thickness in schizophrenia and bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* 2012;71: 552-560.
- Rohanova,M, Palenicek,T, Balikova,M. Disposition of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and its metabolite 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine in rats after subcutaneous administration. *Toxicol. Lett.* 2008;178: 29-36.
- Rolls,A, Shechter,R, London,A, Ziv,Y, Ronen,A, Levy,R, Schwartz,M. Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2007;9: 1081-1088.
- Romero,E, Ali,C, Molina-Holgado,E, Castellano,B, Guaza,C, Borrell,J. Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology* 2007;32: 1791-1804.
- Rudolph,U, Mohler,H. GABA-based therapeutic approaches: GABAA receptor subtype functions. *Curr. Opin. Pharmacol* 2006;6: 18-23.
- Rung,JP, Carlsson,A, Ryden,MK, Carlsson,ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 2005;29: 827-832.

- Sams-Dodd,F. Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. *Behav. Pharmacol.* 1995;6: 55-65.
- Sams-Dodd,F. A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 1998;18: 293-304.
- Sams-Dodd,F, Lipska,BK, Weinberger,DR. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;132: 303-310.
- Scherk,H, Falkai,P. Effects of antipsychotics on brain structure. *Curr. Opin. Psychiatry* 2006;19: 145-150.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 2014;511: 421-427.
- Schmitt,A, Malchow,B, Hasan,A, Falkai,P. The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front Neurosci.* 2014;8: 19.
- Schmitt,A, Steyskal,C, Bernstein,HG, Schneider-Axmann,T, Parlapani,E, Schaeffer,EL, Gattaz,WF, Bogerts,B, Schmitz,C, Falkai,P. Stereologic investigation of the posterior part of the hippocampus in schizophrenia. *Acta Neuropathol.* 2009;117: 395-407.
- Schubert,MI, Porkess,MV, Dashdorj,N, Fone,KC, Auer,DP. Effects of social isolation rearing on the limbic brain: a combined behavioral and magnetic resonance imaging volumetry study in rats. *Neuroscience* 2009;159: 21-30.
- Schurov,IL, Handford,EJ, Brandon,NJ, Whiting,PJ. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. *Mol. Psychiatry* 2004;9: 1100-1110.
- Schwarcz,R, Rassoulpour,A, Wu,HQ, Medoff,D, Tamminga,CA, Roberts,RC. Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 2001;50: 521-530.
- Seeman,P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1987;1: 133-152.
- Seeman,P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can. J. Psychiatry* 2002;47: 27-38.
- Seeman,P, Kapur,S. Schizophrenia: more dopamine, more D2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000;97: 7673-7675.
- Seeman,P, Niznik,HB. Dopamine receptors and transporters in Parkinson's disease and schizophrenia. *FASEB J.* 1990;4: 2737-2744.
- Selemon,LD, Rajkowska,G, Goldman-Rakic,PS. Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch. Gen. Psychiatry* 1995;52: 805-818.
- Shanks,N, Larocque,S, Meaney,MJ. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress. *J. Neurosci.* 1995;15: 376-384.
- Shanks,N, Windle,RJ, Perks,PA, Harbuz,MS, Jessop,DS, Ingram,CD, Lightman,SL. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 2000;97: 5645-5650.



- Shaw,JC, O'Connor,KP, Ongley,OC. EEG coherence as a measure of cerebral functional organization. In: Brazier,MB, Petche,H, editors. *Architectonics of the cerebral cortex*. New York: Raven, 1978, p 245-256.
- Shenton,ME, Whitford,TJ, Kubicki,M. Structural neuroimaging in schizophrenia: from methods to insights to treatments. *Dialogues. Clin. Neurosci.* 2010;12: 317-332.
- Shepherd,AM, Laurens,KR, Matheson,SL, Carr,VJ, Green,MJ. Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2012;36: 1342-1356.
- Shi,L, Fatemi,SH, Sidwell,RW, Patterson,PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J. Neurosci.* 2003;23: 297-302.
- Shimizu,T, Nomiyama,S, Hirata,F, Hayaishi,O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 1978;253: 4700-4706.
- Shulgin,AT, Carter,MF. Centrally active phenethylamines. *Psychopharmacol. Commun.* 1975;1: 93-98.
- Sipes,TA, Geyer,MA. Multiple serotonin receptor subtypes modulate prepulse inhibition of the startle response in rats. *Neuropharmacology* 1994;33: 441-448.
- Small,SA, Schobel,SA, Buxton,RB, Witter,MP, Barnes,CA. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2011;12: 585-601.
- Smith,MJ, Wang,L, Cronenwett,W, Mamah,D, Barch,DM, Csernansky,JG. Thalamic morphology in schizophrenia and schizoaffective disorder. *J. Psychiatr. Res.* 2011;45: 378-385.
- Smith,PL, Hagberg,H, Naylor,AS, Mallard,C. Neonatal Peripheral Immune Challenge Activates Microglia and Inhibits Neurogenesis in the Developing Murine Hippocampus. *Dev. Neurosci.* 2014.
- Sominsky,L, Fuller,EA, Bondarenko,E, Ong,LK, Averell,L, Nalivaiko,E, Dunkley,PR, Dickson,PW, Hodgson,DM. Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *PLoS. One.* 2013;8: e57700.
- Sominsky,L, Walker,AK, Ong,LK, Tynan,RJ, Walker,FR, Hodgson,DM. Increased microglial activation in the rat brain following neonatal exposure to a bacterial mimetic. *Behav. Brain Res.* 2012;226: 351-356.
- Spencer,SJ, Galic,MA, Pittman,QJ. Neonatal programming of innate immune function. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 2011;300: E11-E18.
- St'astny,F, Skultetyova,I, Pliss,L, Jezova,D. Quinolinic acid enhances permeability of rat brain microvessels to plasma albumin. *Brain Res. Bull.* 2000;53: 415-420.
- Steiner,J, Mawrin,C, Ziegeler,A, Biela,H, Ullrich,O, Bernstein,HG, Bogerts,B. Distribution of HLA-DR-positive microglia in schizophrenia reflects impaired cerebral lateralization. *Acta Neuropathol.* 2006;112: 305-316.
- Stevens,CD, Altshuler,LL, Bogerts,B, Falkai,P. Quantitative study of gliosis in schizophrenia and Huntington's chorea. *Biol. Psychiatry* 1988;24: 697-700.
- Stevens,JR. Neuropathology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 1982;39: 1131-1139.

- Stone,TW, Darlington,LG. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002;1: 609-620.
- Stone,TW, Forrest,CM, Darlington,LG. Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *FEBS J.* 2012;279: 1386-1397.
- Swerdlow,NR, Braff,DL, Geyer,MA. Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav. Pharmacol.* 2000;11: 185-204.
- Swerdlow,NR, Braff,DL, Taaid,N, Geyer,MA. Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Arch. Gen. Psychiatry* 1994;51: 139-154.
- Swerdlow,NR, Geyer,MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr. Bull.* 1998;24: 285-301.
- Swerdlow,NR, Geyer,MA, Braff,DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156: 194-215.
- Swerdlow,NR, Stephany,N, Wasserman,LC, Talledo,J, Shoemaker,J, Auerbach,PP. Amphetamine effects on prepulse inhibition across-species: replication and parametric extension. *Neuropsychopharmacology* 2003;28: 640-650.
- Syslova,K, Rambousek,L, Kuzma,M, Najmanova,V, Bubenikova-Valesova,V, Slamberova,R, Kacer,P. Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: method combining freeze-drying with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2011;1218: 3382-3391.
- Takikawa,O, Kuroiwa,T, Yamazaki,F, Kido,R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J. Biol. Chem.* 1988;263: 2041-2048.
- Tauscher,J, Fischer,P, Neumeister,A, Rappelsberger,P, Kasper,S. Low frontal electroencephalographic coherence in neuroleptic-free schizophrenic patients. *Biol. Psychiatry* 1998;44: 438-447.
- Tejkalová,H, Jelínek,F, Klaschka,J, Šťastný,F. Vliv perinatální zánětlivé reakce na rozvoj psychóze podobného chování: experimentální studie (Effect of perinatal inflammatory reaction on the induction of psychotic-like behaviour: experimental study). *Psychiatrie* 2007;11: 12-15.
- Tejkalová, H, Jelínek, F, Klaschka, J, Šťastný, F. Vliv chronického podávání klozapinu na chování potkanů v neuroinfekčním modelu schizofrenie (Effect of chronic clozapine administration on the behavioural pattern of rats in the neuroinfectious model of schizophrenia). *Psychiatrie* 2008; 12: 68-72.
- Tejkalová,H, Růžičková,Š, Klaschka,J. Vliv chronického podávání antipsychotik na expresi cytokinů v neuroinfekčním modelu schizofrenie (Effect of antipsychotic chronic administration on cytokine expression in neuroinfectious model of schizophrenia). *Psychiatrie* 2010;14: 19-21.
- Terrazzino,S, Bauleo,A, Baldan,A, Leon,A. Peripheral LPS administrations up-regulate Fas and FasL on brain microglial cells: a brain protective or pathogenic event? *J. Neuroimmunol.* 2002;124: 45-53.
- Thatcher,RW, Krause,PJ, Hrybyk,M. Cortico-cortical associations and EEG coherence: a two-compartmental model. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1986;64: 123-143.

- Toro,CT, Deakin,JF. Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal early brain development? *Schizophr. Res.* 2007;90: 1-14.
- Tortorella,A, Monteleone,P, Fabrazzo,M, Viggiano,A, De,LL, Maj,M. Plasma concentrations of amino acids in chronic schizophrenics treated with clozapine. *Neuropsychobiology* 2001;44: 167-171.
- Tsai,G, Passani,LA, Slusher,BS, Carter,R, Baer,L, Kleinman,JE, Coyle,JT. Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. *Arch. Gen. Psychiatry* 1995;52: 829-836.
- Tyls,F, Palenicek,T, Fujakova,M, Kubesova,A, Brunovsky ,M, Horacek,J, Krajca,V. The effect of tryptamine hallucinogens on quantitative EEG and behavior in rats. *Behavioral Pharmacology* 2011;22: 39.
- Uranova,NA, Orlovskaya,DD, Vikhрева,OV, Zimina,IS, Rakhmanova,VI. [Morphometric study of ultrastructural changes in oligodendroglial cells in the postmortem brain in endogenous psychoses]. *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk* 2001; 42-48.
- Uranova,NA, Vikhрева,OV, Rachmanova,VI, Orlovskaya,DD. Ultrastructural alterations of myelinated fibers and oligodendrocytes in the prefrontal cortex in schizophrenia: a postmortem morphometric study. *Schizophr. Res. Treatment.* 2011;2011: 325789.
- Uranova,NA, Vostrikov,VM, Orlovskaya,DD, Rachmanova,VI. Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr. Res.* 2004;67: 269-275.
- Uranova,NA, Vostrikov,VM, Vikhрева,OV, Zimina,IS, Kolomeets,NS, Orlovskaya,DD. The role of oligodendrocyte pathology in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2007;10: 537-545.
- van Bemmelen,FJ, Schouten,MJ, Fekkes,D, Bruinvels,J. Succinic semialdehyde as a substrate for the formation of gamma-aminobutyric acid. *J. Neurochem.* 1985;45: 1471-1474.
- van Berckel, BN, Bossong, MG, Boellaard, R, Kloet, R, Schuitmaker, A, Caspers, E, Luurtsema, G, Windhorst, AD, Cahn, W, Lammertsma, AA, Kahn, RS. Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry.* 2008;64: 820-822.
- van der Heijden,FM, Tuinier,S, Fekkes,D, Sijben,AE, Kahn,RS, Verhoeven,WM. Atypical antipsychotics and the relevance of glutamate and serotonin. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14: 259-265.
- van Os,J, Kapur,S. Schizophrenia. *Lancet* 2009;374: 635-645.
- Vargas,DL, Nascimbene,C, Krishnan,C, Zimmerman,AW, Pardo,CA. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.* 2005;57: 67-81.
- Villalobos,CA, Bull,P, Saez,P, Cassels,BK, Huidobro-Toro,JP. 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and structurally related phenylethylamines are potent 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists in *Xenopus laevis* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 2004;141: 1167-1174.
- Vita,A, De,PL, Silenzi,C, Dieci,M. Brain morphology in first-episode schizophrenia: a meta-analysis of quantitative magnetic resonance imaging studies. *Schizophr. Res.* 2006;82: 75-88.
- Volk,DW, Austin,MC, Pierri,JN, Sampson,AR, Lewis,DA. Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 2000;57: 237-245.

- Vollenweider,FX, Vollenweider-Scherpenhuyzen,MF, Babler,A, Vogel,H, Hell,D. Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. *Neuroreport* 1998;9: 3897-3902.
- Vostrikov,V, Uranova,N. Age-related increase in the number of oligodendrocytes is dysregulated in schizophrenia and mood disorders. *Schizophr. Res. Treatment*. 2011;2011: 174689.
- Vyazovskiy,V, Achermann,P, Borbely,AA, Tobler,I. Interhemispheric coherence of the sleep electroencephalogram in mice with congenital callosal dysgenesis. *Neuroscience* 2004;124: 481-488.
- Walterfang,M, Velakoulis,D, Whitford,TJ, Pantelis,C. Understanding aberrant white matter development in schizophrenia: an avenue for therapy? *Expert. Rev. Neurother*. 2011;11: 971-987.
- Wang,AY, Lohmann,KM, Yang,CK, Zimmerman,EI, Pantazopoulos,H, Herring,N, Berretta,S, Heckers,S, Konradi,C. Bipolar disorder type 1 and schizophrenia are accompanied by decreased density of parvalbumin- and somatostatin-positive interneurons in the parahippocampal region. *Acta Neuropathol*. 2011;122: 615-626.
- Wang,KC, Fan,LW, Kaizaki,A, Pang,Y, Cai,Z, Tien,LT. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience* 2013;234: 146-157.
- Wang,X, Rousset,CI, Hagberg,H, Mallard,C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin. Fetal Neonatal Med*. 2006;11: 343-353.
- Wassef,A, Baker,J, Kochan,LD. GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J. Clin. Psychopharmacol*. 2003;23: 601-640.
- Webster,MJ, O'Grady,J, Kleinman,JE, Weickert,CS. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience* 2005;133: 453-461.
- Weiss,IC, Pryce,CR, Jongen-Relo,AL, Nanz-Bahr,NI, Feldon,J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behav. Brain Res*. 2004;152: 279-295.
- White,HL. Glutamate as a precursor of GABA in rat brain and peripheral tissues. *Mol. Cell Biochem*. 1981;39: 253-259.
- White,T, Hilgetag,CC. Gyrfication and neural connectivity in schizophrenia. *Dev. Psychopathol*. 2011;23: 339-352.
- White,T, Su,S, Schmidt,M, Kao,CY, Sapiro,G. The development of gyrfication in childhood and adolescence. *Brain Cogn* 2010;72: 36-45.
- Whitford,TJ, Kubicki,M, Shenton,ME. Diffusion tensor imaging, structural connectivity, and schizophrenia. *Schizophr. Res. Treatment*. 2011;2011: 709523.
- WHO. MKN-10: Mezinárodní klasifikace nemocí, 10.revize. Duševní poruchy a poruchy chování. Popisy klinických příznaků a diagnostická vodítka. Psychiatrické centrum Praha, 1992.
- Wierzbica-Bobrowicz,T, Lewandowska,E, Kosno-Kruszewska,E, Lechowicz,W, Pasennik,E, Schmidt-Sidor,B. Degeneration of microglial cells in frontal and temporal lobes of chronic schizophrenics. *Folia Neuropathol*. 2004;42: 157-165.

- Williams,MR, Hampton,T, Pearce,RK, Hirsch,SR, Ansorge,O, Thom,M, Maier,M. Astrocyte decrease in the subgenual cingulate and callosal genu in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2013;263: 41-52.
- Williams,S, Boksa,P. Gamma oscillations and schizophrenia. *J. Psychiatry Neurosci.* 2010;35: 75-77.
- Williams,NM, O'Donovan,MC, Owen,MJ. Is the dysbindin gene (DTNBP1) a susceptibility gene for schizophrenia? *Schizophr Bull.* 2005;31: 800-805.
- Winterer,G, Egan,MF, Radler,T, Hyde,T, Coppola,R, Weinberger,DR. An association between reduced interhemispheric EEG coherence in the temporal lobe and genetic risk for schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2001;49: 129-143.
- Wisniewski,HM, Wegiel,J. Spatial relationships between astrocytes and classical plaque components. *Neurobiol. Aging* 1991;12: 593-600.
- Woo,TU, Whitehead,RE, Melchitzky,DS, Lewis,DA. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1998;95: 5341-5346.
- Woon,FL, Sood,S, Hedges,DW. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2010;34: 1181-1188.
- Wright,IC, Rabe-Hesketh,S, Woodruff,PW, David,AS, Murray,RM, Bullmore,ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 2000;157: 16-25.
- Youdim,MB, Riederer,PF. A review of the mechanisms and role of monoamine oxidase inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 2004;63: S32-S35.
- Young,GA. Relationship between amphetamine-induced effects on EEG power spectra and motor activity in rats. *Pharmacol Biochem. Behav* 1988;30: 489-492.
- Zhang,ZJ, Peet,M, Ramchand,CN, Shah,S, Reynolds,GP. Plasma homovanillic acid in untreated schizophrenia--relationship with symptomatology and sex. *J. Psychiatr. Res.* 2001;35: 23-28.
- Zhao,C, Teng,EM, Summers,RG, Jr., Ming,GL, Gage,FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.* 2006;26: 3-11.
- Zhu,F, Zhang,L, Ding,YQ, Zhao,J, Zheng,Y. Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain Behav. Immun.* 2014;38: 166-174.
- Zuckerman,L, Weiner,I. Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *J. Psychiatr. Res.* 2005;39: 311-323.

## PŘÍLOHY

- kopie originálů 3 vědeckých publikací tvořících disertační práci

### Příloha 1

**Kubešová, A.**, Tejkalová, H., Syslová, K., Kačer, P., Voundroušová, J., Tylš, F., Fujáková, M., Páleníček, T., Horáček, J. Biochemical, Histopathological and Morphological Profiling of a Rat Model of Early Immune Stimulation: Relation to Psychopathology. PLoS ONE 2015; 10(1): e0115439.

### Příloha 2

Páleníček, T., Fujáková, M., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Brunovský, M., Horáček, J. Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a sensorimotorické zpracování informací - animální model psychózy. Psychiatrie 2011; 15 (suppl. 2): 44-48.

### Příloha 3

Páleníček, T., Fujáková, M., Brunovský, M., Horáček, J., Gorman, I., Balíková, M., Rambousek, L., Syslová, K., Kačer, P., Zach, P., Bubeníková-Valešová, V., Tylš, F., **Kubešová, A.**, Puskarčíková, J., Höschl, C. Behavioral, Neurochemical and Pharmacological EEG Profiles of the Psychedelic Drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in Rats. Psychopharmacology (Berl) 2013; 225 (1): 75-93.

RESEARCH ARTICLE

# Biochemical, Histopathological and Morphological Profiling of a Rat Model of Early Immune Stimulation: Relation to Psychopathology

Anna Kubesova<sup>1,2,3\*</sup>, Hana Tejkalova<sup>1,2</sup>, Kamila Syslova<sup>4</sup>, Petr Kacer<sup>4</sup>, Jana Vondrousova<sup>4</sup>, Filip Tyls<sup>1,2,3</sup>, Michaela Fujakova<sup>1,2,3</sup>, Tomas Palenicek<sup>1,2,3</sup>, Jiri Horacek<sup>1,2,3</sup>

**1** Prague Psychiatric Center, Prague, Czech Republic, **2** National Institute of Mental Health, Klecany, Czech Republic, **3** Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic, **4** Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic

\* [kubesova@pcp.lf3.cuni.cz](mailto:kubesova@pcp.lf3.cuni.cz)



OPEN ACCESS

**Citation:** Kubesova A, Tejkalova H, Syslova K, Kacer P, Vondrousova J, Tyls F, et al. (2015) Biochemical, Histopathological and Morphological Profiling of a Rat Model of Early Immune Stimulation: Relation to Psychopathology. PLoS ONE 10(1): e0115439. doi:10.1371/journal.pone.0115439

**Academic Editor:** Anna Dunaevsky, University of Nebraska Medical Center, UNITED STATES

**Received:** August 14, 2014

**Accepted:** November 24, 2014

**Published:** January 20, 2015

**Copyright:** © 2015 Kubesova et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The study was supported by The Ministry of Health of the Czech Republic ([www.mzcr.cz](http://www.mzcr.cz)) - Internal Grant Agency (NT13843), Development of Research Organization (PCP, 00023752); Charles University in Prague ([www.cuni.cz](http://www.cuni.cz)) - Specific Academic Research (260045/SVV/2014), Charles University Research Development Schemes (PRVOUK P34); The Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic ([www.msmt.cz](http://www.msmt.cz)) - The National Programme of Sustainability (NPU I (LO))

## Abstract

Perinatal immune challenge leads to neurodevelopmental dysfunction, permanent immune dysregulation and abnormal behaviour, which have been shown to have translational validity to findings in human neuropsychiatric disorders (e.g. schizophrenia, mood and anxiety disorders, autism, Parkinson's disease and Alzheimer's disease). The aim of this animal study was to elucidate the influence of early immune stimulation triggered by systemic post-natal lipopolysaccharide administration on biochemical, histopathological and morphological measures, which may be relevant to the neurobiology of human psychopathology. In the present study of adult male Wistar rats we examined the brain and plasma levels of monoamines (dopamine, serotonin), their metabolites, the levels of the main excitatory and inhibitory neurotransmitters glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid and the levels of tryptophan and its metabolites from the kynurenine catabolic pathway. Further, we focused on histopathological and morphological markers related to pathogenesis of brain diseases - glial cell activation, neurodegeneration, hippocampal volume reduction and dopaminergic synthesis in the substantia nigra. Our results show that early immune stimulation in adult animals alters the levels of neurotransmitters and their metabolites, activates the kynurenine pathway of tryptophan metabolism and leads to astrogliosis, hippocampal volume reduction and a decrease of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra. These findings support the crucial pathophysiological role of early immune stimulation in the above mentioned neuropsychiatric disorders.

MSMT - 34870/2013); European Regional Development Fund ([www.europa.eu](http://www.europa.eu)) - The Operational Programme Prague Competitiveness (CZ.2.16/3.1.00/22197, CZ.2.16/3.1.00/21537), National Institute of Mental Health (CZ.1.05/2.1.00/03.0078). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

Negative environmental insults occurring during the intrauterine or early postnatal period may increase the risk of developing neuropsychiatric disorders in adulthood [1]. In recent years, attention has been focused on early immune stimulation caused by a maternal or perinatal infection. In various animal models early bacterial immune stimulation has been induced by administration of endotoxin, lipopolysaccharide (LPS) [2]. LPS is a part of the outer membrane of Gram-negative bacteria with a strong ability to induce an immune response [3]. LPS is recognized by Toll-like receptor 4 (TLR4) which is expressed in the central nervous system mainly on microglia and on other cell types in lower levels [4–6]. Activation of TLR4 leads to a cascade of steps that results in a release of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines [3]. Immune challenge experienced in early postnatal days leads to a permanent immune dysregulation and alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [7, 8].

Early immune stimulation might be one of underlying environmental factors which can predispose individuals to develop schizophrenia [9]. In our previous experiments, postnatal LPS treatment led to psychotic-like changes in behaviour and an increase of circulating cytokines in adult rats. These changes were normalized by the administration of clozapine [10–12]. Psychotic-like behaviour as well as anxiety-like, autistic-like and depression-like behaviour in adult animals perinatally treated with LPS has also been demonstrated in other studies [13–17].

Although the perinatal immune challenge (modelling both pre- and postnatal infection in humans) has been associated with the development of diverse neuropsychiatric disorders, little is known about its impact on biochemical actions in the adult brain. Histopathological changes, which might underlie the modelled behavioural phenotypes, have been investigated in several studies but the results are still contradictory [18–21].

Our study was designed to elucidate the influence of early immune stimulation on biochemical and histopathological changes in an adult rat brain and their potential relation to human psychopathology. Firstly, with respect to the role of major neurotransmitter systems in affective and psychotic disorders, we determined the levels of monoamines (dopamine, serotonin) and their metabolites, and the levels of the main excitatory and inhibitory neurotransmitters glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the brain. The activation of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism has been associated with various neuropsychiatric disorders [22], therefore we mapped the brain levels of tryptophan and its metabolites from the kynurenine catabolic pathway regarding the effect of proinflammatory cytokines on the enzymes of this pathway. Since some of the neurotransmitters and metabolites do not cross the blood brain barrier (BBB) but in human subjects are determined from blood, we also measured their plasma levels. Secondly, we detected histopathological markers related to pathogenesis of brain diseases such as the ionized calcium-binding adaptor molecule (Iba-1, microglial marker upregulated during activation of these cells), glial fibrillary acidic protein (GFAP, astroglial marker), Fluoro-Jade B (marker of neurodegeneration) and Hoechst 33258 (marker of cell nuclei). Thirdly, to evaluate the effect of early immune stimulation on brain morphology, we measured the hippocampal volume, whose reduction is consistently described in patients with mental disorders [23–27]. The hypothesis of altered dopaminergic activity has been complemented by subsequent evaluation of tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity in the substantia nigra (SN) to elucidate the interaction between dopamine levels and the number of dopaminergic cells.

We expected an alteration in brain and plasma levels of neurotransmitters and metabolites and the activation of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. We assumed that early immune stimulation leads to a prolonged activation of glial cells, neurodegeneration, and hippocampal volume reduction.



## Methods

### Animals and housing

All of the experiments were carried out on male Wistar/Hann rats (Velaz Ltd., Czech Republic). Male rat pups remained in the breeding plastic cages with their mothers until PD 28 and were then divided into groups of three or four animals per cage. The animal facility was air conditioned at a standard room temperature and humidity with a normal 12h light/dark cycle. The rats had unlimited access to a standard diet and water. All procedures utilized in this article comply with the Czech Government Requirements under the Policy of Humans Care of Laboratory Animals and with regulations of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (No. 419/2012) and obtained statement of the Expert Committee for experimental animal protection (3<sup>rd</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague) and were approved by the Committee for Care and Use of Laboratory Animals of Ministry of Health (MHCR, No. 17/2012).

### Postnatal LPS treatment

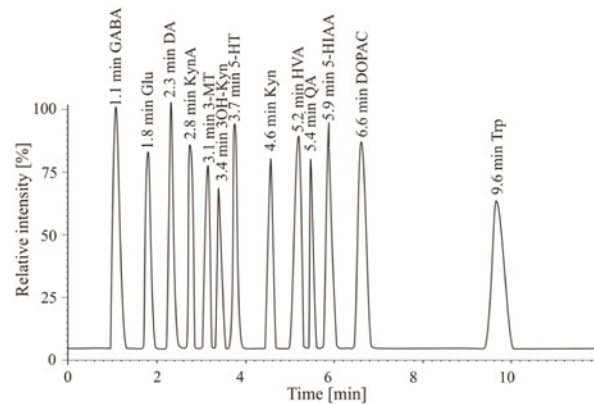
From PD 5 to PD 9, the rat pups were each day briefly removed from their home cages, weighed, and administered intraperitoneally with either 2 mg/kg/day LPS (*Escherichia coli*, serotype 026:B6; Sigma–Aldrich) or an equivolume of non-pyrogenic 0.9% saline as described previously [10]. The animals were allocated to treatment groups randomly.

### Determination of neurotransmitters and metabolites in brain and plasma

The adult animals (n = 19–24/group) were euthanized by decapitation at PD 90–95. The collected brain tissue (striatum, hippocampus and prefrontal cortex) and plasma were immediately frozen at -80°C until further processing. The analytical method used for qualitative and quantitative determination of neurotransmitters consisted of a pre-treatment step i.e. extraction by a mixed solution of acetonitrile, hydrochloric acid (c = 0.1 M) and EDTA (c = 27 M) at a ratio of 5:4:1 v / v / v, to separate and concentrate analytes (dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3-methoxytyramine (3-MT), homovanilic acid (HVA), serotonin (5-HT), 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA), glutamate (GLU),  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), tryptophan (TRP), kynurenine (KYN), kynurenic acid (KYNA), 3-hydroxykynurenine (3-OH-KYN) and quinolinic acid (QUIN)) from the brain tissue or plasma, and a detection step using liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UHPLC–ESI-MS/MS). The analytic system consists of an Accela 1250 pump, Accela autosampler and a TSQ Vantage mass spectrometer (Thermo Scientific, USA). The analytes were separated on Kinetex C18 100 mm×2.1mm x 1.7 $\mu$ m and mobile phase (solvent A: aqueous solution of acetic acid (pH 2); solvent B: methanol) in gradient elution at a flow rate of 300 $\mu$ l/min. The HPLC elution program was as follows: 5% B (2 min) → 30% B (linear increase in 1 min) → 30% B (5 min) → 5% B (linear decrease in 1 min) → 5% B (3 min). The column temperature was maintained at 25°C. The injection volume was 5  $\mu$ l. The mass spectrometer equipped with an electrospray ion source was used for detection of DA, 5-HT, GABA, 3-MT, TRP, KYN, KYNA and 3-OH-KYN in the positive ionization mode (ESI<sup>+</sup>), and GLU, HVA, DOPAC, 5-HIAA and QUIN were analyzed in the negative ionization mode (ESI<sup>-</sup>). The selective reaction monitoring (SRM) mode was used. The details of the method were described elsewhere [28]. The chromatographic separation of the analytes is depicted in Fig. 1.

### Tissue preparation and histology

The adult animals (n = 8/group) were weighed and anesthetized with isofluran and perfused transcardially with Ringer solution followed by 4% paraformaldehyde in Ringer solution at



**Figure 1. Chromatographic separation of the subject analytes.**

doi:10.1371/journal.pone.0115439.g001

PD 93–97. The brains were removed and fixed overnight in 4% paraformaldehyde. The brain samples were cryoprotected in 30% sucrose in Ringer solution and sectioned at a 40 $\mu$ m thickness on a cryostat. The sections were stored at -40°C in an antifreeze solution (sodium phosphate dibasic, glycerol, ethylene glycol) until further processing.

The tissue sections were stained with 0.1% Toluidine Blue (Nissl; Sigma Aldrich, USA) for routine histological examination and stereological evaluation of the hippocampal volume. The hippocampal volume was obtained using Cavalieri's principle in Stereo Investigator software (MBF Bioscience, Inc., USA) and a light microscope (Olympus BX51). Nineteen to twenty-one sections (40 $\mu$ m) from the 1-in-6 series from the beginning of the hippocampus to the end of the CA3 region (from 1.7 to 6.1 mm dorsal from bregma according to a stereological atlas of the rat brain) [29] were analyzed.

The extent of neurodegeneration was determined using a neurodegeneration marker Fluoro-Jade B (Millipore/Merck KGaA, Germany) and a cell nuclei marker Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, USA). Slides were evaluated under a fluorescence microscope (Zeiss Axio Imager Z1).

## Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on free-floating tissue sections according to standard procedures. The sections were briefly rinsed in Tris-Triton and incubated overnight at 4°C with the primary antibody polyclonal rabbit anti-Iba1 (1:3000, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan, Cat.No. 019–19741), polyclonal rabbit anti-GFAP (1:5000, DAKO Denmark A/S, Denmark, Cat.No. Z0334) or polyclonal rabbit anti-TH (1:2000, Millipore/Merck KGaA, Germany, Cat.No. AB152). Primary antibodies were recognized by the biotinylated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (1:300, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA, Cat. No. 111–065–003), which was detected by Avidin-Peroxidase-Complex (ABC) solution (Vectastain Elite kit standart, Vector Laboratories, Inc., USA). The immunoreactions were visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Millipore/Merck KGaA, Germany) as a chromogen. Negative controls were prepared identically except for the omission of the primary antibodies.

Two regions of interest were chosen to quantify the activation of microglia and astrocytes: the hippocampus (the object of volumetric study) and the SN (the region of quantification of TH-positive cells). To quantify Iba1 (microglia) or GFAP (astrocyte) immunoreactivity, three microscopic images from the hippocampus and three microscopic images from the SN were randomly captured in different sections at 40x magnification using a light microscope (Zeiss Axio Imager Z1). The images were obtained on the same day with the same intensity of

light. The percentage of the area of the whole image containing Iba1 or GFAP immunoreactivity was quantified using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>). The results were averaged for each animal and area and used for the statistical analysis.

Stereological counts of TH-positive cell bodies in the substantia nigra pars compacta (SNpc) were obtained using an optical fractionator method. in Stereo Investigator software (MBF Bioscience, Inc., USA) and a light microscope (Olympus BX51). SNpc was outlined at low magnification (2x objective), with reference to a stereological atlas of the rat brain [29]. Nine to ten sections containing SNpc from the 1-in-6 series were analyzed from each brain. Clearly stained cells were counted at higher magnification (60x objective), only if they did not intersect forbidden lines. The counting variables were as follows: sampling grid 200×200µm, counting frame 75×75µm, disector height 8µm, guard zone 2 µm. The coefficient of error in all samples was below 0.1.

## Statistical analysis

All data are presented as means ± S.E.M. Neurotransmitters and metabolites from brain tissue and plasma were analysed using the T-test for independent samples. Using Bonferroni correction the significance was set as a p-value <0.001. The Pearson correlation was used where appropriate. Animal weights, Iba1 and GFAP immunoreactivity, hippocampal volume and the number of TH-positive cells in the SNpc were analysed using the Mann-Whitney U-test. Significance was set as a p-value <0.05. Statistical analyses were performed using Statistica 9.0 software (Statsoft).

## Results

### Brain and plasma levels of monoamines and their metabolites

We found significantly increased levels of DOPAC, HVA and 5-HIAA and decreased levels of 5-HT and 3-MT in each measured brain area in LPS treated animals compared with the control group. DA levels were significantly increased in the striatum and prefrontal cortex and had a trend towards an increase in the hippocampus. The plasma levels of DA and its metabolites followed the brain levels with the exception of 3-MT, which was elevated in the plasma of LPS treated animals. LPS treatment had no effect on plasma levels of 5-HT, but there was a trend for higher plasma levels of its metabolite 5-HIAA. Detailed results are included in [Table 1](#).

### Brain and plasma levels of glutamate and GABA

There were significantly increased levels of GLU in each measured brain area, decreased levels of GABA in the hippocampus and a decreasing trend of GABA in the prefrontal cortex in LPS treated animals compared with the control group. The plasma levels of GLU and GABA were both significantly elevated in LPS treated animals. Detailed results are included in [Table 2](#).

### Brain and plasma levels of tryptophan and kynurenine pathway metabolites

We detected significantly increased levels of TRP, KYN, 3-OH-KYN and QUIN in each measured brain area and plasma in LPS treated animals compared with the control group. The LPS treatment had no effect on KYNA levels. Detailed results are included in [Table 3](#).

### Animal weights

We did not find any significant weight reduction at PD 93–97 in LPS treated animals ( $401 \pm 11$ g) compared with the control group ( $413 \pm 18$ g) [ $U(14) = 23$ ,  $Z = 0.89$ ,  $p = 0.37$ ].

**Table 1. Brain and plasma levels of monoamines and their metabolites.**

		Striatum	Hippocampus	Prefrontal cortex	Plasma
<b>DA</b>	Control	51.13±1.10	32.14±1.67	23.81±0.69	160.45±3.70
	LPS	80.61±2.79	38.52±1.00	33.26±1.33	213.55±4.51
	T-test	t(41) = -10.65, p<0.001	t(41) = -3.07, p<0.01	t(41) = -6.68, p<0.001	t(41) = -9.19, p<0.001
<b>DOPAC</b>	Control	15.43±0.50	24.91±0.52	16.03±0.46	7.42±0.19
	LPS	25.40±1.08	29.30±0.77	22.55±0.78	8.95±0.13
	T-test	t(41) = -8.97, p<0.001	t(41) = -4.91, p<0.001	t(41) = -7.52, p<0.001	t(41) = -6.39, p<0.001
<b>3-MT</b>	Control	7.45±0.27	16.81±0.53	14.84±0.69	4.94±0.18
	LPS	4.53±0.17	14.02±0.38	9.28±0.60	7.90±0.30
	T-test	t(41) = 8.62, p<0.001	t(41) = 4.07, p<0.001	t(41) = 5.91, p<0.001	t(41) = -8.74, p<0.001
<b>HVA</b>	Control	12.76±0.38	27.79±1.26	18.77±0.66	5.69±0.28
	LPS	21.70±0.69	38.35±1.94	25.73±0.70	9.23±0.24
	T-test	t(41) = -11.88, p<0.001	t(41) = -4.73, p<0.001	t(41) = -7.19, p<0.001	t(41) = -9.36, p<0.001
<b>5-HT</b>	Control	24.80±0.77	33.47±1.50	25.30±0.60	46.33±2.04
	LPS	18.62±1.12	22.54±0.90	19.53±0.59	41.89±1.79
	T-test	t(41) = 4.68, p<0.001	t(41) = 5.84, p<0.001	t(41) = 6.75, p<0.001	t(41) = 1.59, p = 0.12
<b>5-HIAA</b>	Control	13.59±0.69	17.51±0.48	22.67±1.00	230.50±3.53
	LPS	20.00±0.85	22.96±1.57	30.29±0.98	245.32±2.35
	T-test	t(41) = -5.91, p<0.001	t(41) = -3.64, p<0.001	t(41) = -5.36, p<0.001	t(41) = -3.30, p<0.01

Values (ng/ml) represent mean ± SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0115439.t001

### Activation of microglia and astrocytes

Microglia marked by the Iba1 antibody were observed in the whole brain in both LPS treated animals and saline treated controls. In both tested groups we found Iba1-positive cells with a small round to oval cell body and long thin ramified branches. Hypertrophied microglia with an atypical shape of the cell body and/or thicker processes which represent a transitional stage to the activated microglia were occasionally found in both groups. The percentage of the area containing Iba1 immunoreactivity in the hippocampus of LPS treated animals (8.25±0.89%) did not differ from the control group (7.35±1.5%) [U(14) = 26, Z = -0.58, p = 0.56]. We also did not reveal any difference in the SNpc between LPS treated animals (9.23±1.1%) and the control group (8.46±1.37%) [U(14) = 26, Z = -0.58, p = 0.56] (Fig. 2).

Astrocytes marked by the GFAP antibody were localized in the whole brain in both LPS treated animals and saline treated controls. However, the morphological characteristic of GFAP-positive cells was different in LPS treated animals (hypertrophied cell body and thicker

**Table 2. Brain and plasma levels of glutamate and γ-aminobutyric acid.**

		Striatum	Hippocampus	Prefrontal cortex	Plasma
<b>GLU</b>	Control	34.46±0.81	29.25±0.94	30.30±0.58	13.86±0.35
	LPS	46.31±1.23	42.49±1.48	40.85±1.09	18.02±0.41
	T-test	t(41) = -8.32, p<0.001	t(41) = -7.85, p<0.001	t(41) = -9.08, p<0.001	t(41) = -8.07, p<0.001
<b>GABA</b>	Control	5.32±0.39	6.28±0.21	5.98±0.16	9.01±0.14
	LPS	6.01±0.42	3.62±0.14	4.97±0.37	12.47±0.30
	T-test	t(41) = -1.20, p = 0.24	t(41) = 9.99, p<0.001	t(41) = 2.73, p<0.01	t(41) = -11.21, p<0.001

Values (ng/ml) represent mean ± SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0115439.t002

**Table 3. Brain and plasma levels of tryptophan and kynurenine pathway metabolites.**

		Striatum	Hippocampus	Prefrontal cortex	Plasma
TRP	Control	6.63±0.26	6.25±0.27	5.95±0.27	4.09±0.11
	LPS	20.17±1.08	20.46±1.70	21.57±1.57	6.67±0.24
	T-test	t(41) = -13.48, p<0.001	t(41) = -9.25, p<0.001	t(41) = -10.98, p<0.001	t(41) = -10.34, p<0.001
KYN	Control	63.93±1.00	75.59±1.66	66.99±0.89	65.13±1.40
	LPS	111.83±1.89	107.46±2.86	109.86±1.48	94.58±1.83
	T-test	t(41) = -23.76, p<0.001	t(41) = -10.10, p<0.001	t(41) = -25.94, p<0.001	t(41) = -12.99, p<0.001
KYNA	Control	23.15±2.13	23.18±2.11	23.23±2.08	1.89±0.08
	LPS	23.89±2.95	23.01±3.15	22.23±3.08	1.80±0.10
	T-test	t(41) = -0.20, p = 0.84	t(41) = 0.05, p = 0.96	t(41) = 0.28, p = 0.78	t(41) = 0.71, p = 0.48
3-OH-KYN	Control	17.81±0.74	21.18±0.71	19.30±0.60	47.88±0.72
	LPS	36.20±1.15	40.48±0.75	37.10±1.26	75.21±2.03
	T-test	t(41) = -13.96, p<0.001	t(41) = -18.50, p<0.001	t(41) = -13.59, p<0.001	t(41) = -13.84, p<0.001
QUIN	Control	32.84±0.72	32.33±0.52	32.35±0.61	16.65±0.43
	LPS	43.41±0.46	41.05±0.78	40.43±0.96	22.24±0.46
	T-test	t(41) = -11.88, p<0.001	t(41) = -9.38, p<0.001	t(41) = -7.33, p<0.001	t(41) = -8.83, p<0.001

Values (ng/ml) represent mean ± SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0115439.t003

processes) compared to those in the control group. Although the astroglial hypertrophy was present in multiple brain regions (especially in periventricular areas, but less so in the cortex), the most distinct changes were found in the hippocampus (hilus of the dentate gyrus, stratum lacunosum moleculare and stratum oriens) and in the SNpc. The percentage of the area containing GFAP immunoreactivity of LPS treated animals was significantly higher than in the control group in the hippocampus (22.97±2.02% vs. 9.26±1.11%) [U(6) = 0, Z = -2.17, p<0.05] and in the SNpc (8.75±1.85% vs. 3.25±0.56%) [U(6) = 0, Z = -2.17, p<0.05] (Figs. 3 and 4).

### Neurodegeneration

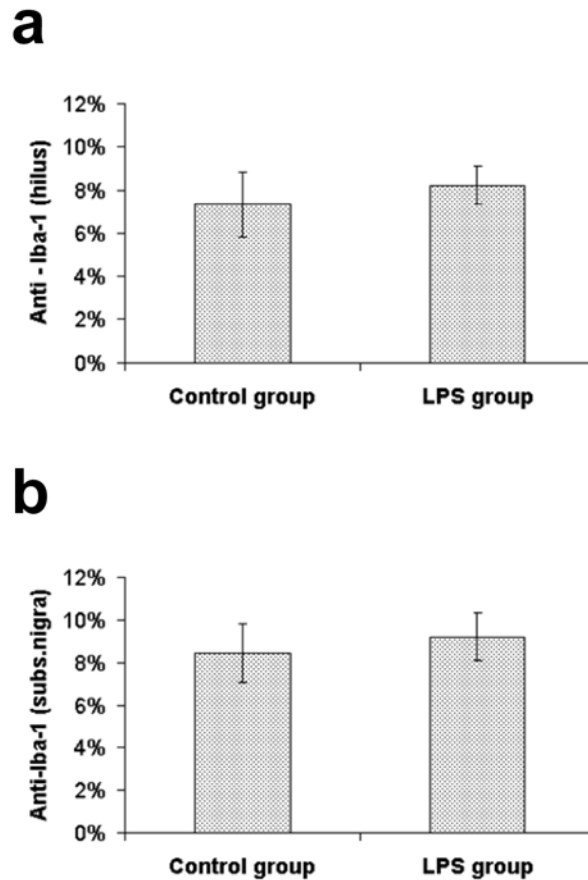
We did not detect any Fluoro-Jade B positivity at PD 93–97 in the brains of animals perinatally treated with LPS. The analysis of cell nuclei did not show any sign of nuclear pathology, e.g. nuclear shrinkage or fragmentation. The saline treated controls exhibited the same results.

### Hippocampal volume

We found a significant reduction of hippocampal volume in LPS treated animals (33.9±1.4 mm<sup>3</sup>) compared with the control group (37.6±0.9 mm<sup>3</sup>) [U(14) = 11.5, Z = 2.1, p<0.05]. The reduction of hippocampal volume in LPS treated animals was approximately 10% (Fig. 5).

### Tyrosine hydroxylase-positive cells in the substantia nigra, pars compacta

There was a significant reduction of the number of TH-positive cells in the SNpc in LPS treated animals (23 172±2 438) compared with the control group (31 830±1 891) [U(13) = 9, Z = 2.14, p<0.05]. The reduction of TH-positive cells in LPS treated animals was approximately 27% (Fig. 6).



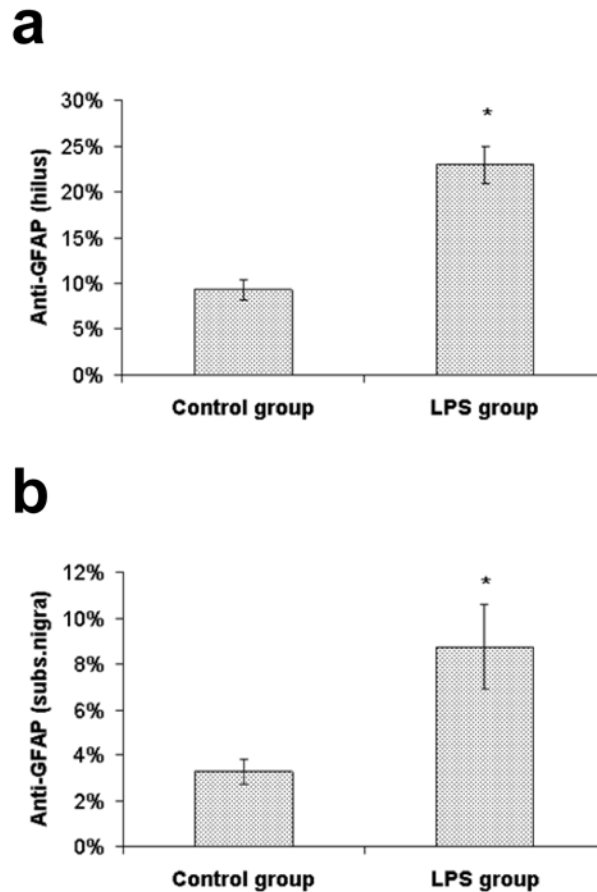
**Figure 2. Percentage of the area containing Iba1 immunoreactivity.** Values (%) represent mean  $\pm$  SEM. a) hilus of the dentate gyrus, b) substantia nigra.

doi:10.1371/journal.pone.0115439.g002

## Discussion

The main findings of this study are changes in the biochemistry and brain morphology of adult animals perinatally exposed to LPS. Our study showed that the early postnatal LPS administration led to a volume reduction of the hippocampus. To our knowledge this is the first study which documents that the hippocampal volume can be significantly altered not only after intracerebral injection [30] but also after systemic LPS administration, which is a condition more likely to simulate the perinatal infection. The early postnatal period in rats corresponds approximately with the third trimester of human brain development [31, 32]. Over-expression of cytokines during this period disrupts the development of nervous system [33]. Structural brain changes in the adult brains (white matter damage, dilatation of lateral ventricles, striatal volume reduction) resulting from early postnatal LPS exposure have been attributed to the maldevelopment of oligodendrocytes [2, 5, 20, 30, 34], which may in turn underlie maldevelopment of brain networks and even whole brain structures, e.g. hippocampus. Hippocampal volume reduction is one of the signs associated in humans with various neuropsychiatric disorders, such as schizophrenia, major depressive disorder, bipolar disorder, posttraumatic stress disorder, Alzheimer's disease, Parkinson's disease or vascular dementia [23–27].

The increased levels of KYN and metabolites from the inflammatory part of the kynurenine pathway (3-OH-KYN, QUIN) in the brain and plasma could be mediated by indole-2,3-dioxygenase (IDO) and the enzymes of the inflammatory part of the kynurenine pathway,

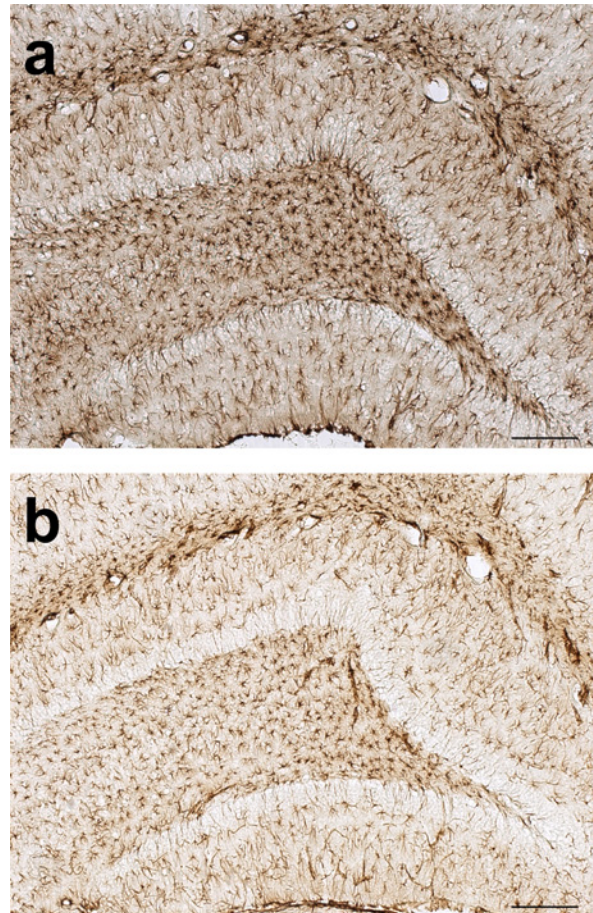


**Figure 3. Percentage of the area containing GFAP immunoreactivity.** Values (%) represent mean  $\pm$  SEM (\* indicates  $p < 0.05$  from the control group). a) hilus of the dentate gyrus, b) substantia nigra.

doi:10.1371/journal.pone.0115439.g003

which are activated by pro-inflammatory cytokines [22]. The persistent elevation of pro-inflammatory cytokines in adulthood has been described previously by our group in this animal model of early immune stimulation [12]. Unlike KYN and 3-OH-KYN, QUIN is not able to cross the blood brain barrier (BBB) [35]; therefore the production of QUIN in the brain is regulated by local enzyme activity. Hippocampal formation is very sensitive to QUIN induced excitotoxicity [36], which is consistent with our finding of decreased hippocampal volume in LPS treated animals. However, we did not detect any Fluoro-Jade B positivity or changes of neuronal nuclei typical for cell death at PD 93–97, which indicates a lack of ongoing neurodegeneration. This corresponds with the results of studies that did not detect neurodegeneration in adult LPS treated animals hours or weeks after LPS administration [37, 38]. The activation of the inflammatory part of the kynurenine pathway has been described in relation with major depressive disorder, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and epilepsy [22]. On the other hand, elevated KYN levels have been found in the post-mortem prefrontal cortex [39] and elevated KYN and KYNA levels in cerebral spinal fluid [40] of schizophrenic patients. Although we identified increased levels of KYN in LPS treated animals, we did not find any change of KYNA levels in the brain or plasma compared to the controls.

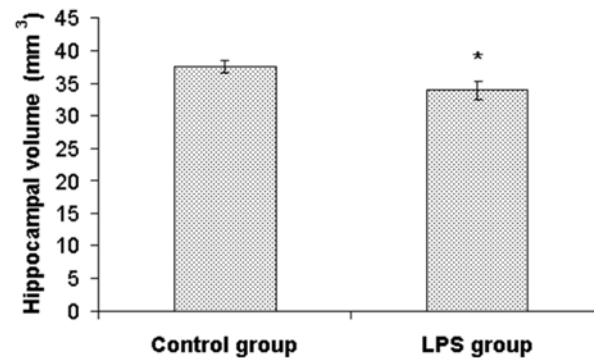
The higher TRP plasma levels in the LPS group represent an interesting and unexpected finding. Neuropsychiatric disorders such as depression, anxiety and sometimes schizophrenia are usually associated with low TRP levels, which result in a decrease of 5-HT synthesis [41–44]. On



**Figure 4. Microphotographs of GFAP immunoreactivity in the dentate gyrus (scale bar = 200µm).**  
a) LPS treated group, b) Control group.

doi:10.1371/journal.pone.0115439.g004

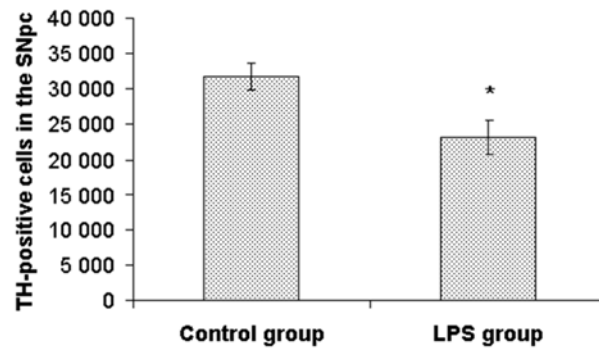
the other hand, several studies described increased TRP levels in blood, cerebrospinal fluid and post-mortem brain tissue of schizophrenic patients [45–47]. TRP, an essential amino acid, is absorbed from the diet in the small intestine by a specialized transporter protein and transported in the blood bound to albumin or in a free form, which passes through the BBB [48, 49]. We suggest



**Figure 5. Effect of perinatal LPS treatment on hippocampal volume.** Values (mm<sup>3</sup>) represent mean ± SEM (\* indicates p<0.05 from the control group).

doi:10.1371/journal.pone.0115439.g005





**Figure 6. Number of TH-positive cells in the substantia nigra, pars compacta.** Values represent mean  $\pm$  SEM (\* indicates  $p < 0.05$  from the control group).

doi:10.1371/journal.pone.0115439.g006

that the discrepancies in TRP levels in LPS animals might be due to gastrointestinal disturbances, which would change the absorption of TRP from the diet, or by an alteration in albumin-TRP binding, which would increase the plasma levels of free TRP, or by an impairment of TRP catabolism. However the latter is less likely because the immune response activates enzymes of inflammatory part of kynurenine pathway, which results in a decline of TRP and subsequently also 5-HT levels [50]. IDO, the crucial enzyme of kynurenine pathway, catalyzes not only TRP degeneration but also the production of formyl 5-HT from 5-HT [51, 52], which might explain the low levels of 5-HT in the LPS treated animals despite the increased levels of TRP. Alternative explanation of decreased 5-HT levels could be based on enhanced metabolism of 5-HT to 5-HIAA by monoamine oxidase (MAO). In a recent study, the quantification of hippocampal neurotransmitters in a mice model of depression showed an elevated ratio of 5-HIAA to 5-HT reflecting enhanced turnover of 5-HT and increased serotonergic activity in depressive mice [53]. Congruently, in our study, there was a negative correlation between the levels of 5-HT and 5-HIAA ( $r = -0.69$ ,  $p = 0.001$ ) in the hippocampus of the LPS treated animals but not in the control animals.

Perinatal LPS exposure has been shown to suppress TH immunoreactivity in the SN and VTA in adulthood [19, 20, 54], which is consistent with our finding of a reduced number of TH-positive cells in the SNpc. However, we also found increased DA levels in the brain and plasma in LPS treated animals. LPS challenge during the perinatal period induces an increase in TH phosphorylation and activity in adrenals persisting until adulthood [16, 55]. TH catalyzes the conversion of amino acid L-tyrosine into DA precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), which is able to cross the BBB. We propose that the elevated brain levels of DA in LPS treated animals were evoked by increased L-DOPA synthesis in the periphery and its subsequent crossing through the BBB. Schizophrenia is associated with hyperactivity of mesolimbic dopaminergic neurons and prefrontal hypodopaminergia [56]. High DA levels in the striatum and hippocampus may support early immune stimulation being an animal model of schizophrenia, however the decreased TH immunoreactivity in the SNpc could be more relevant to the pathogenesis of Parkinson's disease [19, 20, 54].

The increase of plasma levels of DA metabolites (DOPAC, 3-MT, HVA) in LPS treated animals may be associated with increased DA availability in plasma. The increased brain levels of DOPAC and HVA may be explained by the activation of monoamine oxidase B demonstrated in proliferating and reactive astrocytes [57], which were also found in this study.

The reduction of TH expression in the SN and the ventral tegmental area in adult animals after postnatal LPS exposure has been ascribed to a chronic microglial activation in this region [19, 20, 54]. In our study we chose Iba1 as a microglial marker that has proven most helpful in

visualizing microglia with details of their processes and which expression increases with microglial activation [58]. However, the microglia in the SN and hippocampus mostly showed signs of a resting state with an occasional occurrence of a hypertrophied microglial body in both the LPS and control groups. According to some studies intracerebral as well as systemic postnatal LPS administration leads to microglial activation, which persists until adulthood [15, 30, 34, 59]. In contrast, a recent study showed that early postnatal systemic LPS administration (PD5) increased microglial density in the hippocampus 48 hours after the administration, but in PD21 and PD74 animals the microglial density and the number of microglia did not differ from saline treated controls [21]. The authors also speculated on the possible existence of a target or maximum density of microglia in the brain [21].

Astrocytes influence a series of postnatal developmental steps, e.g. neuronal synapse formation, myelination and homeostasis of the central nervous system [60–62]. The transition of astrocytes into a reactive state, as we found in the SN and hippocampus of LPS treated animals, can possibly interfere with its functions because reactive astrocytes in vitro produce neurotoxic molecules such as NO, reactive oxygen species and TNF $\alpha$  [63]. On the other hand, pro-inflammatory mediators produced by microglia support neuroprotective astrocyte responses [64, 65]. Astroglialosis was reported in patients with schizophrenia, autism and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's or Parkinson's disease [66–69]. In contrast, major depressive disorder is characteristic of the reduction in the density of astrocytes [70].

Proinflammatory mediators induce the synthesis of QUIN, which acts as an NMDA receptor agonists and an important neurotoxic compound [22]. At high levels, QUIN promotes GLU release by neurons, inhibits its reuptake by astrocytes and inhibits astroglial glutamine synthetase (GS) resulting in an accumulation of GLU [35], as was found in the present study. GLU serves as a precursor for the major inhibitory neurotransmitter GABA. Our finding of decreased GABA levels in the hippocampus and prefrontal cortex in the LPS group may be mediated by the inhibition of GS [35]. The inhibition of GS is also induced by reactive astroglialosis [71]. The increased plasma levels of GABA in the LPS group may be due to synthesis from GLU in peripheral tissues [72, 73]. In our study there was a negative correlation between the levels of GLU and GABA ( $r = -0.51$ ,  $p = 0.03$ ) in the hippocampus of LPS treated animals but not in control animals. Abnormalities in glutamatergic and GABAergic systems such as the combination of increased GLU and decreased GABA levels in the brain have been associated with mood and anxiety disorders or autism [74–77].

In conclusion, the early immune stimulation induced by postnatal systemic administration of LPS leads to biochemical actions resulting in alterations of neurotransmitter metabolism and activation of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism as well as astroglialosis, hippocampal volume reduction and a decrease of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra. Our results suggest a pathogenetic link between early immune stimulation and neuropsychiatric disorders such as schizophrenia, mood disorders, anxiety disorders, autism, Parkinson's disease and Alzheimer's disease.

## Supporting Information

### S1 ARRIVE Guidelines Checklist.

(DOC)

## Acknowledgments

We would like to thank Tomas Novak M.D., Ph.D. for help with the statistical analysis, Craig Hampson BSc (Hons) for language correction and the Institute of Physiology at the

Academy of Sciences of the Czech Republic for use of their Stereo Investigator software, instruction and support.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JH HT AK. Performed the experiments: AK KS PK JV. Analyzed the data: AK. Contributed reagents/materials/analysis tools: KS PK. Wrote the paper: AK. Provided technical support and conceptual advice: FT MF TP. Critically reviewed the manuscript: JH.

## References

1. Schmitt A, Malchow B, Hasan A, Falkai P (2014) The impact of environmental factors in severe psychiatric disorders. *Front Neurosci* 8: 19. doi: [10.3389/fnins.2014.00019](https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00019) PMID: [24574956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24574956/)
2. Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C (2006) Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med* 11: 343–353. doi: [10.1016/j.siny.2006.04.002](https://doi.org/10.1016/j.siny.2006.04.002) PMID: [16793357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16793357/)
3. Spencer SJ, Galic MA, Pittman QJ (2011) Neonatal programming of innate immune function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E11–E18. doi: [10.1152/ajpendo.00516.2010](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00516.2010) PMID: [21045175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21045175/)
4. Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, et al. (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175: 4320–4330. doi: [10.4049/jimmunol.175.7.4320](https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4320) PMID: [16177072](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16177072/)
5. Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, et al. (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22: 2478–2486. PMID: [11923412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11923412/)
6. Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, et al. (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9: 1081–1088. doi: [10.1038/ncb1629](https://doi.org/10.1038/ncb1629) PMID: [17704767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17704767/)
7. Shanks N, Larocque S, Meaney MJ (1995) Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsiveness to stress. *J Neurosci* 15: 376–384. PMID: [7823142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7823142/)
8. Shanks N, Windle RJ, Perks PA, Harbuz MS, Jessop DS, et al. (2000) Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5645–5650. doi: [10.1073/pnas.090571897](https://doi.org/10.1073/pnas.090571897) PMID: [10779563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10779563/)
9. Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, et al. (2008) Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry* 63: 801–808. doi: [10.1016/j.biopsych.2007.09.024](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.09.024) PMID: [18005941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18005941/)
10. Tejkalová H, Jelínek F, Klaschka J, Š astný F (2007) Vliv perinatální zán tlivé reakce na rozvoj psychóze podobného chování: experimentální studie (Effect of perinatal inflammatory reaction on the induction of psychotic-like behaviour: experimental study). *Psychiatrie* 11: 12–15.
11. Tejkalová H, Jelínek F, Klaschka J, Š astný F (2008) Vliv chronického podávání klozapinu na chování potkan v neuroinfekčním modelu schizofrenie (Effect of chronic clozapine administration on the behavioural pattern of rats in the neuroinfectious model of schizophrenia). *Psychiatrie* 12: 68–72.
12. Tejkalová H, R žičková Š, Klaschka J (2010) Vliv chronického podávání antipsychotik na expresi cytokin v neuroinfekčním modelu schizofrenie (Effect of antipsychotic chronic administration on cytokine expression in neuroinfectious model of schizophrenia). *Psychiatrie* 14: 19–21.
13. Doosti MH, Bakhtiari A, Zare P, Amani M, Majidi-Zolbanin N, et al. (2013) Impacts of early intervention with fluoxetine following early neonatal immune activation on depression-like behaviors and body weight in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 43: 55–65. doi: [10.1016/j.pnpbp.2012.12.003](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.12.003) PMID: [23270703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23270703/)
14. Kirsten TB, Chaves-Kirsten GP, Chaible LM, Silva AC, Martins DO, et al. (2012) Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. *J Neurosci Res* 90: 1903–1912. doi: [10.1002/jnr.23089](https://doi.org/10.1002/jnr.23089) PMID: [22714803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22714803/)
15. Sominsky L, Walker AK, Ong LK, Tynan RJ, Walker FR, et al. (2012) Increased microglial activation in the rat brain following neonatal exposure to a bacterial mimetic. *Behav Brain Res* 226: 351–356. doi: [10.1016/j.bbr.2011.08.038](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.08.038) PMID: [21907243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21907243/)
16. Sominsky L, Fuller EA, Bondarenko E, Ong LK, Averell L, et al. (2013) Functional programming of the autonomic nervous system by early life immune exposure: implications for anxiety. *PLoS One* 8: e57700. doi: [10.1371/journal.pone.0057700](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057700) PMID: [23483921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23483921/)

17. Zhu F, Zhang L, Ding YQ, Zhao J, Zheng Y (2014) Neonatal intrahippocampal injection of lipopolysaccharide induces deficits in social behavior and prepulse inhibition and microglial activation in rats: Implication for a new schizophrenia animal model. *Brain Behav Immun* 38: 166–174. doi: [10.1016/j.bbi.2014.01.017](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.01.017) PMID: [24530999](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24530999/)
18. Bilbo SD, Schwarz JM (2009) Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci* 3: 14. doi: [10.3389/fnins.2009.08.014.2009](https://doi.org/10.3389/fnins.2009.08.014.2009) PMID: [19738918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19738918/)
19. Cai Z, Fan LW, Kaizaki A, Tien LT, Ma T, et al. (2013) Neonatal systemic exposure to lipopolysaccharide enhances susceptibility of nigrostriatal dopaminergic neurons to rotenone neurotoxicity in later life. *Dev Neurosci* 35: 155–171. doi: [10.1159/000346156](https://doi.org/10.1159/000346156) PMID: [23446007](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23446007/)
20. Fan LW, Tien LT, Zheng B, Pang Y, Lin RC, et al. (2011) Dopaminergic neuronal injury in the adult rat brain following neonatal exposure to lipopolysaccharide and the silent neurotoxicity. *Brain Behav Immun* 25: 286–297. doi: [10.1016/j.bbi.2010.09.020](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.09.020) PMID: [20875849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20875849/)
21. Smith PL, Hagberg H, Naylor AS, Mallard C (2014) Neonatal Peripheral Immune Challenge Activates Microglia and Inhibits Neurogenesis in the Developing Murine Hippocampus. *Dev Neurosci*. doi: [10.1159/000359950](https://doi.org/10.1159/000359950)
22. Campbell BM, Charych E, Lee AW, Moller T (2014) Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Front Neurosci* 8: 12. doi: [10.3389/fnins.2014.00012](https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00012) PMID: [24567701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24567701/)
23. Brambilla P, Hatch JP, Soares JC (2008) Limbic changes identified by imaging in bipolar patients. *Curr Psychiatry Rep* 10: 505–509. doi: [10.1007/s11920-008-0080-8](https://doi.org/10.1007/s11920-008-0080-8) PMID: [18980734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18980734/)
24. Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, et al. (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157: 115–118. PMID: [10618023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10618023/)
25. Haukvik UK, Hartberg CB, Agartz I (2013) Schizophrenia—what does structural MRI show? *Tidsskr Nor Laegeforen* 133: 850–853. doi: [10.4045/tidsskr.12.1084](https://doi.org/10.4045/tidsskr.12.1084) PMID: [23612107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23612107/)
26. Laakso MP, Partanen K, Riekkinen P, Lehtovirta M, Helkala EL, et al. (1996) Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: An MRI study. *Neurology* 46: 678–681. doi: [10.1212/WNL.46.3.678](https://doi.org/10.1212/WNL.46.3.678) PMID: [8618666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8618666/)
27. Woon FL, Sood S, Hedges DW (2010) Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34: 1181–1188. doi: [10.1016/j.pnpbp.2010.06.016](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.016) PMID: [20600466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20600466/)
28. Najmanova V, Rambousek L, Syslova K, Bubenikova V, Slamberova R, et al. (2011) LC-ESI-MS/MS Method for Monitoring Dopamine, Serotonin and Their Metabolites in Brain Tissue. *Chromatographia* 73: 143–149. doi: [10.1007/s10337-011-1959-9](https://doi.org/10.1007/s10337-011-1959-9)
29. Paxinos G. and Watson C. (1-1-2007) *The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Inc.
30. Wang KC, Fan LW, Kaizaki A, Pang Y, Cai Z, et al. (2013) Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. *Neuroscience* 234: 146–157. doi: [10.1016/j.neuroscience.2012.12.049](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.12.049) PMID: [23298854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23298854/)
31. Craig A, Ling LN, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, et al. (2003) Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol* 181: 231–240. doi: [10.1016/S0014-4886\(03\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00032-3) PMID: [12781996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12781996/)
32. Feleder C, Tseng KY, Calhoon GG, O'Donnell P (2010) Neonatal intrahippocampal immune challenge alters dopamine modulation of prefrontal cortical interneurons in adult rats. *Biol Psychiatry* 67: 386–392. doi: [10.1016/j.biopsych.2009.09.028](https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.028) PMID: [19914600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19914600/)
33. Ratnayake U, Quinn T, Walker DW, Dickinson H (2013) Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. *Front Neurosci* 7: 180. doi: [10.3389/fnins.2013.00180](https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00180) PMID: [24146637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24146637/)
34. Pang Y, Cai Z, Rhodes PG (2003) Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide. *Brain Res Dev Brain Res* 140: 205–214. doi: [10.1016/S0165-3806\(02\)00606-5](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00606-5) PMID: [12586426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12586426/)
35. Guillemin GJ (2012) Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J* 279: 1356–1365. doi: [10.1111/j.1742-4658.2012.08493.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08493.x) PMID: [22248144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22248144/)
36. St'astny F, Skultetyova I, Pliss L, Jezova D (2000) Quinolinic acid enhances permeability of rat brain microvessels to plasma albumin. *Brain Res Bull* 53: 415–420. doi: [10.1016/S0361-9230\(00\)00368-3](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(00)00368-3) PMID: [11136997](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11136997/)
37. Chung DW, Yoo KY, Hwang IK, Kim DW, Chung JY, et al. (2010) Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus. *Cell Mol Neurobiol* 30: 531–541. doi: [10.1007/s10571-009-9477-0](https://doi.org/10.1007/s10571-009-9477-0) PMID: [19908141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19908141/)
38. Terrazzino S, Bauleo A, Baldan A, Leon A (2002) Peripheral LPS administrations up-regulate Fas and FasL on brain microglial cells: a brain protective or pathogenic event? *J Neuroimmunol* 124: 45–53. doi: [10.1016/S0165-5728\(02\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00013-9) PMID: [11958821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11958821/)

39. Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu HQ, Medoff D, Tammimga CA, et al. (2001) Increased cortical kynure-nate content in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50: 521–530. doi: [10.1016/S0006-3223\(01\)01078-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01078-2) PMID: [11600105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11600105/)
40. Linderholm KR, Skogh E, Olsson SK, Dahl ML, Holtze M, et al. (2012) Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia. *Schizophr Bull* 38: 426–432. doi: [10.1093/schbul/sbq086](https://doi.org/10.1093/schbul/sbq086) PMID: [20729465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20729465/)
41. Almeida-Montes LG, Valles-Sanchez V, Moreno-Aguilar J, Chavez-Balderas RA, Garcia-Marin JA, et al. (2000) Relation of serum cholesterol, lipid, serotonin and tryptophan levels to severity of depression and to suicide attempts. *J Psychiatry Neurosci* 25: 371–377. PMID: [11022402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11022402/)
42. Lee M, Jayathilake K, Dai J, Meltzer HY (2011) Decreased plasma tryptophan and tryptophan/large neutral amino acid ratio in patients with neuroleptic-resistant schizophrenia: relationship to plasma cortisol concentration. *Psychiatry Res* 185: 328–333. doi: [10.1016/j.psychres.2010.07.013](https://doi.org/10.1016/j.psychres.2010.07.013) PMID: [20699195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20699195/)
43. Gauthier C, Hassler C, Mattar L, Launay JM, Callebert J, et al. (2014) Symptoms of depression and anxiety in anorexia nervosa: links with plasma tryptophan and serotonin metabolism. *Psychoneuroendocrinology* 39: 170–178. doi: [10.1016/j.psychneuen.2013.09.009](https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2013.09.009) PMID: [24135616](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24135616/)
44. Bell C, Abrams J, Nutt D (2001) Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. *Br J Psychiatry* 178: 399–405. doi: [10.1192/bjp.178.5.399](https://doi.org/10.1192/bjp.178.5.399) PMID: [11331552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11331552/)
45. Miller CL, Llenos IC, Cwik M, Walkup J, Weis S (2008) Alterations in kynurenine precursor and product levels in schizophrenia and bipolar disorder. *Neurochem Int* 52: 1297–1303. doi: [10.1016/j.neuint.2008.01.013](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.01.013) PMID: [18328600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18328600/)
46. Issa F, Gerhardt GA, Bartko JJ, Suddath RL, Lynch M, et al. (1994) A multidimensional approach to analysis of cerebrospinal fluid biogenic amines in schizophrenia: I. Comparisons with healthy control subjects and neuroleptic-treated/unmedicated pairs analyses. *Psychiatry Res* 52: 237–249.
47. Ravikumar A, Deepadevi KV, Arun P, Manojkumar V, Kurup PA (2000) Tryptophan and tyrosine catabolic pattern in neuropsychiatric disorders. *Neurol India* 48: 231–238. PMID: [11025626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11025626/)
48. Bohmer C, Broer A, Munzinger M, Kowalczyk S, Rasko JE, et al. (2005) Characterization of mouse amino acid transporter B0AT1 (slc6a19). *Biochem J* 389: 745–751. doi: [10.1042/BJ20050083](https://doi.org/10.1042/BJ20050083) PMID: [15804236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15804236/)
49. Pratt OE (1979) Kinetics of tryptophan transport across the blood-brain barrier. *J Neural Transm Suppl* 29–42: .
50. Maes M, Leonard BE, Myint AM, Kubera M, Verkerk R (2011) The new ‘5-HT’ hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 702–721. PMID: [21185346](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21185346/)
51. Stone TW, Darlington LG (2002) Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1: 609–620. doi: [10.1038/nrd870](https://doi.org/10.1038/nrd870) PMID: [12402501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12402501/)
52. Stone TW, Forrest CM, Darlington LG (2012) Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *FEBS J* 279: 1386–1397. doi: [10.1111/j.1742-4658.2012.08487.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08487.x) PMID: [22248239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22248239/)
53. Huang F, Li J, Shi HL, Wang TT, Muhtar W, et al. (2014) Simultaneous quantification of seven hippocampal neurotransmitters in depression mice by LC-MS/MS. *J Neurosci Methods* 229: 8–14. doi: [10.1016/j.jneumeth.2014.04.004](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.04.004) PMID: [24735530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24735530/)
54. Fan LW, Tien LT, Lin RC, Simpson KL, Rhodes PG, et al. (2011) Neonatal exposure to lipopolysaccharide enhances vulnerability of nigrostriatal dopaminergic neurons to rotenone neurotoxicity in later life. *Neurobiol Dis* 44: 304–316. doi: [10.1016/j.nbd.2011.07.011](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.07.011) PMID: [21798348](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21798348/)
55. Ong LK, Sominsky L, Dickson PW, Hodgson DM, Dunkley PR (2012) The sustained phase of tyrosine hydroxylase activation in vivo. *Neurochem Res* 37: 1938–1943. doi: [10.1007/s11064-012-0812-3](https://doi.org/10.1007/s11064-012-0812-3) PMID: [22684282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22684282/)
56. Brisch R, Saniotis A, Wolf R, Bielau H, Bernstein HG, et al. (2014) The role of dopamine in schizophrenia from a neurobiological and evolutionary perspective: old fashioned, but still in vogue. *Front Psychiatry* 5: 47. doi: [10.3389/fpsyt.2014.00047](https://doi.org/10.3389/fpsyt.2014.00047) PMID: [24904434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24904434/)
57. Gulyas B, Pavlova E, Kasa P, Gulya K, Bakota L, et al. (2011) Activated MAO-B in the brain of Alzheimer patients, demonstrated by [<sup>11</sup>C]-L-deprenyl using whole hemisphere autoradiography. *Neurochem Int* 58: 60–68. doi: [10.1016/j.neuint.2010.10.013](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.10.013) PMID: [21075154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21075154/)
58. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011) Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91: 461–553. doi: [10.1152/physrev.00011.2010](https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010) PMID: [21527731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21527731/)

59. Patro N, Singh K, Patro I (2013) Differential microglial and astrocytic response to bacterial and viral infection in the developing hippocampus of neonatal rats. *Indian J Exp Biol* 51: 606–614. PMID: [24228384](#)
60. Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180–190. doi: [10.1002/glia.1107](#) PMID: [11596126](#)
61. Meyer-Franke A, Shen S, Barres BA (1999) Astrocytes induce oligodendrocyte processes to align with and adhere to axons. *Mol Cell Neurosci* 14: 385–397. doi: [10.1006/mcne.1999.0788](#) PMID: [10588392](#)
62. Molofsky AV, Krenick R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, et al. (2012) Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 26: 891–907. doi: [10.1101/gad.188326.112](#) PMID: [22549954](#)
63. Carson MJ, Thrash JC, Walter B (2006) The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. *Clin Neurosci Res* 6: 237–245. doi: [10.1016/j.cnr.2006.09.004](#) PMID: [19169437](#)
64. Bsibsi M, Persoon-Deen C, Verwer RW, Meeuwse S, Ravid R, et al. (2006) Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia* 53: 688–695. doi: [10.1002/glia.20328](#) PMID: [16482523](#)
65. Okada K, Yamashita U, Tsuji S (2005) Modulation of Na(+)-dependent glutamate transporter of murine astrocytes by inflammatory mediators. *J UOEH* 27: 161–170. PMID: [15986771](#)
66. Catts VS, Wong J, Fillman SG, Fung SJ, Weickert CS (2014) Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: Association with neuroinflammation. *Aust N Z J Psychiatry*. doi: [10.1177/0004867414531078](#) PMID: [24744400](#)
67. Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Di MD, Langston JW (1992) Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 94: 429–436. doi: [10.1016/S0079-6123\(08\)61770-7](#) PMID: [1287728](#)
68. Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann Neurol* 57: 67–81. doi: [10.1002/ana.20315](#) PMID: [15546155](#)
69. Wisniewski HM, Wegiel J (1991) Spatial relationships between astrocytes and classical plaque components. *Neurobiol Aging* 12: 593–600. doi: [10.1016/0197-4580\(91\)90091-W](#) PMID: [1770990](#)
70. Rajkowska G, Stockmeier CA (2013) Astrocyte pathology in major depressive disorder: insights from human postmortem brain tissue. *Curr Drug Targets* 14: 1225–1236. doi: [10.2174/13894501113149990156](#) PMID: [23469922](#)
71. Ortinski PI, Dong J, Mungenast A, Yue C, Takano H, et al. (2010) Selective induction of astrocytic gliosis generates deficits in neuronal inhibition. *Nat Neurosci* 13: 584–591. doi: [10.1038/nn.2535](#) PMID: [20418874](#)
72. van Bemmelen FJ, Schouten MJ, Fekkes D, Bruinvels J (1985) Succinic semialdehyde as a substrate for the formation of gamma-aminobutyric acid. *J Neurochem* 45: 1471–1474. doi: [10.1111/j.1471-4159.1985.tb07214.x](#) PMID: [2864395](#)
73. White HL (1981) Glutamate as a precursor of GABA in rat brain and peripheral tissues. *Mol Cell Biochem* 39: 253–259. doi: [10.1007/BF00232578](#) PMID: [6118823](#)
74. Krystal JH, Sanacora G, Blumberg H, Anand A, Charney DS, et al. (2002) Glutamate and GABA systems as targets for novel antidepressant and mood-stabilizing treatments. *Mol Psychiatry* 7 Suppl 1: S71–S80. doi: [10.1038/sj.mp.4001021](#) PMID: [11986998](#)
75. Meyerhoff DJ, Mon A, Metzler T, Neylan TC (2014) Cortical gamma-aminobutyric Acid and glutamate in posttraumatic stress disorder and their relationships to self-reported sleep quality. *Sleep* 37: 893–900. doi: [10.5665/sleep.3654](#) PMID: [24790267](#)
76. Pollack MH, Jensen JE, Simon NM, Kaufman RE, Renshaw PF (2008) High-field MRS study of GABA, glutamate and glutamine in social anxiety disorder: response to treatment with levetiracetam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 739–743. doi: [10.1016/j.pnpbp.2007.11.023](#) PMID: [18206286](#)
77. Quaak I, Brouns MR, Van de BM (2013) The dynamics of autism spectrum disorders: how neurotoxic compounds and neurotransmitters interact. *Int J Environ Res Public Health* 10: 3384–3408. doi: [10.3390/ijerph10083384](#) PMID: [23924882](#)

# SROVNÁNÍ VLIVU HALUCINOGENŮ PSILOCINU A MEZKALINU NA KVANTITATIVNÍ EEG A SENZORIMOTORICKÉ ZPRACOVÁNÍ INFORMACÍ – ANIMÁLNÍ MODEL PSYCHÓZY

## A COMPARISON OF THE EFFECTS OF TWO HALLUCINOGENS, PSILOCIN AND MESKALINE, IN QUANTITATIVE EEG AND IN SENZORIMOTOR INFORMATION PROCESSING IN THE ANIMAL MODEL OF PSYCHOSIS

TOMÁŠ PÁLENÍČEK<sup>1,2</sup>, MICHAELA FUJÁKOVÁ<sup>1,2</sup>, FILIP TYLŠ<sup>1,2</sup>, ANNA KUBEŠOVÁ<sup>1,2</sup>, MARTIN BRUNOVSKÝ<sup>1,2</sup>, JIŘÍ HORÁČEK<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Psychiatrické centrum Praha

<sup>2</sup>3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

### SOUHRN

Pro schizofrenii jsou charakteristické změny jak v kvantitativním EEG, tak i významný deficit v senzomotorickém zpracování. Cílem této práce bylo srovnat vliv tryptaminového (psilocin) a fenylethylaminového (mezkalin) halucinoгенu v animálním modelu psychózy. Testovali jsme senzomotorické zpracování informací a vliv na funkční konektivitu mozku pomocí kvantitativního EEG (qEEG). EEG záznamy jsme registrovali ze 12 subdurálních elektrod umístěných nad homologními částmi frontální, motorické, parietální a temporální mozkové kůry u volně se pohybujících potkanů. Obě látky narušily senzomotorické zpracování informací a z hlediska qEEG indukovaly deficit ve funkční konektivité. Tento deficit se projevoval jak snížením EEG výkonu napříč spektrem, a tak i snížením EEG koherencí. Naše data vykazují značnou podobnost s nálezy u nemocných schizofrenií, což vypovídá o validitě použitých modelů.

**Klíčová slova:** schizofrenie, psilocin, mezkalin, potkan, EEG spektra, EEG koherence, prepulzní inhibice úlekové reakce

### SUMMARY

Deficits in sensorimotor information processing as well as some changes in quantitative EEG (qEEG) are characteristic for schizophrenia. This study focuses on a comparison of two hallucinogens, tryptamine (psilocin) and phenylethylamine (meskalin), in an animal model of psychosis. The registration of qEEG was performed from 12 subdural electrodes placed on six homologous sites of frontal, motor, parietal and temporal cortex in freely moving rats. Both substances disrupted sensorimotor information processing as well as they both decreased functional connectivity in qEEG (i.e. decrease in power spectra and coherence). Our data are similar to findings of schizophrenia patients, confirming validity of used models.

**Key words:** schizophrenia, psilocin, meskalin, rat, EEG spectra, EEG coherence, prepulse inhibition of startle reaction

Páleníček T, Fujáková M, Tylš F, Kubešová A, Brunovský M, Horáček J. Srovnání vlivu halucinoгенů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a senzomotorické zpracování informací – animální model psychózy. *Psychiatrie* 2011;15(Suppl. 2):44-48.

### Úvod

Psilocin a mezkalin představují modelové zástupce dvou velkých rodin psychedelík – halucinoгенních tryptaminů a fenylethylaminů (Nichols et al., 2004). Mechanizmem účinku těchto látek je především agonismus na serotoninových 5-HT<sub>2A/C</sub> receptorech. Jedním z hlavních diskriminujících faktorů z hlediska mechanismu účinku je především agonismus tryptaminů na 5-HT<sub>1A</sub> receptorech (Páleníček et al., 2008).

Obě zmíněná psychedelika jsou hojně používána jako modely psychóz jak u zvířat, tak i u lidí (Palenicek et al., 2008; Vollenweider et al., 1998). Jejich použití se opírá o fenomenologickou podobnost účinků u lidí s příznaky psychóz (především halucinace, bludy, formální a obsahové poruchy myšlení, poruchy kognitivních funkcí apod.). Současně z neurobiologického hlediska představují pilíře serotoninergní teorie vysvětlující etiopatogenezu psychotických příznaků

u schizofrenního onemocnění (Aghajanian a Marek, 2000). Na druhou stranu antagonismus na serotoninových 5-HT<sub>2A/C</sub> receptorech významně přispívá k antipsychotickému účinku novějších antipsychotik (Horáček et al., 2006). Jedním z dobře měřitelných parametrů, které jsou narušeny u schizofrenie i během akutního účinku psychedelík, je deficit v senzomotorickém zpracování informací (Ludewig et al., 2002). Tento deficit je snadno měřitelný pomocí testu prepulzní inhibice úlekové reakce jak v animálních, tak i v humanálních modelech, má tedy významný translační význam. Druhým měřitelným parametrem je měření funkční konektivity pomocí kvantitativního EEG. Schizofrenie je diskonekční syndrom, charakterizovaný relativně konzistentními nálezy v EEG (Boutros et al., 2008). Typicky je popisován nárůst pomalých aktivit v pásmu delta, naproti tomu pak deficit v pásmu gama (Begic et al., 2000a; Begic et al., 2000b; Gerez et al., 1995; Harris et al., 2006). Podobně je

jedním z charakteristických nálezů snížení koherence EEG signálu, a to zejména mezi frontálním a temporálním kortexem (Tauscher et al., 1998; Winterer et al., 2001; Brunovský et al., 2004). Snížení koherence je vnímáno jako snížení funkční konektivity mezi těmito oblastmi. Přestože nálezy u schizofrenie ve většině případů popisují zmíněné deficity, do dnešní doby nejsou *de facto* žádné komparabilní studie hodnotící tyto změny v serotoninovém modelu psychózy, a to ani u lidských dobrovolníků ani v animálních modelech.

Cílem této práce bylo v animálním modelu analyzovat vliv psilocinu a mezkalinu na EEG konektivitu mozku. Současně pro verifikaci těchto látek jako validního modelu psychózy jsme hodnotili deficit v senzomotorickém zpracování informací. V rámci co největší komparability našich dat s nálezy u schizofrenních pacientů jsme vyvinuli metodiku registrace EEG u potkana z 12 aktivních elektrod, přičemž do analýzy byl implementován i faktor chování zvířat. Chování zvířat bylo zaznamenáváno v průběhu celé registrace EEG, avšak následně k analýze záznamu byly použity pouze úseky odpovídající behaviorálnímu klidu/pasivitě. Tímto jsme se snažili fenomenologicky přiblížit klidovému záznamu, který patří mezi standardní způsob registrace u lidí.

### Metody

Experimenty byly prováděny na SPF (specific pathogen free) dospělých samčích potkanů kmene Wistar (Biotest Konárovice, Česká republika) o hmotnosti 200–250 g. Zvířata byla ustájena v plastových akváriích v klimatizovaném zvěřinci s regulovanou teplotou (20–22 stupňů Celsia) s pravidelným dvanáctihodinovým cyklem světlo/tma. Zvířata měla neomezený přístup k potravě a k vodě. Všechna zvířata byla experimentálně naivní a byla testována pouze jednou. Veškeré experimenty byly prováděny během světelné periody. Všechny experimenty byly schváleny odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. lékařské fakultě Univerzity Karlovy a Psychiatrickém centru Praha a byly provedeny v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání.

### Látky

Psilocin (THC-Pharm, čistota 98–99 %) v dávce 0,25, 1, a 4 mg/kg byl naředěn ve 0,9% roztoku NaCl. Hydrochlorid mezkalinu (Farmaceutická fakulta Univerzita Karlova) v dávce 10 mg/kg, 20 mg/kg a 100 mg/kg byl rozpuštěn v 0,9% NaCl. Obě dvě látky byly aplikovány subkutánně. Roztoky a/nebo vehikulum (0,9% NaCl) byly aplikovány v objemu 2 ml/kg živé váhy. Psilocin byl aplikován 15 minut a mezkalin 60 minut před začátkem PPI experimentů. V EEG experimentech byly látky aplikovány pouze v nejvyšších dávkách a po 10 minutách od začátku registrace EEG.

### Experimentální postupy

**Prepulzní inhibice (PPI) akustické úlekové reakce (ASR):** V každé skupině bylo od 11–14 jedinců. Úleková reakce a prepulzní inhibice byly měřeny pomocí systému SRLAB (San Diego Instruments, California, USA). Každý testovací box byl ventilovaný a rovnoměrně osvětlený a obsahoval průhledný válec s vnitřním průměrem 8,7 cm ležícím na piezoelektrickém akcelérátoru. Vysokofrekvenční reproduktor umístěný 24 cm nad podložkou produkoval kontinuální šum (white noise) pozadí o intenzitě 75 dB a ostatní akustické stimuly. Vlastní experiment začal 5minutovou aklimatizační periodou, následovanou 4 iniciačními úlekovými stimuly – samostatnými pulzy (125 Hz). Poté jsme použili následující intenzity stimulů

v pseudonáhodném pořadí: (1) samostatný pulz – 125 dB o trvání 20 ms, (2) prepulz-pulz 13dB nad intenzitou pozadí o trvání 20 ms, presentovaný 100 ms před začátkem 125dB pulzu samotného, (3) samotný prepulz – 13dB nad intenzitou pozadí o trvání 20 ms, a (4) žádný stimul. Každý akustický podnět se opakoval v průběhu měření pětkrát, průměrný interval mezi jednotlivými podněty byl 30 s. PPI ASR byla vyjádřena jako procentuální podíl  $[100 - (\text{průměrná ASR na prepulz pulz podněty} / \text{ASR na samostatné pulzy}) \times 100]$ . První 4 pulzy na začátku měření nebyly zahrnuty do výpočtu PPI. Dále zvířata s průměrnou velikostí ASR menší než 10 mikroV byla vyloučena z analýz jako non-respondéři.

**Statistika.** Pro statistické hodnocení dat jsme použili software Sigmatat v. 3.0. Použili jsme jednocestnou analýzu rozptylu (one-way ANOVA) s *post hoc* Newman-Keuls testem. Jako signifikantní byly brány rozdíly mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

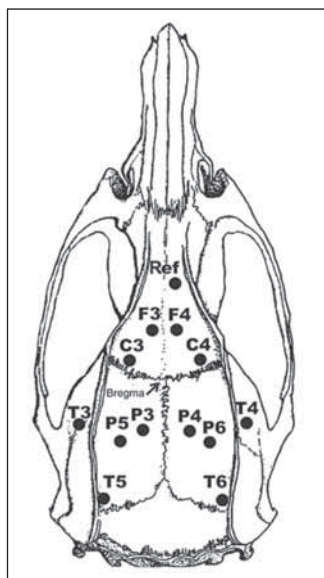
### Stereotaktická operace a natáčení EEG

**EEG operace.** 7 dní před vlastní registrací EEG záznamu bylo potkanům v celkové isofluranové anestézii stereotakticky implantováno 14 stříbrných elektrod. 12 aktivních elektrod bylo implantováno subdurálně nad homologními částmi obou hemisfér. Koordináty pro jednotlivé elektrody byly: 5 mm anteriorně a  $\pm 2$  mm laterálně od Bregmy (elektrody F3/F4) pro frontální asociační kortex, 2,2 mm anteriorně a  $\pm 3,2$  mm laterálně od Bregmy (elektrody C3/C4) pro primární motorickou kůru, 3,8 mm posteriorně a  $\pm 2,5$  mm laterálně od Bregmy (elektrody P3/P4); a  $\pm 4,5$  mm laterálně (elektrody P5/P6) pro oblasti parietální asociační kůry, 3,6 mm posteriorně a  $\pm 7,2$  mm laterálně od Bregmy (elektrody T3/T4) pro spánkový asociační kortex a -8,3 mm posteriorně a  $\pm 5,8$  mm laterálně od Bregmy (elektrody T5/T6) pro sekundární sluchovou kůru (obr. 1). Koordináty pro implantaci elektrod byly převzaty ze stereotaktického atlasu The Rat Brain – Fourth edition (Paxinos et al., 2003). Referenční elektroda (REF) byla implantována nad oblast čichového laloku a zemnicí elektroda (GND) byla umístěna subkutánně v okcipitální oblasti. Všechny elektrody byly ke kalvě připevněny pomocí zubního cementu Dentalon. Po operaci byla zvířata umístěna individuálně do plastových akvárií, kde setvala až do dne EEG registrace. Den před zahájením registrace byla potkanům v krátkodobé isofluranové anestézii přicementována redukce pro připojení k registračnímu setu.

**Registrace EEG.** EEG záznamy byly registrovány pomocí 21kanálového zesilovače BrainScope (Unimedis, Praha) mezi 9:00–14:00 h. Celková délka registrace jednoho EEG záznamu byla 100 minut. V průběhu prvních 10 minut byl registrován klidový záznam, po něm byla zvířatům subkutánně aplikována látka – buď psilocin (4 mg/kg) nebo mezkalin (100 mg/kg). Během registrace se potkani mohli po celou dobu volně pohybovat ve svých akváriích. Současně s registrací EEG bylo pomocí program Activities zaznamenáváno chování zvířat – aktivní (běhání, chození, čištění apod.) a pasivní (imobilita, čenichání bez pohybu celého těla, malé pohyby hlavou, malé pohyby bez pohybu končetin). Úseky odpovídající aplikaci látek byly značeny jako artefakt a následně vyřazeny z analýzy. Stejně tak byly vyřazeny z analýzy úseky, kde potkani usínali a/nebo byli buzení jemným dotykem. EEG záznam byl uložen na pevný disk připojeného počítače pro následné vyhodnocení.

**EEG analýza.** Pro analýzu dat bylo použito 10 jedinců z každé skupiny. V programu WaveFinder v. 2.6. (Unimedis, Prague, CZ) byl EEG záznam rozdělen na úseky odpovídající pasivnímu a aktivnímu chování dle předlohy z programu Activities®. Na záznam byl současně aplikován pásmový filtr a lineární FIR filtr (Finite Impulse





Obrázek 1: Pozice elektrod na povrchu kalvy potkana. (Převzato z Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4<sup>th</sup> ed. New York, Elsevier, Academic Press, 2003). Přesné umístění elektrod viz text.

Response – tzv. filtry s konečnou dobou odezvy, jsou vždy stabilní a mají lineární fázovou charakteristiku se 111 koeficienty v rozmezí 0,5–45 Hz. Následně byl signál odpovídající pasivním úsekům chování importován do softwaru Neuroguide v. 2.4.6. (c. 2002–2008 Applied Neuroscience Inc., St. Petersburg, FL, USA) přičemž během importu byla změněna vzorkovací frekvence z 250 Hz na 128 Hz. Pro vlastní analýzu byly vizuálně vybrány dva úseky EEG. První úsek představoval kontrolní EEG úsek před aplikací látek, druhý úsek byl vybrán ze záznamu po aplikaci látek. Z každé části byl následně vybrán 1–3sekundový charakteristický bezartefaktový úsek sloužící pro poloautomatický výběr dostatečně dlouhého reprezentativního EEG záznamu pro analýzy v softwaru Neuroguide. Kritéria k selekci EEG úseků byla: 1) délka vzorku delší než 30 sekund, 2) vizuální inspekce digitálního záznamu EEG, 3) splnění split-half reliability  $\geq 1,25$ , 4) splnění test-retest reliability větší než  $\geq 0,95$ . Výsledné vyselektované úseky se lišily od 41 do 143 s (průměr 76,09 s;  $\pm$  SEM 2,23 s).

Po rychlé Fourierově transformaci (Fast Fourier Transformation, FFT) byla z každého vyselektovaného úseku vypočítána spektra mezi 1 a 40 Hz s rozlišením 0,5 Hz. Autospektra jednotlivých elektrod a crosspektra vybraných elektrodoých párů byla vypočítána

v následujících frekvenčních pásmech: delta (1–4 Hz), theta (4–7 Hz), alfa (8–12 Hz), beta (12–25 Hz), vysoká beta (25–30 Hz) gamma (30–40 Hz). EEG koherence byly vypočítány pro 30 intrahemisferálních elektrodoých párů (F3–C3, F3–P3, F3–P5, F3–T3, F3–T5, C3–P3, C3–P5, C3–T3, C3–T5, P3–P5, P3–T3, P3–T5, P5–T3, P5–T5, T3–T5) na levé hemisféře a analogicky na pravé) a 6 interhemisferálních elektrodoých párů (F3–F4, C3–C4, P3–P4, P5–P6, T3–T4, T5–T6).

**Statistika.** Průměrný EEG výkon a koherence byly analyzovány pomocí párového T-testu. Každé zvíře zároveň sloužilo samo sobě jako kontrola data z klidového záznamu před aplikací látek versus data po aplikaci látek). Průměrný výkon byl vypočten z hodnot od každého jednotlivého zvířete exportovaných ze softwaru Neuroguide a následně analyzován v softwaru Sigmastat v. 3.0. Analýza EEG koherencí byla vypočtena přímo v programu Neuroguide.

## Výsledky

### Vliv na prepulzní inhibiční úlekové reakce

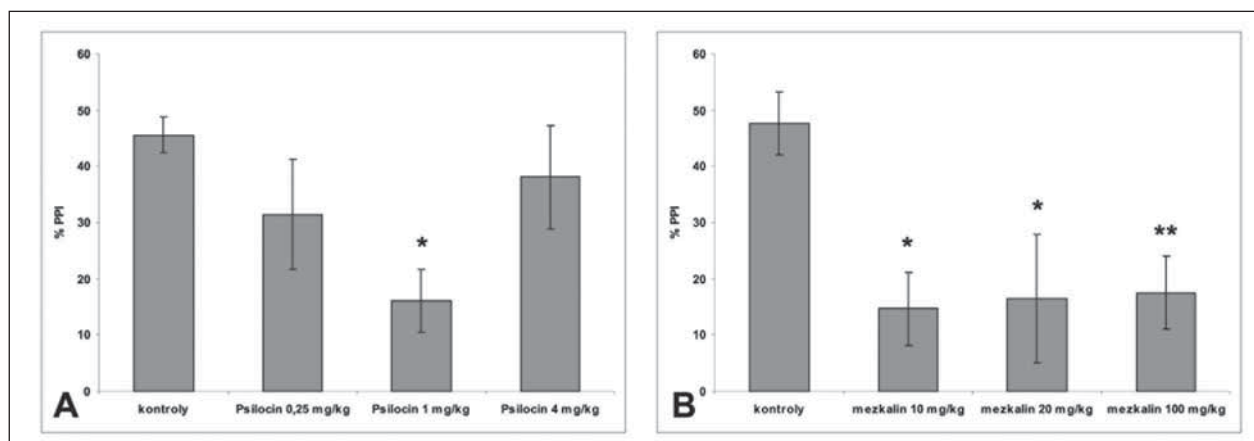
Jednocestná ANOVA prokázala signifikantní rozdíl mezi vehikulem a psilocinem ( $F(3,41) = 3,137$ ;  $p < 0,05$ ), z *post hoc* testů vyplynulo, že pouze psilocin 1 mg/kg ( $p < 0,05$ ) narušil PPI (obr. 2A). U mezkalinu byl také zjištěn signifikantní rozdíl vliv na PPI ( $F(3,51) = 4,198$ ,  $p < 0,01$ ). V *post hoc* testech všechny dávky mezkalinu tj. 10 mg/kg ( $p < 0,05$ ) 20 mg/kg ( $p < 0,05$ ), a 100 mg/kg ( $p < 0,05$ ) narušily PPI (obr. 2B).

### Vliv na EEG spektra a koherence

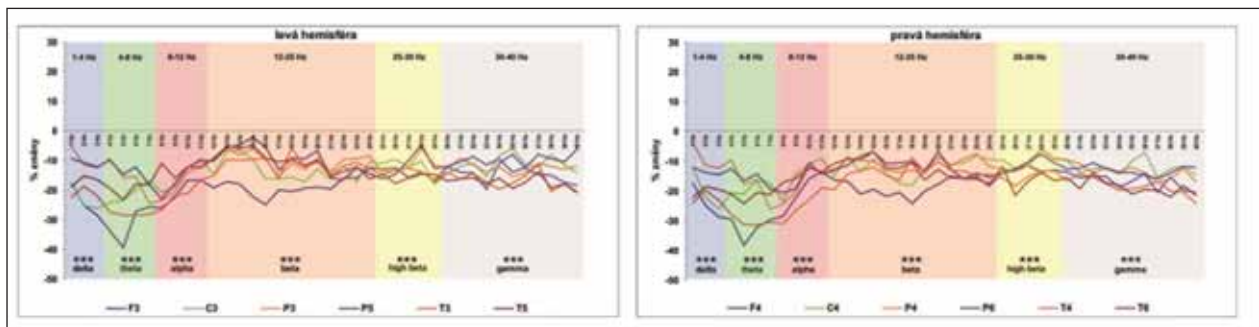
#### Vliv na absolutní výkonové spektrum

Obě látky významně snižovaly průměrný výkon téměř v celém frekvenčním rozsahu. Zatímco mezkalin 100 mg/kg indukoval nejvýraznější pokles výkonu v pásmu delta, u psilocinu 4 mg/kg byl nejvýznamnější pokles zaznamenán v pásmu theta. Oproti psilocinu pak na druhou stranu mezkalin neindukoval snížení výkonu v alfa pásmu (obr. 3, 4).

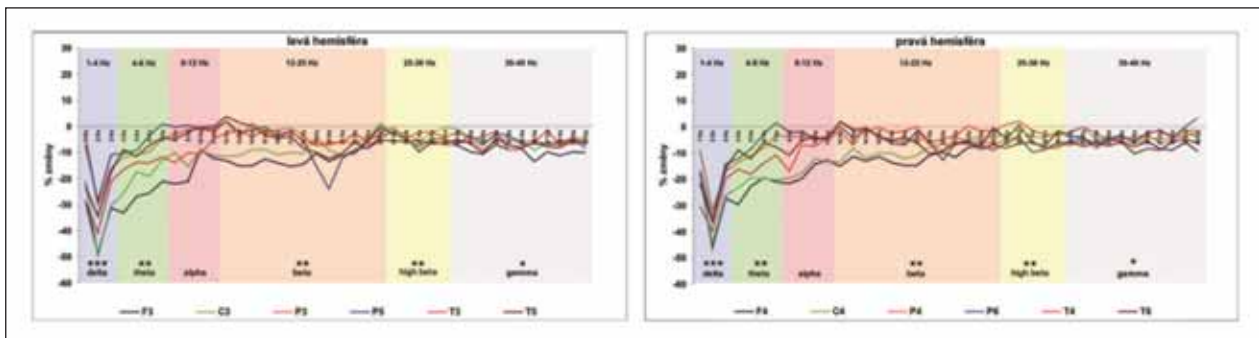
**Vliv na EEG koherence:** Aplikace psilocinu významně snížila koherence ve všech frekvenčních pásmech, a to jak intra- tak i interhemisferálně. Nejvíce byly tyto změny patrné v delta a theta pásmech. V ostatních pásmech byly změny méně výrazné a převažovalo snížení interhemisferálních koherencí (obr. 5A). Mezkalin indukoval velmi podobné snížení koherencí jako psilocin, v theta pásmu však byly změny méně výrazné. Mezkalin také navíc snižoval intrahemisferální koherence v pásmech beta a gama.



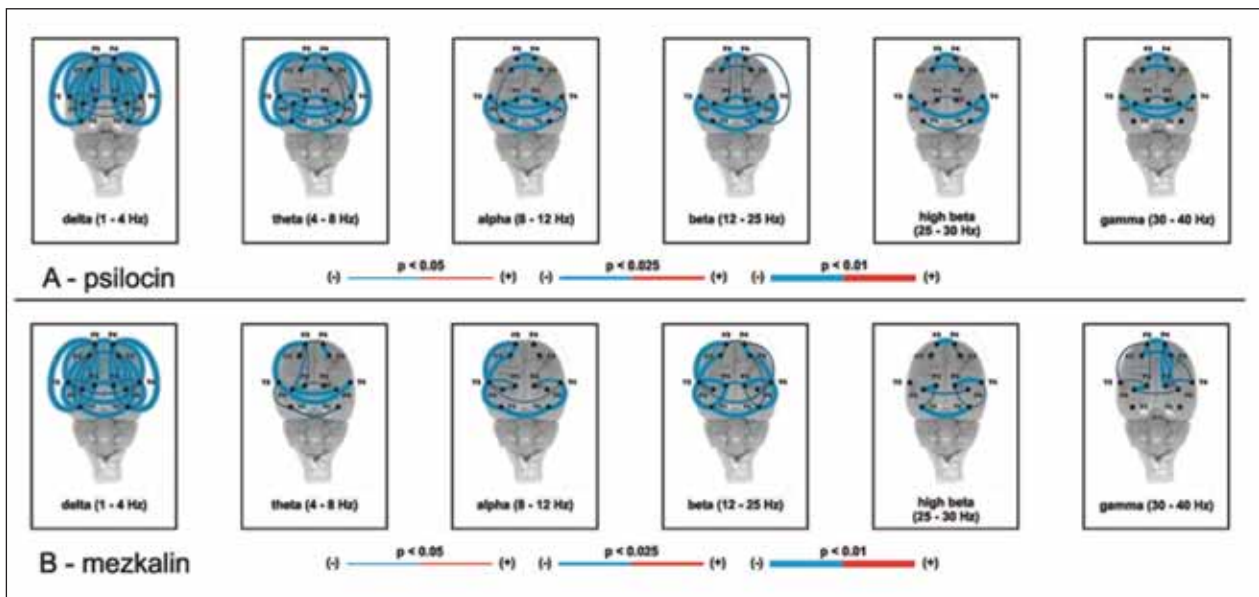
Obrázek 2: A) Vliv psilocinu na prepulzní inhibiční úlekové reakce (PPI) potkana. Pouze psilocin 1 mg/kg významně narušoval PPI (\*  $p < 0,05$ ); B) Vliv mezkalinu na prepulzní inhibiční úlekové reakce (PPI) potkana. Všechny tři dávky významně narušovaly PPI (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).



Obrázek 3: Výkonová spektra u psilocinu 4 mg/kg. Psilocin vedl k významnému poklesu výkonu v theta pásmu zejména fronto-parietálně.



Obrázek 4: EEG výkonového spektra u mezkalinu 100 mg/kg. Mezkalin vedl k významnému poklesu průměrného výkonu ve všech frekvencích pásmech kromě pásma alfa. Nejvýraznější změny byly zaznamenány v pásmu delta.



Obrázek 5: Signifikantní změny intra- a interhemisféralních koherencí po podání A) psilocinu 4 mg/kg a B) mezkalinu 100 mg/kg ve srovnání s klidovým záznamem (před aplikací látek). Modrá barva vyznačuje snížení koherencí, červená zvýšení koherencí. Statistickou významnost nalezených změn ( $p$ , párový T-test) určuje síla čáry dle znázornění ve spodní části obrázku.

### Diskuze

Z našich dat vyplývá, že oba zástupci psychedelík narušují senzomotorické zpracování informací. Z hlediska EEG jsme zaregistrovali významný pokles výkonu ve všech pásmech po psilocinu, nejvíce však v pásmu theta. Podobný trend byl i u mezkalinu, ten však indukoval nejvýraznější snížení výkonu v delta pásmu, naopak v alfa pásmu jsme žádné změny nepozorovali. Oba modely však analogicky snižovali EEG koherence, nejvíce byly změny patrné v delta pásmu, kde ke snížení došlo prakticky mezi všemi elektrodovými páry.

Narušení PPI po mezkalinu a psilocinu je kompatibilní se zjištěními v jiných pracích, kde obecně psychedelika narušují

senzomotorické zpracování informací (Palenicek et al., 2008; Vollenweider et al., 1998). Mechanismem účinku těchto změn je velmi pravděpodobně právě již zmíněný agonismus na 5-HT<sub>2A</sub> receptorech (Marek a Aghajanian 1996; Nichols et al., 2004). To potvrzují jak naše vlastní experimenty (Fujakova et al., 2011; Tyls et al., 2011; Palenicek et al., 2008), tak i jiné studie. Tento deficit je i analogický tomu, co je popisováno u schizofrenie, a můžeme tedy hovořit o behaviorální validitě námi použitého modelu. Srovnáním našich serotonergních modelů s modely dopaminergními a glutamatergními jsme nezjistili významnější rozdíly, všechny modely charakteristicky narušují senzomotorické zpracování informací (Sipes a Geyer, 1994; Vollenweider a Geyer, 2001; Palenicek et al., 2007a; Palenicek

et al., 2007b). Z hlediska rozdílu mezi psilocinem a mezkalinem se zdá, že mezkalin o něco výrazněji narušuje PPI. Je však možné, že vyšší dávky psilocinu nakonec také PPI naruší, nicméně s větším odstupem času od aplikace. Faktkem je, že mezkalin má za 60 min. od subkutánní aplikace nejvyšší hladiny v mozku, kdežto u psilocinu tyto informace k dispozici nemáme.

Srovnání našich EEG nálezu s jinými animálními daty je téměř nemožné, neboť obdobná data z jiných laboratoří neexistují. Naše nálezy s glutamatergními modely se stejným uspořádáním registrace a analýzy záznamu vykazují částečně odlišné výsledky (Palenicek et al., 2011). Na rozdíl od námi pozorovaného snížení výkonu ve všech pásmech, NMDA antagonisté ketamin a MK-801 indukují především zvýšení výkonu v pásmu gama (Palenicek et al., 2011). V případě MK-801 jsme dále pozorovali snížení v pásmu theta a beta (Tyls et al., 2011). NMDA antagonisté však podobně jako serotoninové modely snižovali EEG koherence. Je tedy zřejmé, že mezi účinky serotoninergních modelů a modelů glutamatergních jsou specifické rozdíly na úrovni spektrální analýzy, na druhou stranu z hlediska míry konektivity oba modely indukují podobné změny. Příčina těchto změn z hlediska farmakologického mechanismu účinku je v tuto chvíli bez použití selektivních ligandů blokujících účinky halucinogenů obtížně identifikovatelná. Na druhou stranu můžeme konstatovat, že příčina snížení EEG výkonu může být způsobena dvěma základními mechanismy. Na jedné straně může odrážet fakt, že je aktivní menší počet neuronů v kortexu, tedy jedná se o jakýsi útlum, zároveň však může být způsoben pouhou desynchronizací neuronů. Druhé variantě by nasvědčoval i fakt, že snížení koherence je *de facto* odrazem snížení funkční konektivity a odráží míru desynchronizace neuronů.

Díky registraci EEG z 12 kortikálních elektrod a následné analýze záznamu odpovídajícího behaviorálnímu klidu u zvířat, se můžeme pokusit srovnat naše data s humánními daty (klidový záznam). Srovnání našich výsledků s nálezy u nemocných schizofrenií vykazuje nápadnou podobnost ve snížení výkonu v gama pásmu (Williams et al., 2010). Gama oscilace se zdají být klíčové pro řadu kognitivních funkcí a jejich snížení u nemocných je asociováno s kognitivním deficitem (Gonzales-Burgos et al., 2010; Gandall et al., 2011). Analogicky i u schizofrenie nejčastěji popisované snížení frontotemporální konektivity, které je také asociováno s defektem kognitivních funkcí či deficitem ve zpracování informací opět koreluje se zjištěnými změnami indukovanými v našich modelech. Je tedy zřejmé, že námi vytvořené serotoninergní modely mají z hlediska kvantitativního EEG významnou podobnost s nálezy u nemocných schizofrenií. Závěrem se domníváme, že by tyto modely mohly mít do budoucna i významnou prediktivní validitu pro testování účinků antipsychotik.

*Tato práce byla podpořena Centrem neuropsychiatrických studií (projektem CNS MŠMT ČR 1M0517). Autoři byli dále podpořeni granty IGA MZČR NS-10374-3, IGA MZČR NS-10375-3 a MZ0PCP2005.*

MUDr. Tomáš Páleníček, Ph.D.  
Psychiatrické centrum Praha  
Ústavní 91  
181 03 Praha 8  
e-mail: palenicek@pcp.lf3.cuni.cz

## LITERATURA

- Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Mar;31(2-3):302-12.
- Alexander DM, Flynn GJ, Wong W, Whitford TJ, Harris AW, Galletly CA, Silverstein SM. Spatio-temporal EEG waves in first episode schizophrenia. *Clin Neurophysiol.* 2009 Sep;120(9):1667-82. Epub 2009 Jul 30.
- Begić D, Hotujac L, Jokić-Begić N. Quantitative EEG in 'positive' and 'negative' schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand.* 2000 Apr;101(4):307-11.
- Begić D, Hotujac L, Jokić-Begić N. Quantitative EEG in schizophrenic patients before and during pharmacotherapy. *Neuropsychobiology.* 2000;41(3):166-70.
- Boutros NN, Arfken C, Galderisi S, Warrick J, Pratt G, Iacono W. The status of spectral EEG abnormality as a diagnostic test for schizophrenia. *Schizophr Res.* 2008 Feb;99(1-3):225-37. Epub 2007 Dec 21.
- Fujakova M., Palenicek T., Tyls F., Kubesova A., Brunovsky M. The effect of phenylethylamine hallucinogens on quantitative electroencephalography and behavior in rats. *Behavioral Pharmacology, suppl. A,* 2011 Aug; vol 22, e-38.
- Gandal MJ, Edgar JC, Klook K, Siegel SJ. Gamma synchrony: Towards a translational biomarker for the treatment-resistant symptoms of schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2011 Feb 22. [Epub ahead of print].
- Gerez M, Tello A. Selected quantitative EEG (QEEG) and event-related potential (ERP) variables as discriminators for positive and negative schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1995 Jul 1;38(1):34-49.
- Gonzalez-Burgos G, Hashimoto T, Lewis DA. Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep.* 2010 Aug;12(4):335-44.
- Horacek J, Bubenikova-Valesova V, Kopecek M, Palenicek T, Dockery C, Mohr P, Höschl C. Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs.* 2006;20(5):389-409.
- Ludewig K, Geyer MA, Etzsenberger M, Vollenweider FX. Stability of the acoustic startle reflex, prepulse inhibition, and habituation in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2002 May 1;55(1-2):129-37.
- Marek GJ, Aghajanian GK. LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT<sub>2A</sub> receptors on interneurons in rat piriform cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Sep;278(3):1373-82.
- Nichols DE. Hallucinogens. *Pharmacol Ther.* 2004 Feb;101(2):131-81.
- Páleníček T a Horáček J. Neurobiologie účinků halucinogenů a disociativních anestetik. *Psychiatrie* 2008;12, (Suppl.3):33-45.
- Páleníček T, Fujáková M, Brunovský M, Balíková M, Horáček J, Gorman I, Tyls F, Tišlerová B, Šoš P, Bubeníková-Valešová V, Höschl C, Krajča V. Electroencephalographic spectral and coherence analysis of ketamine in rats: correlation with behavioral effects and pharmacokinetics. *Neuropsychobiology.* 2011;63(4):202-18. Epub 2011 Mar 22.
- Páleníček T, Balíková M, Bubeníková-Valesová V, Horáček J. Mescaline effects on rat behavior and its time profile in serum and brain tissue after a single subcutaneous dose. *Psychopharmacology (Berl).* 2008 Jan;196(1):51-62. Epub 2007 Oct 7.
- Páleníček T, Bubeníková-Valešová V, Horáček J. Srovnání amfetaminu, ketaminu, MK801, meksalínu, psilocinu, LSD a 2C-B v animálním modelu schizofrenie. *Psychiatrie* 2007a;11, (Suppl.2):61-62.
- Palenicek T, Bubenikova-Valesova V, Horacek J. The role of serotonin 5-HT<sub>2a/c</sub> receptors in the behavioral action of the synthetic drug 2C-B *World J. of Biol Psychiatry* 2007c;8 (Suppl. 1):205.
- Sipes TA, Geyer MA. Multiple serotonin receptor subtypes modulate prepulse inhibition of the startle response in rats. *Neuropharmacology.* 1994 Mar-Apr;33(3-4):441-8.
- Tauscher J, Fischer P, Neumeister A, Rappelsberger P, Kasper S. Low frontal electroencephalographic coherence in neuroleptic-free schizophrenic patients. *Biol Psychiatry.* 1998 Sep 15;44(6):438-47.
- Tyls F, Palenicek P., Fujakova M., Kubesova A., Brunovsky M., Horacek J., Krajca V. The effect of tryptamine hallucinogens on quantitative EEG and behavior in rats. *Behavioral Pharmacology, suppl. A,* 2011 Aug; vol 22, e-39.
- Vollenweider FX, Vollenweider-Scherpenhuyzen MF, Bähler A, Vogel H, Hell D. Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. *Neuroreport.* 1998 Dec 1;9(17):3897-902.
- Williams S, Boksa P. Gamma oscillations and schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci.* 2010 Mar;35(2):75-7.
- Winterer G, Egan MF, Rädler T, Hyde T, Coppola R, Weinberger DR. An association between reduced interhemispheric EEG coherence in the temporal lobe and genetic risk for schizophrenia. *Schizophr Res.* 2001 Apr 15;49(1-2):129-43.

# Behavioral, neurochemical and pharmaco-EEG profiles of the psychedelic drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in rats

Tomáš Páleníček · Michaela Fujáková · Martin Brunovský · Jiří Horáček · Ingmar Gorman · Marie Balíková · Lukáš Rambousek · Kamila Syslová · Petr Kačer · Petr Zach · Věra Bubeníková-Valešová · Filip Tylš · Anna Kubešová · Jana Puskarčíková · Cyril Höschl

Received: 22 June 2012 / Accepted: 25 June 2012  
© Springer-Verlag 2012

## Abstract

**Rationale and objectives** Behavioral, neurochemical and pharmaco-EEG profiles of a new synthetic drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in rats were examined.

**Materials and methods** Locomotor effects, prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle reaction (ASR), dopamine and

its metabolite levels in nucleus accumbens (NAc), EEG power spectra and coherence in freely moving rats were analysed. Amphetamine was used as a reference compound. **Results** 2C-B had a biphasic effect on locomotion with initial inhibitory followed by excitatory effect; amphetamine induced only hyperlocomotion. Both drugs induced deficits in the PPI; however they had opposite effects on ASR. 2C-B increased dopamine but decreased 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in the NAc. Low doses of 2C-B induced a decrease in EEG power spectra and coherence. On the contrary, high dose of 2C-B 50 mg/kg had a temporally biphasic effect with an initial decrease followed by an increase in EEG power; decrease as well as increase in EEG coherence was observed. Amphetamine mainly induced an increase in EEG power and coherence in theta and alpha bands. Increases in the theta and alpha power and coherence in 2C-B and amphetamine were temporally linked to an increase in locomotor activity and DA levels in NAc.

**Conclusions** 2C-B is a centrally active compound similar to other hallucinogens, entactogens and stimulants. Increased dopamine and decreased DOPAC in the NAc may reflect its psychotomimetic and addictive potential and monoaminoxidase inhibition. Alterations in brain functional connectivity reflected the behavioral and neurochemical changes produced by the drug; a correlation between EEG changes and locomotor behavior was observed.

**Keywords** 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) · Amphetamine · Serotonin · Dopamine · Nucleus accumbens · Behavior · Microdialysis · EEG power spectra · EEG coherence · Rats

T. Páleníček (✉) · M. Fujáková · M. Brunovský · J. Horáček · I. Gorman · V. Bubeníková-Valešová · F. Tylš · A. Kubešová · J. Puskarčíková · C. Höschl  
Prague Psychiatric Center,  
Ústavní 91,  
181 03 Bohnice, Prague 8, Czech Republic  
e-mail: palenicek@pcp.lf3.cuni.cz

M. Balíková  
Institute of Forensic Medicine and Toxicology,  
1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague,  
Ke Karlovu 2,  
121 08 Prague 2, Czech Republic

L. Rambousek · K. Syslová · P. Kačer  
Institute of Chemical Technology,  
Technická 5,  
160 00 Prague 6, Czech Republic

L. Rambousek  
Institute of Physiology,  
Academy of Sciences of the Czech Republic,  
Videňská 1083,  
140 00 Prague 4, Czech Republic

M. Fujáková · P. Zach · F. Tylš · A. Kubešová · J. Puskarčíková  
3rd Faculty of Medicine, Charles University in Prague,  
Ruská 87,  
100 00 Prague 10, Czech Republic

## Introduction

There are many new synthetic psychoactive phenylethylamines, tryptamines, piperazines and cathinones that have spread across the illicit market around the world over the last two decades e.g. (Bossong et al. 2005; de Boer et al. 2001; de Boer et al. 1999; EMCDDA 2004; Smolinske et al. 2005; Sumnall and Wooding 2009; Thorlacius et al. 2008). One of those, 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B, desmethyl-DOB or Nexus), is a phenylethylamine derivative with psychedelic/entactogenic\* effects in humans (Shulgin and Shulgin 1991; Shulgin and Carter 1975) and is representative for a group of so called “2Cs” (e.g. 4-iodo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-I), 2,5-dimethoxy-4-ethylphenethylamine (2C-E), 2,5-dimethoxy-4-propylphenethylamine (2C-P) etc.). The drug is abused under similar conditions as the recreational drug ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine, MDMA) (Caudevilla-Galligo et al. 2012; Cole et al. 2002; de Boer and Bosman 2004; EMCDDA 2004; Huang and Bai 2011). Recreational doses in humans vary in the range of 4–30 mg indicating its higher potency compared to MDMA. In spite of its popularity among recreational drug users, there is a substantial lack of evidence about its behavioral effects and mechanisms of action in scientific literature. Except the 35-year-old study in humans done by Shulgin and Carter (1975), there is only one behavioral study performed on chickens to date (Bronson et al. 1995). Despite its reported MDMA-like effects, there are no reports on its activity on monoamine neurotransmission, and the only existing binding studies suggest 2C-B acts as a partial agonist on serotonin 5-HT<sub>2A/C</sub> and 5-HT<sub>1A/B</sub> receptors, thus showing a pharmacological profile similar to psychedelics (Acuna-Castillo et al. 2002; Glennon et al. 1988; Lobos et al. 1992; Moya et al. 2007). Compared to its phenylisopropylamine hallucinogenic analog 4-bromo-2,5-dimethoxyamphetamine (DOB) it has a lower potency in stimulating 5-HT<sub>2A</sub> receptors and is comparable in stimulating 5-HT<sub>2C</sub> receptors (Moya et al. 2007). With respect to the above mentioned facts, the intention of our work was to globally characterize 2C-B's effects in rats. We concentrated on different modalities: behavior, dopamine neurotransmission and quantitative EEG. Amphetamine as a structurally related stimulant was also used in our experiments. It served as a comparative drug to differentiate empathogenic/entactogenic and/or hallucinogenic effects (activation of serotonin system) from any possible stimulant-like activity (dopaminergic activation).

In the behavioral part of our study, we focused on locomotor activity and sensorimotor gating. Both of these behavioral measures are typically affected by psychedelics as well as entactogens (Bubenikova et al. 2005; Krebs-Thomson et al. 1998; Palenicek et al. 2007; Palenicek et al. 2008; Palenicek et al. 2010) and enable to evaluate central stimulation and/or depression, habituation to a novel environment or exploratory behavior (Lát 1973; Wishaw et

al. 1999) and the ability of an individual to appropriately filter and react to the inputs from the environment (Koch 1999; Swerdlow et al. 2001). Since dopamine is a key neurotransmitter involved in stimulatory effects of drugs, in the regulation of sensorimotor gating and is related to addictive potential of drugs (Geyer et al. 2001; Lingford-Hughes and Nutt 2003; Roberts and Koob 1997), we subsequently performed microdialysis experiments in the nucleus accumbens (NAc). NAc is divided into two neurochemically and neuroanatomically distinct compartments, the medioventral part, the NAc “shell” (related to limbic amygdala and plays a role in emotional and motivational functions and in the addiction) and the laterodorsal part, the NAc “core” (part of the striatopallidal complex and is involved in somatomotor functions, e.g. locomotor activity, sensorimotor processing) (Deutch and Cameron 1992; Fiserova et al. 1999; Pontieri et al. 1995), therefore we have measured levels of DA and its metabolites in both compartments. 2C-B's reported mixed entactogenic/psychedelic properties lead us to a thesis that it would induce comparable changes to psychedelics and/or entactogens such as MDMA in all of these parameters.

The second objective of our work was to evaluate the effects of 2C-B on quantitative EEG (QEEG). Quantitative EEG analysis (EEG power spectral analysis, EEG coherence etc.) brings a new fundamental approach to describing the effects of psychoactive substances since they reflect functional connectivity of the brain (Shaw et al. 1978; Thatcher et al. 1986). To be able to analyse these parameters, we used an innovative technique of EEG recording from 12 active cortical electrodes simultaneously in rats. In comparison to most frequently used recordings from one or two electrodes, our technique is more translational to human recording conditions which provides important added value of these experiments. Another clear benefit is in the possibility to correlate behavioral effects of the drug with characteristic patterns in the EEG.

\* The term “entactogen” has been suggested as a name for drugs such as MDMA that do not have pure hallucinogenic or stimulant properties. It has a psychotherapeutic connotation of producing a touching within (Nichols 1986).

## Materials and methods

### Study design

With respect to previous findings with other psychedelic drugs having a biphasic behavioral action e.g. (Adams and Geyer 1982; Geyer et al. 1979; Palenicek et al. 2008) as well as the pharmacokinetics of the 2C-B (Rohanova et al. 2008),

we monitored behavioral parameters and EEG changes in two distinct temporal paradigms—during the onset of its action and during the period of the highest expected brain concentrations (maximal brain levels of 2C-B after subcutaneous (s.c.) administration are reached within 1–2 h (Rohanova et al. 2008); described below in more detail in section “**Drugs and chemicals**”). Additional behavioral and EEG experiments were also performed in animals treated with the comparative stimulant amphetamine. The doses of drugs that were used in the EEG and microdialysis experiments were selected according to their behavioral activity in the open field and in the PPI ASR test.

## Animals

All experiments were carried out on adult male Wistar rats (SPF animals; Hannover breed Konárovec, Czech Republic) weighing 200–250 g. Animals were housed in pairs in a 12-h light/dark regime (6 a.m. lights on, 6 p.m. lights off) with temperatures ranging from 22 °C to 24 °C and were provided with free access to a standard diet and water. The rats were given an acclimatization period of 7–10 days prior to the start of each experiment. During this period, the animals were weighed twice and handled four times. In the behavioral experiments, 9–11 animals were used in each experimental/treatment group; in the microdialysis study 7 animals per each compartment of NAc and in the EEG experiments 12 animals per group were introduced in the surgery. Each subject was tested only once. All testing (behavior, microdialysis and EEG recordings) was performed during the light phase of the cycle from 8 a.m. to 2 p.m. All experiments respected the Guidelines of the European Union (86/609/EU) and followed the instructions of the National Committee for the Care and Use of Laboratory Animals.

## Drugs and chemicals

4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine hydrochloride (2C-B.HCl, purity +98 %, hereinafter referred to as 2C-B, synthesized at the Pharmaceutical faculty of Hradec Králové, Charles University, Czech Republic) was dissolved in a physiological saline. The drug or a vehicle was administered subcutaneously (s.c.) in a volume of 2 ml/kg. For the behavioral experiments, 4 doses of 2C-B were used: 2.5, 10, 25 and 50 mg/kg; for the EEG recordings only intermediate and high doses, 10 and 50 mg/kg were used, while microdialysis was performed with 2C-B 25 mg/kg. All behavioral testing was evaluated in two separate temporal constellations with the beginning of testing at (a) 15 and (b) 60 min after 2C-B administration. For each of these temporal constellations, a new group of animals for each dose was used. Comparable design was used also for EEG analyses. D-

Amphetamine sulfate (1 and 4 mg/kg s.c. Sigma Aldrich) hereinafter referred to as amphetamine dissolved in saline was used as a comparative drug. In the behavioral experiments, the drug was administered 15 min before the start of each testing. In the EEG experiments, only the higher dose of 4 mg/kg was used.

## Behavioral experiments

### *Open field (EthoVision)*

Locomotor activity (trajectory length) and its spatial characteristic (thigmotaxis and time spent in the centre of the arena) in a novel environment were registered and analysed by an automatic video tracking system for recording behavioral activities (EthoVision Color Pro v. 3.1.1, Noldus, Netherlands). A square black plastic box arena (68×68×30 cm) was situated in a sound-proof and evenly-lit room. Eight of the treatment groups were placed into the centre of the arena 15 min after the drug administration (2C-B 2.5, 10, 25 and 50 mg/kg, amphetamine 1 and 4 mg/kg and corresponding vehicle groups). For the remaining groups of animals, the testing started 60 min after the drug administration (2C-B 2.5, 10, 25 and 50 mg/kg and corresponding vehicle group). The locomotor activity was registered for 30 min after drug administration. The EthoVision program was also used to calculate locomotor activity in 5-min time intervals. To evaluate the spatial characteristics of the movement in the open field, the arena was virtually divided by the EthoVision program into 5×5 identical square zones with 16 being located on the periphery and 9 centrally. Initially, the total number of appearances of the animal in each zone (frequency;  $f$ ) was calculated by the program. The thigmotaxis ( $i$ ) was calculated as  $i = f_{\text{peripheral zones}} / f_{\text{all zones}}$ . Thus, the thigmotaxis is a relative number which varies from 0 to 1 and indicates the probability of appearance in any of the peripheral zones within the arena. As a complementary measure, time spent in the centre of the arena ( $T_{\text{centre}}$ ) was analysed, equaling the summation of time spent in the 9 central zones ( $\sum t_{1-9}$ ; Palenicek et al. 2005). These measures may reflect alterations in exploratory behavior, be associated with anxiety and in some cases can also describe the stereotyped behavior (Lát 1973; Palenicek et al. 2005; Palenicek et al. 2007; Palenicek et al. 2008; Palenicek et al. 2010; Wishaw et al. 1999)

### *Sensorimotor gating*

Sensorimotor gating was measured in a test of prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle reaction (ASR). All of the rats were habituated to the testing apparatus in a short session (a 5-min acclimatization period plus five single pulses 2 days before the experiment). On the day of the

measurements, the same administration scheme was used as for the locomotor experiments. Rats were administered with 2C-B 2.5, 10, 25 and 50 mg/kg or saline (15 or 60 min before placement into the testing chamber) or amphetamine 1 and 4 mg/kg or saline (15 min before placement into the testing chamber). All testing was performed in two calibrated startle chambers (SR-LAB, San Diego Instruments, California, USA) which consist of a sound-proof, evenly-lit enclosure with a Plexiglas stabilimeter with an 8.7 cm inner diameter and a piezoelectric accelerometer. A high frequency loudspeaker mounted 24 cm above the Plexiglas cylinder inside the chamber produced both a background noise of 75 dB and all the acoustic stimuli. The experimental design was adopted from previous studies (Bubenikova et al. 2005; Palenicek et al. 2008; Palenicek et al. 2010). After the acclimatization period (5 min), the test began with the first session consisting of four initial startle stimuli (125 dB). It was followed by the second session which consisted of four different trial types presented in a pseudo-random order: (1) single pulse: 125 dB broadband burst, 20 ms duration; (2) prepulse–pulse: prepulse 13 dB above the background noise, 20 ms duration, presented 100 ms before the onset of the 125 dB pulse alone; (3) prepulse alone: 13 dB above the background noise, 20 ms duration; (4) no stimulus. Five presentations of each trial type were given with a floating interstimulus interval of about 30 s. The PPI was expressed as a percentage of PPI [ $100 - (\text{mean response for the prepulse–pulse trials} / \text{startle response for the single pulse trials}) \times 100$ ]. The four single pulse trials at the beginning of the first session were not included in the calculation of the PPI values. Animals with an average startle value lower than 10 manufacturer's arbitrary units were excluded from the calculation of the PPI and were marked as non-responders. The number of animals excluded from the analysis did not significantly differ among all treatment groups; a maximum of 2 animals in one treatment group (in most of the groups none or one animal) were excluded. The final number of animals used in the analysis after non-responders exclusion remained between 9 and 11 per group as stated above.

## Microdialysis

### *Surgery and dialysis*

Rats (280–330 g) were anaesthetized with a halothane anesthesia (Narcotan) before surgery. Each rat was placed in a stereotaxic apparatus (Stoelting Co., Illinois, USA) and a guide cannula (MAB 4.15.IC; Agn Tho's AB, Sweden) was implanted through a burr hole 2 mm above the NAc Core (A +1.2 mm, L  $\pm$ 2.0 mm, V –6.0 mm from bregma) and NAc Shell (A +2.0 mm, L  $\pm$ 1.2 mm, V –6.2 mm from bregma; Paxinos and Watson 2003). After surgery, the rats were placed separately in their cages and left 7 days for recovery prior to

the collection of dialysates. Dialysis probes (MAB 4.15.2.Cu; AgnTho's AB, Sweden; cuprophane 2 mm membrane; cut-off 6 kD) were placed into the NAc under a light halothane anesthesia. The probes were connected to a syringe pump (Univentor 864, AgnTho's AB) and perfused with artificial cerebro-spinal fluid with a flow rate of 2  $\mu$ l/min. After a 60-min wash-out period, the dialysates were collected at 20-min intervals in plastic vials containing 15  $\mu$ l of 0.1 M HCl to reduce decomposition of the analytes. Initially, three samples of dialysates were collected to establish baseline levels of dopamine and its metabolites. Subsequently, 2C-B 25 mg/kg s.c. was administered and collection of samples continued until 12 samples were gathered. Therefore, collection of microdialysates lasted for 5 h in total. The placement of microdialysis probes was verified using Nissl staining. After the microdialysis study, the rats were sacrificed by an overdose in halothane anesthesia and the brains were removed and stored in 10 % formaline. Determination of exact probe implantation in the brains was verified by examination of brain slices (coronal frozen sections of the brain at 40  $\mu$ m intervals) under a Zeiss AxioVision Imager Z1. The appropriate placement of the probe was estimated in comparison to the corresponding slices obtained by the atlas (Paxinos and Watson 2003). After the verification, a total of 4 rats were used for the determination of dopamine and its metabolites in the NAc Core and 5 in the NAc Shell. The rest had to be excluded due to inappropriate position of the probe or due to unsuccessful perfusion.

### *Determination of dopamine and its metabolites by liquid chromatography mass spectroscopy (LC–MS)*

Dopamine and its first phase metabolites homovanillic acid, 3-methoxytyramine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (HVA, 3-MT and DOPAC) were measured in microdialysis samples from nucleus accumbens by LC-MS analysis, described in detail elsewhere (Syslova et al. 2011). Briefly, a Varian ProStar high pressure liquid chromatography (HPLC) system was used, consisting of a dual pump ProStar 210, a degasser and a Varian 410 autosampler (Varian, USA) equipped with a Gemini C18 5  $\mu$ m 110Å 150 $\times$ 2 mm (Phenomenex, USA). The mobile phase (solvent A: aqueous solution of acetic acid (pH 2); solvent B: methanol) was used for a gradient elution at a flow rate of 150  $\mu$ l/min. The HPLC elution program was as follows: 5 % B (3 min)  $\rightarrow$  30 % B (linear increase in 2 min)  $\rightarrow$  30 % B (10 min)  $\rightarrow$  5 % B (linear decrease in 1 min)  $\rightarrow$  5 % B (4 min). The column temperature was maintained at 25 °C. The injection volume was 5  $\mu$ l.

The HPLC system was directly coupled to a Varian 1200L triple quadrupole mass spectrometer (Varian, USA) equipped with an electrospray ion source. The scan monitoring reactions (precursor ion  $\rightarrow$  fragment ion) used for the analyses and their collision induced dissociated (CID)

energy were as follows:  $m/z$  137  $\rightarrow$   $m/z$  120 (CID=-17.5 eV) for DA;  $m/z$  141  $\rightarrow$   $m/z$  123 (CID=-17.5 eV) for DA-d4;  $m/z$  181  $\rightarrow$   $m/z$  122 (CID=17.0 eV) for HVA;  $m/z$  168  $\rightarrow$   $m/z$  151 (CID=-11.5 eV) for 3-MT and  $m/z$  167  $\rightarrow$   $m/z$  122 (CID=8.5 eV) for DOPAC. Data were acquired and evaluated using ProStar version 6.91 (Varian, USA).

## EEG experiments

### *Stereotactic surgery*

The rats were stereotactically implanted with 14 silver electrodes under halothane anesthesia 7 days before EEG recording. Twelve active electrodes were implanted on the surface of the cortex in homologous areas of the frontal, parietal and temporal regions of the right and left hemispheres. Stereotactic coordinates from bregma (Paxinos and Watson 2003) were: A +5 mm and L  $\pm$ 2 mm for the frontal association cortex (electrodes F3/F4), A +2.2 mm and L  $\pm$ 3.2 mm for the primary motor cortex (electrodes C3/C4), A -3.8 mm and L  $\pm$ 2.5 mm (electrodes P3/P4) and A -4.5 mm and L  $\pm$ 4.5 mm (electrodes P5/P6) for the medial and lateral parietal association cortex, A -3.6 mm and L  $\pm$ 7.2 mm for the temporal association cortex (electrodes T3/T4) and A -8.3 mm and L  $\pm$ 5.8 mm for the secondary auditory cortex (electrodes T5/T6). The reference electrode was implanted above the olfactory bulb and the ground electrode subcutaneously in the occipital region. All electrodes were fixed to the skull with Dentalon dental cement. After the operation, the animals were individually placed in plastic cages, where they remained until the EEG recording. The day before EEG recording, a connector was mounted to the electrodes under short-term total halothane anesthesia and again fixed with dental cement.

### *EEG recordings*

Approximately 15 min before administration of the compound, the animals were deprived of food and water and connected to the EEG system in their home cages. A 10-min recording session was obtained immediately before treatment to serve as a baseline condition. Subsequently, 2C-B 10 or 50 mg/kg, amphetamine 4 mg/kg or saline were administered subcutaneously and registration continued for another 65 min in the case of 2C-B and vehicle treatments (total length of record, 75 min) and for 35 min in the case of amphetamine (total length of record, 45 min). The rats were able to move freely in the cage during all EEG recording while being connected with a cable to a data acquisition system. Raw EEG signals were recorded using the BrainScope (Unimedis, Prague) data acquisition system with an EADS-221 amplifier having a frequency band of 0.15–70 Hz. The system acquired the data with a 16-bit depth, 7.63 nV/bit resolution (i.e.  $\sim$ 130 bit/ $\mu$ V) and a dynamic

range of  $\pm$ 500  $\mu$ V. The data were recorded using a sampling rate of 250 Hz. EEG data were stored on a PC hard disk for offline processing and analysis. Each rat was recorded only once with the specific treatment. Animals were handled for a few seconds by an observer when a suspicion of sleep was present (i.e., animals did not move and tended to close their eyes). Concomitantly, a mark in the EEG trace was placed to label this epoch, which was then excluded from the analysis. However, this happened only in the vehicle treated animals.

### *EEG signal processing*

From the 12 operated animals, 10 animals for 2C-B 10 mg/kg and 9 animals for 50 mg/kg, 10 animals for amphetamine 4 mg/kg, and 9 saline animals were included for signal analysis, the others were excluded because of technical difficulties during recording and/or insufficient data quality. The EEG data was bandpass filtered with a linear FIR (Finite Impulse Response) filter with 111 coefficients in the range of 0.5–45 Hz. For a detailed description of FIR filters, see Principe and Smith (1986). For each EEG recording session the following EEG segments (10 min in duration) were edited for further processing: the first EEG segment was selected from the baseline EEG record (0–10 min for all groups), the second set of data was taken between 15–25 (for vehicle and 2C-B treatments) and 10–20 min (for amphetamine treatment), the third was taken between 25–35 min (for vehicle and amphetamine treatments) and the last was taken 55–65 min (for vehicle and 2C-B treatments) after the administration of the substance. Each 10-min EEG segment was subjected to editing procedures using Neuroguide software (Neuroguide© NG-2.4.6, Applied Neuroscience Inc., St. Petersburg, FL) in which a 1- to 2-s template of “clean”, artifact-free EEG was selected. This template was then used to compute matching amplitudes of EEG using flexible criteria of equal amplitudes to amplitudes that are  $\leq$ 1.25 times larger. The decision as to which clean EEG sample multiplier is used was determined by the length of the sample 50 s as a minimum, visual inspection of the digital EEG and when split-half reliability and test re-test reliability measurements were  $\geq$ 0.95. Split-half reliability is the ratio of variance between the odd and even seconds of the time series of selected digital EEG while test re-test reliability is the ratio of variance between the first half vs. the second half of the selected EEG segments (variance=sum of the square of the deviation of each time point from the mean of the time points). Test re-test reliability  $>$ 0.90 is commonly accepted in scientific literature. For a detailed description of editing procedures see Thatcher et al. (1987; 2003). After multiple visual inspections and selection of clean EEG samples, the edited samples varied in length from 52 to 140 s (mean 69.57 s; s.d. 17.81 s) for the 2C-B group, from 53 to 142 s (mean 75.6 s; s.d. 22.77 s) for the amphetamine group and from 53 to 119 s (mean 71.92 s; s.d. 16.2 s) for the vehicle



group. There was no significant difference across groups in the length of edited data (one-way RM ANOVA for each treatment group;  $F_{(2,16)}=2.56$ ,  $p=0.11$  for 2C-B 10 mg/kg,  $F_{(2,14)}=1.66$ ,  $p=0.23$  for 2C-B 50 mg/kg,  $F_{(2,18)}=0.94$ ,  $p=0.41$  for amphetamine 4 mg/kg and  $F_{(4,36)}=2.497$ ,  $p=0.06$  for vehicle).

The spectral content of the EEG was quantified by Fast-Fourier Transform (FFT) analysis. The EEG was automatically downsampled by Neuroguide software to 128 Hz, and spectra between 0.5 and 40 Hz were calculated at a 0.5-Hz resolution for each 2-s epoch. The auto-spectra of individual electrodes and cross-spectra of selected electrode pairs were obtained for the following frequency bands: delta (1–4 Hz), theta (4–7 Hz), alpha (8–12 Hz), beta (12–25 Hz), high beta (25–30 Hz) and gamma (30–40 Hz).

EEG coherence is defined as the cross-power spectrum per explicit frequency of two electrode positions recorded simultaneously at different sites. This method enables us to evaluate a resemblance of EEG activity between two cortical regions interpreted as an indication of their functional interaction and/or connectivity. EEG coherence was derived from auto-spectral and cross-spectral values for 30 intrahemispheric electrode pairs (F3-C3, F3-P3, F3-P5, F3-T3, F3-T5, C3-P3, C3-P5, C3-T3, C3-T5, P3-P5, P3-T3, P3-T5, P5-T3, P5-T5, T3-T5 on the left hemisphere and analogically on the right) and 6 inter-hemispheric electrode pairs (between electrodes F3-F4, C3-C4, P3-P4, P5-P6, T3-T4, T5-T6).

## Statistical analysis

### *Behavioral and microdialysis experiments*

Statistical analysis of total locomotion and PPI ASR was conducted by two-way analysis of variance (ANOVA) with 2C-B treatment and time after administration as factors. In the case of locomotion in 5-min intervals, a two-way repeated measures analysis of variance (RM ANOVA) with treatment as the between-subjects factor and time interval as a repeated measures factor were performed (for 15 and 60 min after administration separately). One-way ANOVA was used for analysis of amphetamine induced behavioral changes. All analyses were followed by Newman–Keuls post hoc tests and were performed using the program SigmaStat v. 3.0; the differences between groups with  $p<0.05$  and lower were considered significant.

Due to an insufficient number of animals for each part of NAc for the performing two-way analysis and due to the comparable effects in each of them, the microdialysis data were pooled and analysed together. Analysis of levels of dopamine and its metabolites in microdialysates was then performed with Friedman's repeated measures ANOVA for ranks with a subsequent Wilcoxon matched pairs test as the post hoc tests with the time of sample collection as a

repeated measure variable. The analysis was performed using the Statistica v. 9.0 program; differences between groups with  $p<0.05$  and lower were considered significant.

### *EEG experiments*

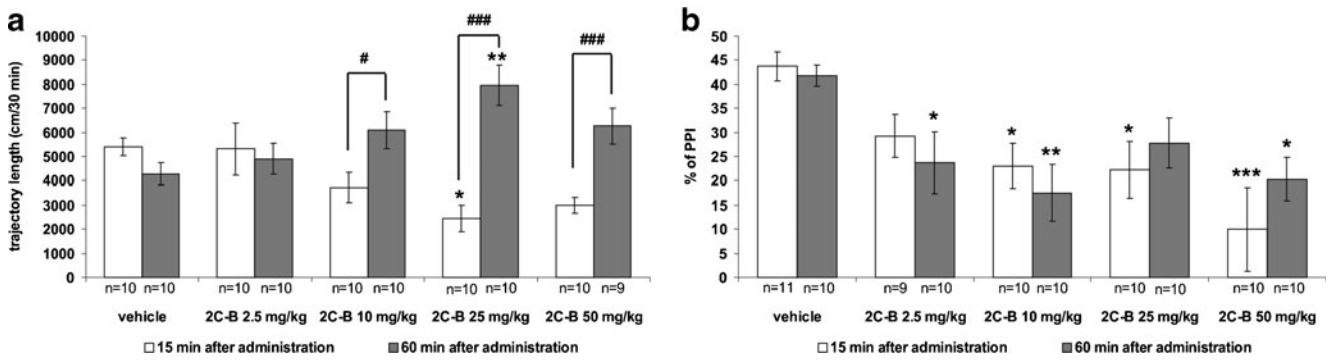
EEG data were analysed by Neuroguide software v. 2.4.6. (© 2002–2008 Applied Neuroscience, Inc.). In all EEG experiments each animal served as a self control (baseline data (first 10 min before administration) were compared to data 10–20, 15–25, 25–35 or 55–65 min after administration). The power spectral analysis for each spectral band was calculated using a one-way RM ANOVA with post hoc Newman–Keuls test. The mean power was calculated from individual values of single electrodes from each animal exported from the Neuroguide software and further statistical analysis was done by Sigmastat v. 3.0. EEG coherence statistical analysis was done by Neuroguide software (Neurostat module) using a paired *t* test. Neuroguide calculated the coherence analysis for 65 pairs of electrodes (we are presenting data only for all intrahemispheric and homologous interhemispheric pairs). The difference between groups with  $p<0.05$  was considered significant. Subsequently Familywise Error (FWE) with Bonferroni correction was used to correct for multiple (65) comparisons in leading to a level of significance  $p<0.015$ . Corrected results are displayed in the corresponding figures.

## Results

### Behavioral experiments—effects of 2C-B

#### *Locomotion*

Two-way ANOVA was conducted on total locomotion (Fig. 1a) and revealed that there was a significant interaction between the factor treatment  $\times$  time after administration ( $F_{(4,89)}=8.15$ ,  $p<0.001$ ). Time after administration ( $F_{(1,89)}=20.24$ ,  $p<0.001$ ) had a significant effect but treatment ( $F_{(4,89)}=0.23$ ,  $p=0.92$ ) on the other hand did not. Post hoc analysis showed that when the drug was administered 15 min before testing, 2C-B 25 mg/kg decreased total locomotion ( $p<0.05$ ) and there was also a trend for 2C-B 50 mg/kg ( $p=0.06$ ) while other doses did not differ significantly from the vehicle group. On the contrary, administration of the drug 60 min before testing induced an increase in locomotion after 2C-B 25 mg/kg ( $p<0.01$ ), other doses did not differ from the corresponding vehicle. Comparison between the two designs revealed significantly longer trajectory of animals after 2C-B 10, 25 and 50 mg/kg at 60 min after drug administration than at 15 min ( $p<0.05$ – $p<0.001$ ).



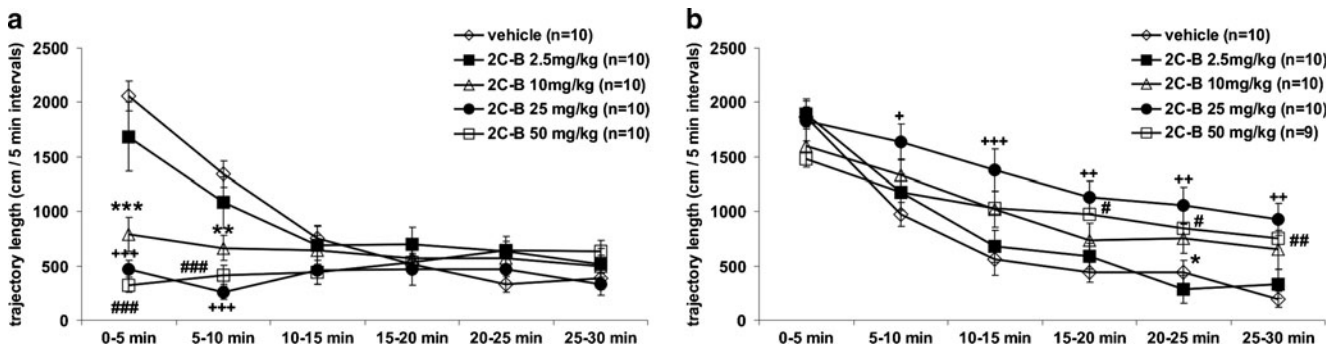
**Fig. 1** Effect of 2C-B on total locomotion (**a**) and on prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle reaction (ASR; **b**). **a** Total distance travelled was significantly decreased by 2C-B treatment when administered 15 min before the start of measurement; on the contrary, an increase in locomotion was observed when the drug was administered 60 min before measurement. Further, there was a significant difference

between 2C-B 25 and 50 mg/kg between the two timings. **b** Prepulse inhibition was disrupted by 2C-B treatment in both timings. This effect was more obvious when 2C-B was administered 15 min before the start of measurement. All data are presented as mean±SEM. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$  from the respective vehicle (control) group; # $p<0.05$  and ### $p<0.001$  between the two timings

Detailed analysis of 5-min intervals in animals administered 15 min before the experiment (two-way RM ANOVA; Fig. 2a) showed significant interaction of the factors treatment×time interval ( $F_{(20,225)}=14.13$ ,  $p<0.001$ ) along with significant treatment effect ( $F_{(4,225)}=4.26$ ,  $p<0.01$ ) and time interval effect ( $F_{(5,225)}=30.32$ ,  $p<0.001$ ). Post hoc tests for time effects showed that in vehicle and 2C-B 2.5 mg/kg treated animals the locomotion was shorter in all subsequent intervals compared to the first interval (0–5 min;  $p<0.001$  for all intervals) and similarly in the second interval (5–10 min;  $p<0.01$ – $p<0.001$ ). In vehicle treated animals, the same was observed for the third interval (10–15 min) compared to the fourth (20–25 min) and fifth (25–30 min) interval ( $p<0.01$ ). For all other doses of 2C-B (10, 25 and 50 mg/kg) locomotion was almost constant in all time intervals showing no significant differences between intervals. Post hoc tests for treatment effects showed that

during the first two intervals 2C-B 10, 25 and 50 mg/kg significantly shortened trajectory compared to the vehicle group ( $p<0.01$ – $p<0.001$ ).

In groups treated 60 min before the measurement, (Fig. 2b) two-way RM ANOVA again revealed interaction of the factors treatment×time interval ( $F_{(20,220)}=3.54$ ,  $p<0.001$ ) and significant effects of treatment ( $F_{(4,220)}=4.14$ ,  $p<0.01$ ) and time interval ( $F_{(5,220)}=103.07$ ,  $p<0.001$ ). Subsequent post hoc tests for time effects revealed that the locomotor effects in the vehicle and 2C-B 2.5 mg/kg treated animals were comparable to the previous ones. In both groups, locomotion continuously decreased during the second and third interval ( $p<0.05$ – $p<0.001$  for interval comparisons). On the contrary to administration 15 min prior to testing, all other doses of 2C-B showed a similar, though less pronounced, decrease in locomotion during the testing period as controls or 2C-B 2.5 mg/kg ( $p<0.05$ – $p<$



**Fig. 2** The effect of 2C-B on locomotion in 5-min intervals. **a** Administration of 2C-B 15 min before the start of the measurement—2C-B 10, 25 and 50 mg/kg induced hypolocomotion during the first two intervals. **b** Administration of 2C-B 60 min before the start of the measurement—2C-B 10, 25 and 50 mg/kg induced hyperlocomotion during the second part of

the measurement. All data are presented as mean±SEM. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  and \*\*\* $p<0.001$  from the vehicle (control) group for 2C-B 10 mg/kg; + $p<0.05$ , ++ $p<0.01$  and +++ $p<0.001$  from the vehicle (control) group for 2C-B 25 mg/kg; # $p<0.05$ , ### $p<0.01$  and #### $p<0.001$  from the vehicle (control) group for 2C-B 50 mg/kg

0.001 when compared to the first two intervals). Post hoc tests for treatment effects showed that from the third interval (10–15 min) until the end of measurement animals treated with 2C-B 10, 25 and 50 mg/kg had longer total locomotion compared to the vehicle group while during the first two intervals the locomotion was not significantly affected.

#### *Thigmotaxis (i) and time spent in the centre of the arena ( $T_{centre}$ )*

Two-way ANOVA of thigmotaxis revealed no significant effects of treatment ( $F_{(4,89)}=0.99$ ,  $p=0.42$ ), time ( $F_{(1,89)}=2.27$ ,  $p=0.14$ ) or interaction ( $F_{(4,89)}=1.42$ ,  $p=0.23$ ). However, two-way ANOVA for time spent in the centre showed an interaction between factors treatment $\times$ time after administration ( $F_{(4,89)}=3.36$ ,  $p<0.05$ ) and an effect of treatment ( $F_{(4,89)}=3.88$ ,  $p<0.01$ ) but not of time ( $F_{(1,89)}=2.17$ ,  $p=0.14$ ). Post hoc tests revealed that 2C-B 50 mg/kg administered 15 min before testing increased time spent in the centre of the arena (68.8 s in vehicle versus 282.4 s in 2C-B 50 mg/kg,  $p<0.001$ ). This was also apparent when compared to the same treatment administered 60 min before testing (77.82 s versus 282.4 s,  $p<0.001$ ). No change was observed when comparing the effects of 2C-B administered 60 min before testing versus the vehicle.

#### *Acoustic startle reaction (ASR) and prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle reaction (Table 1 and Fig. 1b)*

Two-way ANOVA of ASR (Table 1) revealed significant effect of treatment ( $F_{(4,90)}=6.22$ ,  $p<0.001$ ) and of time after administration ( $F_{(1,90)}=11.14$ ,  $p<0.001$ ) but no interaction of factors ( $F_{(1,90)}=0.77$ ,  $p=0.55$ ). Post hoc tests showed that 2C-B administration significantly decreased ASR of animals tested 15 min as well as 60 min after drug administration ( $p<0.05$ – $p<0.01$  except 2C-B 50 mg/kg tested 60 min after administration). The effect was more pronounced at 15 min.

Two-way ANOVA for the effect on PPI (Fig. 1b) showed a significant effect of treatment ( $F_{(4,90)}=7.86$ ,  $p<0.001$ ), but none for time after administration ( $F_{(1,90)}=0.027$ ,  $p=0.87$ )

or interaction ( $F_{(4,90)}=0.87$ ,  $p=0.48$ ). Post hoc analysis revealed that in animals administered 15 min prior to testing 2C-B 10, 25 and 50 mg/kg significantly differed from the vehicle ( $p<0.05$ – $p<0.001$ ). In animals treated 60 min prior to testing 2C-B 2.5, 10 and 50 mg/kg differed significantly from the vehicle ( $p<0.05$ – $p<0.01$ ), while in 2C-B 25 mg/kg we observed only a trend to disrupt PPI ( $p=0.06$ ).

#### Behavioral experiments—effects of amphetamine

##### *Locomotion*

One-way ANOVA analysis of amphetamine locomotor effects (Fig. 3a) showed significant treatment effects ( $F_{(2,28)}=8.72$ ,  $p<0.001$ ; Fig. 3a). Both doses of amphetamine (1 and 4 mg/kg) significantly increased locomotion when compared to the control group ( $p<0.01$ – $p<0.001$ ) as was shown by post hoc tests.

##### *Acoustic startle reaction (ASR) and prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle reaction*

One-way ANOVA revealed that amphetamine significantly increased ASR ( $F_{(2,27)}=4.75$ ,  $p<0.05$ ) with only amphetamine 4 mg/kg being significant ( $p<0.05$ ; Table 2). The PPI was also attenuated by amphetamine ( $F_{(2,27)}=3.94$ ,  $p<0.05$ ). Again only amphetamine 4 mg/kg disrupted PPI ( $p<0.05$ ; Fig. 3b).

##### Levels of dopamine and its metabolites in microdialysates

Friedman's RM ANOVAs on ranks showed the significant effect of 2C-B treatment for dopamine and all metabolites ( $\chi^2=99.3$  (dopamine), 108.8 (DOPAC), 65.5 (HVA), 113.6 (3-MT),  $df=14$ ,  $p<0.001$  for all monoamines; Fig. 4a–d).

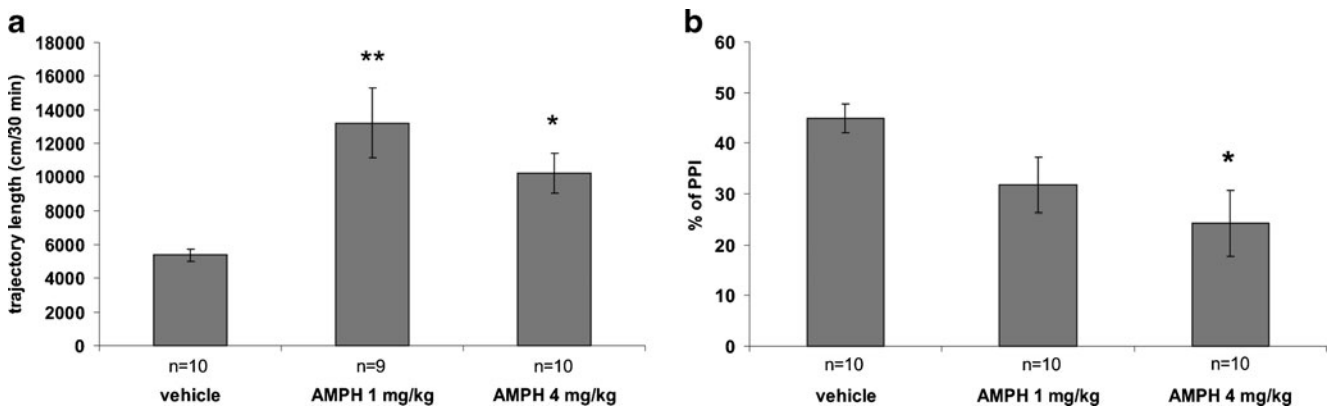
2C-B 25 mg/kg significantly increased dopamine levels in both compartments of NAc (up to 4.5 $\times$  more than the baseline,  $p<0.05$ – $0.001$ ). The increase in dopamine dialysate levels persisted 120 min after drug administration. A similar pattern of changes was observed for its metabolites HVA (up to 6 $\times$  more than the baseline,  $p<0.05$ – $0.001$ ) and 3-MT (up to 7 $\times$  more than the baseline,  $p<0.05$ – $0.001$ ). On

**Table 1** The effect of 2C-B on acoustic startle reaction (ASR)

	Time of administration	Vehicle	2C-B dose			
			2.5 mg/kg	10 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
Mean of startle amplitude (manufacturer's arbitrary units $\pm$ SEM)	15 min	84.80 ( $\pm$ 7.67)	53.78 ( $\pm$ 8.11)*	37.48 ( $\pm$ 7.92)**	44.4 ( $\pm$ 8.47)*	35.54 ( $\pm$ 5.25)**
	60 min	103.62 ( $\pm$ 22.51)	58.92 ( $\pm$ 8.49)*	60.86 ( $\pm$ 6.33)*	65.8 ( $\pm$ 7.67)*	77.2 ( $\pm$ 11.32)

2C-B significantly decreased ASR in both experimental settings

\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$  from the vehicle (control) group



**Fig. 3** The effect of amphetamine (AMPH) on total locomotion and on prepulse inhibition (PPI) of acoustic startle reaction (ASR). **a** Amphetamine significantly increased locomotion in both doses. **b**

PPI was significantly disrupted by amphetamine 4 mg/kg. All data are presented as mean±SEM. \* $p<0.05$  and \*\*\* $p<0.001$  from the vehicle (control) group

the contrary, DOPAC decreased to 38 % (in the Core) and 25 % (in the Shell) of the baseline levels.

#### EEG experiments—effect on EEG absolute power spectra

##### Effect of 2C-B on absolute EEG power spectra

One-way RM ANOVAs revealed that 2C-B 10 mg/kg had a significant effect on the mean power in beta ( $F_{(2,16)}=4.96$ ,  $p<0.05$ ), high beta ( $F_{(2,16)}=9.63$ ,  $p<0.01$ ) and gamma ( $F_{(2,16)}=16.81$ ,  $p<0.001$ ) bands (Fig. 5a, b). Post hoc tests showed that 2C-B 10 mg/kg significantly decreased the mean power down to 88 %, 77 % and 74 % of the baseline within the beta, high beta and gamma bands, respectively ( $p<0.05$ – $p<0.001$ ). The effect was present during the initial phase of the drug's action (15–25 min after administration) as well as during the later stage (55–65 min after administration). The decrease was present above almost all electrodes on both hemispheres. There was also a slight insignificant increase of the power within the delta band at 55–65 min (Fig. 5a).

In 2C-B 50 mg/kg treated animals, one-way RM ANOVAs showed an effect of treatment in the theta ( $F_{(2,14)}=4.44$ ,  $p<0.05$ ), beta ( $F_{(2,14)}=6.24$ ,  $p<0.05$ ), high beta ( $F_{(2,14)}=6.74$ ,  $p<0.01$ ) and gamma ( $F_{(2,14)}=4.97$ ,  $p<0.05$ ) bands. Post hoc tests revealed that it significantly decreased the mean power during the initial phase of the drug's action (15–25 min after administration) down to 76.3 % of the baseline within the beta,

high beta and gamma bands ( $p<0.05$ – $p<0.01$  for each). During the later stage (55–65 min after administration), there was only a significant decrease in the high beta band ( $p<0.05$ ); though in the present, the decrease in beta and gamma bands was insignificant. On the other hand, there was a significant increase of the power within the theta band (135 % of the baseline,  $p<0.05$ ) and an insignificant increase in the delta band (125 % of the baseline). The decrease and/or increase were present almost above all electrodes in both hemispheres (Fig. 5b).

##### Effect of amphetamine on absolute EEG power spectra

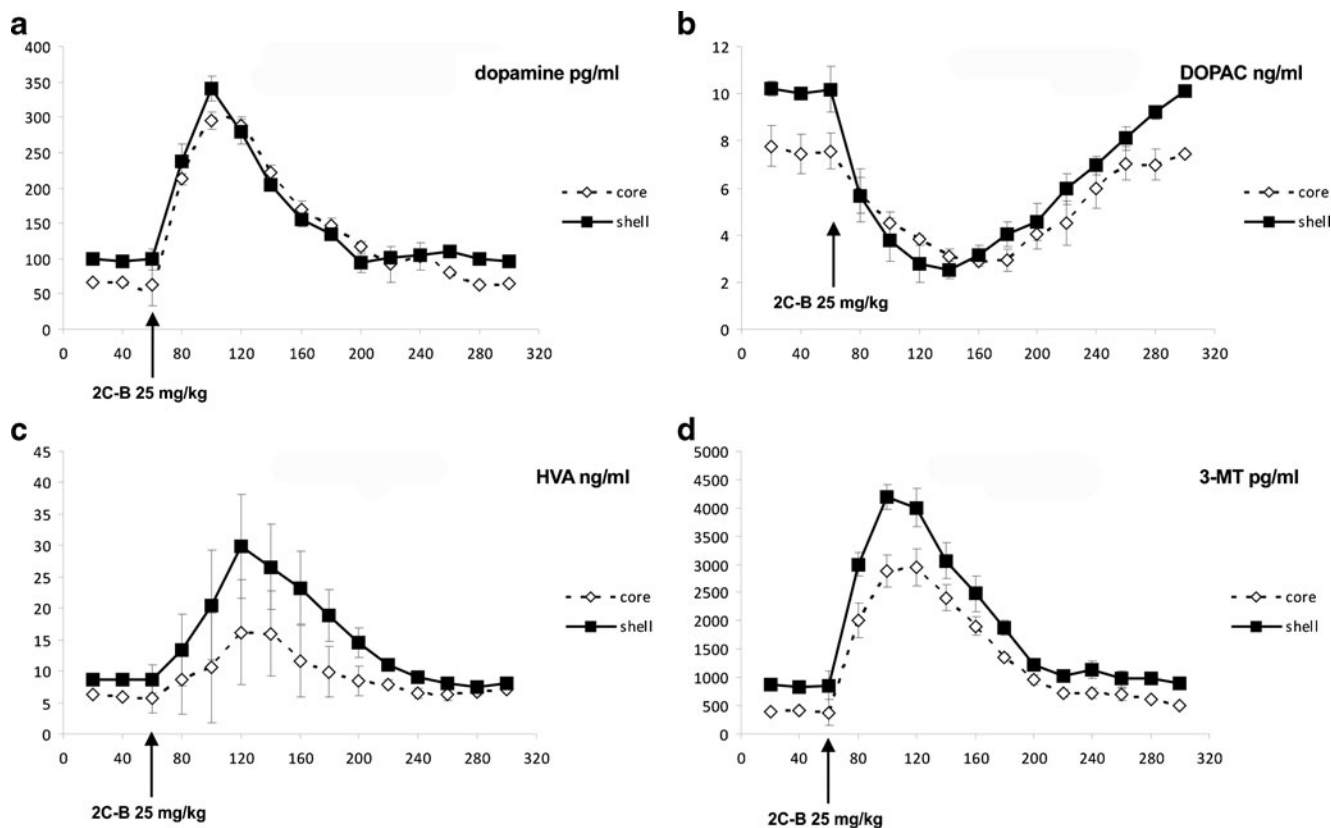
One-way RM ANOVAs in amphetamine 4 mg/kg treated animals revealed a treatment effect in the theta ( $F_{(2,18)}=6.66$ ,  $p<0.01$ ), alpha ( $F_{(2,18)}=4.58$ ,  $p<0.05$ ) and beta bands ( $F_{(2,18)}=4.03$ ,  $p<0.05$ ; Fig. 6a). Post hoc tests showed that amphetamine 4 mg/kg during the onset of its action (10–20 min after administration) significantly increased the mean absolute power in the theta (143.5 % of the baseline,  $p<0.01$ ) and alpha (163.7 % of the baseline,  $p<0.05$ ) bands. The increase persisted at 25–35 min after administration (132.8 % of baseline ( $p<0.05$ ) for theta and 172.5 % of baseline ( $p<0.05$ ) for alpha); however a significant decrease in the mean absolute power in the beta band (86.8 % of the baseline,  $p<0.05$ ) was also present. The power increases were most obvious above the parietal electrodes on both hemispheres, while the decreases in beta were recorded above the frontal and parietal electrodes (Fig. 6a).

**Table 2** The effect of amphetamine on acoustic startle reaction (ASR)

	Vehicle	Amphetamine 1 mg/kg	Amphetamine 4 mg/kg
Mean of startle amplitude (manufacturer's arbitrary units±SEM)	83.26 (±10.21)	91.38 (±18.08)	149.12 (±21.41)*

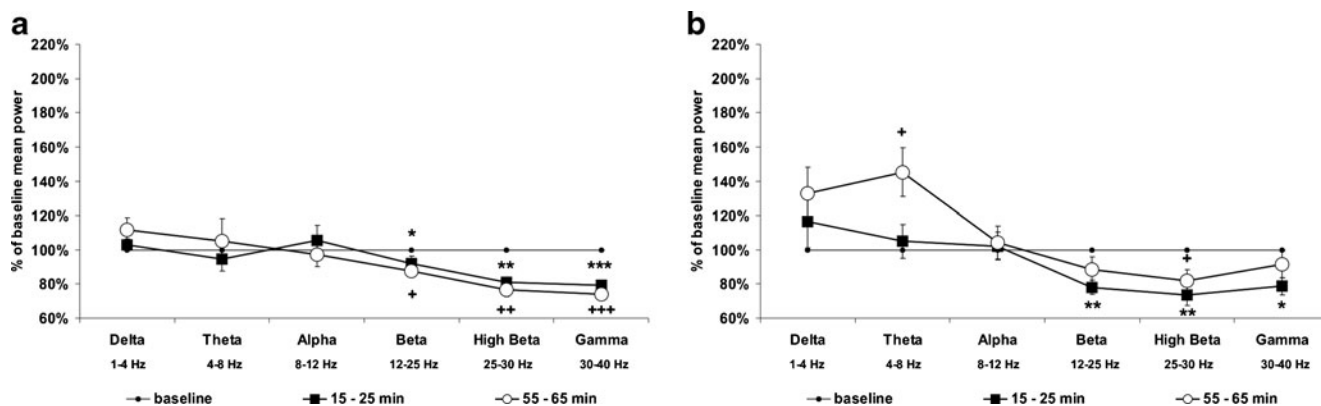
Amphetamine significantly increased ASR in a dose of 4 mg/kg

\* $p<0.05$  from the vehicle (control) group



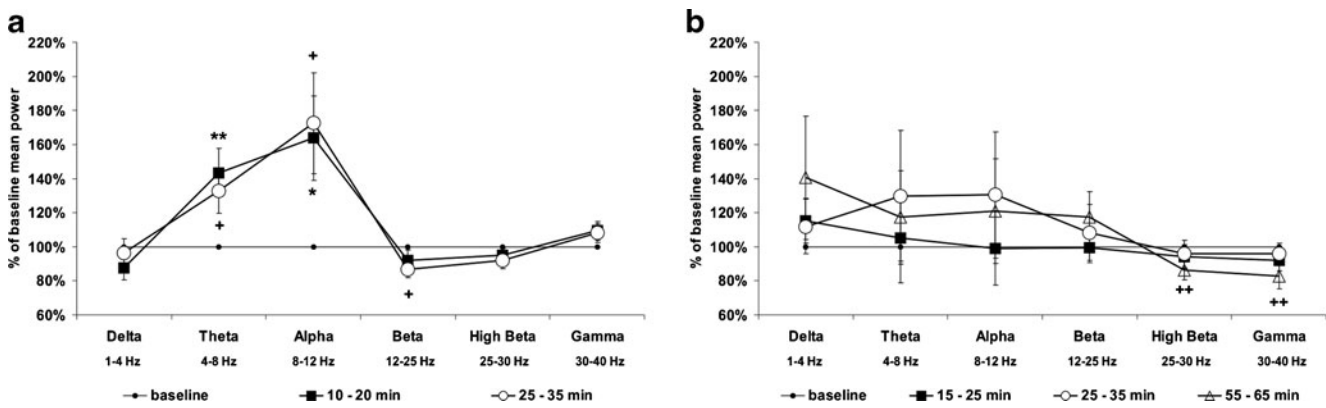
**Fig. 4** The effect of 2C-B 25 mg/kg s.c. administration on dopamine, DOPAC, HVA and 3-MT levels in the nucleus accumbens (NAc) Core and Shell in brain microdialysates. Baseline levels of dopamine (a) and DOPAC (b) were slightly higher in NAc Shell compared to Core (1st three points on each curve). Administration of the drug induced significant increase in dopamine levels in

both parts of NAc. Similarly there was an increase in HVA (c) and 3-MT (d) levels; on the contrary, there was a drop in DOPAC (b). Levels of all monoamines returned to the baseline approximately 160 min after the injection of 2C-B. All data are presented as mean±SEM



**Fig. 5** The effect of 2C-B treatments on mean absolute EEG power. **a** The effect of 2C-B 10 mg/kg on mean absolute power (n=9)—the mean power was decreased in the beta, high beta and gamma bands in both intervals. **b** The effect of 2C-B 50 mg/kg on mean absolute power (n=8)—the mean power was decreased in the beta, high beta and gamma bands at 15–25 min after

administration; on the contrary, at 55–65 min after administration, an increase in theta power was observed. All data are presented as mean±SEM. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001 from the baseline for 10–20 min. +*p*<0.05, ++*p*<0.01 and +++*p*<0.001 from the baseline for 55–65 min



**Fig. 6** The effect of amphetamine and vehicle treatments on the mean absolute EEG power. **a** The effect of amphetamine 4 mg/kg on mean absolute power ( $n=10$ )—the mean power was increased in theta and alpha bands in both timings; however, during 25–30 min after amphetamine administration, a slight decrease in beta power was also observed. All data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$

from the baseline for 10–20 min. + $p < 0.05$  from the baseline for 25–35 min. **b** The effect of the vehicle on mean absolute power ( $n=9$ )—mean power was not altered at 15–25 and 25–35 min; however, a significant decrease in power was observed in high beta and gamma bands at 55–65 min after administration. ++ $p < 0.01$  from the baseline for 55–65 min

#### Effect of vehicle on absolute EEG power spectra

One-way RM ANOVAs showed an effect in vehicle treated animals in the high beta ( $F_{(3,27)}=5.07$ ,  $p < 0.01$ ) and gamma ( $F_{(3,27)}=4.57$ ,  $p=0.01$ ) bands. Post hoc tests showed that administration of the vehicle did not induce any changes in mean absolute power during the 15–25 and 25–35 min intervals. However, during the 55–65 min interval a decrease in the mean absolute power in the high beta (86.5 % of the baseline,  $p < 0.01$ ) and gamma (82.9 % of the baseline,  $p < 0.01$ ) bands was observed. More specifically, the decrease in the beta band was present only above the frontal and parietal electrodes; on the contrary the decrease in the gamma band was observed above all electrodes (Fig. 6b).

#### EEG experiments—effect on EEG coherence

##### The effect of 2C-B treatments on EEG coherence

2C-B 10 mg/kg induced an overall decrease in the coherence in all frequency bands. During the onset of the drug's action (15–25 min after administration), the most prominent constant decreases were observed in inter-hemispheric temporal coherence, intra-hemispheric parieto-temporal and fronto-temporal coherence. In the beta, high beta and gamma bands, a decrease in inter- and intra-hemispheric coherence between the frontal electrodes was also present (Fig. 7a). Later at 55–65 min after drug administration, the decrease in coherence had a similar trend. In addition to the decrease in inter-hemispheric temporal coherence, a decrease in parietal inter-hemispheric coherence was also observed, and intra-hemispheric parieto-temporal and fronto-temporal coherence also decreased (Fig. 7b).

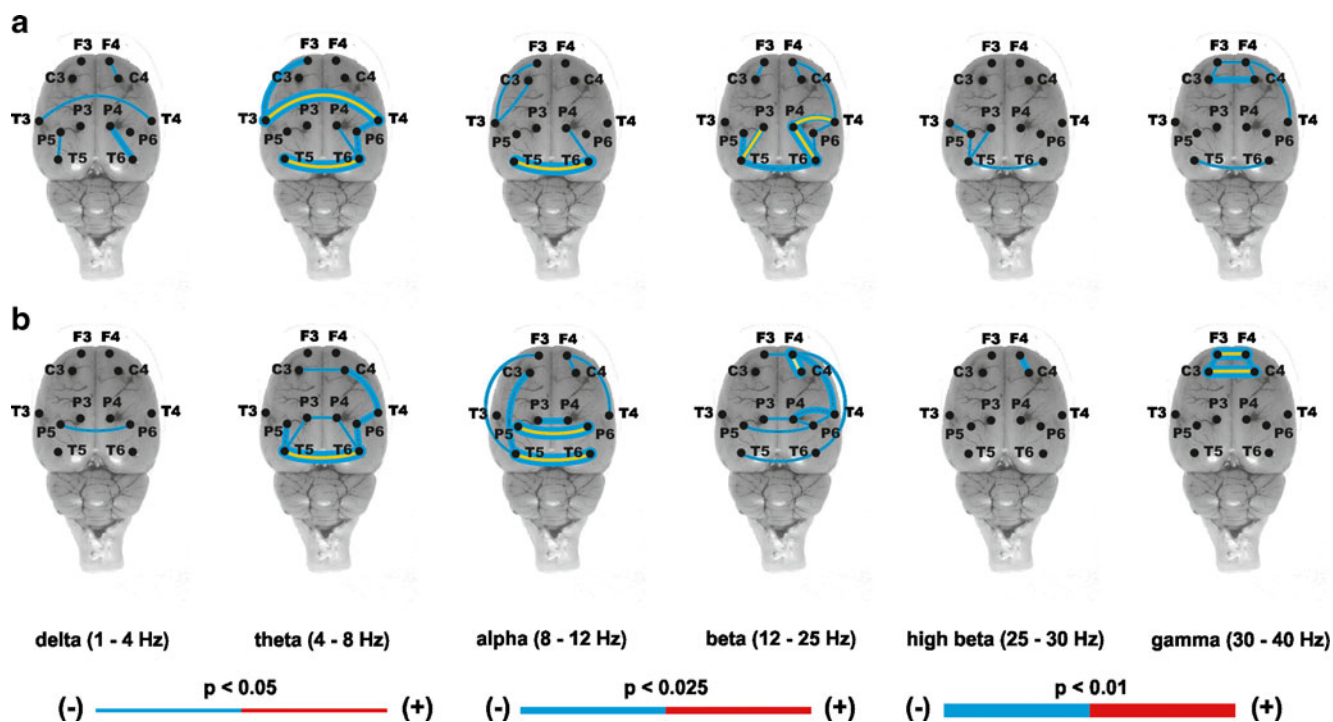
2C-B 50 mg/kg induced a decrease as well as an increase in coherence between the electrodes. During the onset of the drug's action (15–25 min after administration), there was a constant decrease of frontal, temporal and parietal inter-hemispheric coherence in the delta, theta, alpha and beta bands. Changes were most robust in the beta band. In the higher frequency bands, starting from beta, an increase in intra-hemispheric fronto-temporal and fronto-parietal coherence was dominant (Fig. 8a). At 55–65 min after drug administration, changes were of a similar trend. The decrease in temporal inter-hemispheric coherence persisted; however there were fewer changes in the beta band. The increase of fronto-parietal intra-hemispheric coherence was less pronounced than at 15–25 min and also shifted to the lower part of the spectrum (theta and alpha). Most prominent changes were observed in the theta, alpha, high beta and gamma bands (Fig. 8b).

##### The effect of amphetamine 4 mg/kg treatment on EEG coherence

The main effect of amphetamine 4 mg/kg at 10–20 min after administration was a global increase in coherence in theta and alpha bands. Some other increases were also present in the beta, high beta and gamma bands. On the contrary, only minor decreases were observed in the delta and even less in the beta and gamma bands (Fig. 9a). At 25–35 min after administration, the direction of changes was similar in the delta, theta, alpha and gamma bands; however in the beta and high beta bands, there was a greater decrease in coherence (Fig. 9b).

##### The effect of vehicle treatment on EEG coherence

Animals treated with the vehicle showed only minor changes in EEG coherence during 15–25 and 25–35 min



**Fig. 7** EEG coherence for 2C-B 10 mg/kg treated animals ( $n=9$ ) 15–25 min (a) and 55–65 min (b) after the administration—comparison to baseline record. 2C-B 10 mg/kg induced only decreases in coherence throughout the spectrum, the most prominent changes were decreases in inter-hemispheric coherence and some decreases in fronto-temporal intra-

after administration of the vehicle. These changes were mainly increases in fronto-temporal intra-hemispheric coherence in the delta and theta bands. A decrease in coherence in the high beta and gamma bands especially at 25–35 min after administration was also observed (Fig. 10a, b). However, during the last interval analysed (55–65 min), there was only an increase in inter-hemispheric temporal coherence in the delta band and on the contrary there was a significant decrease in coherence mainly in the alpha, beta and high beta bands. There were mainly fronto-temporal and fronto-parietal intra-hemispheric and frontal, parietal and temporal inter-hemispheric decreases in coherence within these bands. Some minor decreases with a similar trend were also observed in the theta and gamma bands (Fig. 10c).

## Discussion

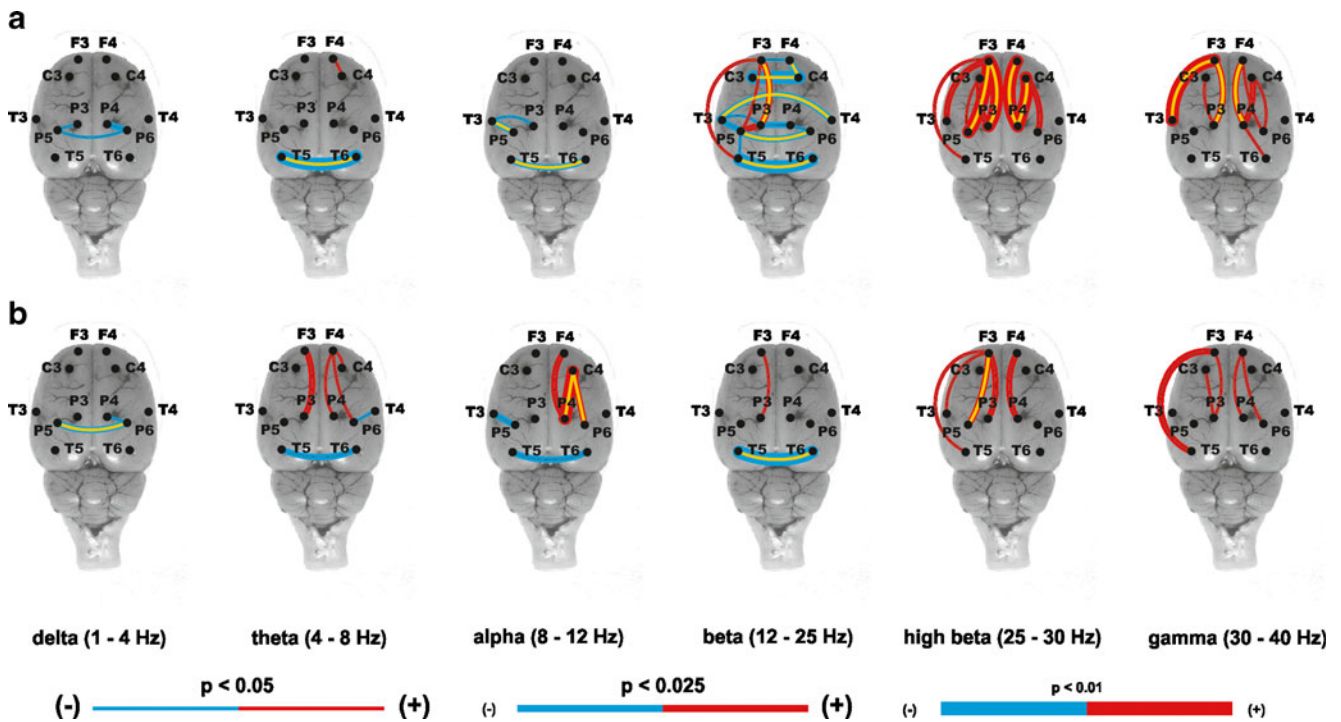
2C-B affected most of the behavioral parameters and EEG measures analysed and induced an increase in the dopamine levels in the nucleus accumbens (NAc). The compound had a biphasic effect on locomotion (decrease followed by an increase) and it disrupted sensorimotor gating. In EEG experiments dose and time related biphasic effects were also observed. The comparative active drug, amphetamine, also

hemispheric coherence. (The red color indicates an increase of coherence, blue color indicates a decrease of coherence. Statistical significance of the changes found (paired *t* test) is expressed by the thickness of the line as displayed at the bottom of the image. If a yellow line is shown, then the data also survived FWE correction)

affected behavioral patterns and EEG. It induced hyperlocomotion, deficits in sensorimotor gating and increases in EEG power spectra and coherence.

## Behavioral findings

2C-B yielded an initial decrease in locomotion during the onset of effects which changed to an increase at 60 min after administration. The hyperlocomotion, most pronounced after 2C-B 25 mg/kg, temporally correlated with its potency to release dopamine and to its expected maximal brain concentrations (Rohanova et al. 2008). A diminution of habituation after higher doses of the drug was clearly visible in the detailed locomotor curve. This is very similar to what we have previously found with mescaline (Palenicek et al. 2008) to which the parent compound is closely related. The hypolocomotor and temporal and dose dependent biphasic effects (with hypolocomotion followed by hyperlocomotion) are also characteristic for many other psychedelics e.g. (Adams and Geyer 1982; Geyer et al. 1979; Krebs-Thomson et al. 1998; Krebs-Thomson and Geyer 1996; Palenicek et al. 2006; Palenicek et al. 2010; Sykes 1986) but not for entactogen MDMA or amphetamine, which have an inverted U shape dose response curve (Hegadoren et al. 1995; Palenicek et al. 2005; Palenicek et al. 2007; Spanos and Yamamoto 1989). The less pronounced increase in locomotion induced



**Fig. 8** EEG coherence for 2C-B 50 mg/kg treated animals ( $n=8$ ) 15–25 (a) and 55–65 min (b) after the administration—comparison to baseline record. At 15–25 min after administration, 2C-B 50 mg/kg mainly induced a decrease in inter-hemispheric coherence in the delta, theta, alpha and beta bands; on the contrary, in high beta and gamma bands, an increase in fronto-temporal and fronto-parietal coherence was observed. At 55–65 min after administration, these changes showed a similar trend; however, they

were not so prominent. In addition, increases were also observed in slower parts of the spectrum. (The red color indicates an increase of coherence, blue color indicates a decrease of coherence. Statistical significance of the changes found (paired  $t$  test) is expressed by the thickness of the line as displayed at the bottom of the image. If a yellow line is shown, then the data also survived FWE correction)

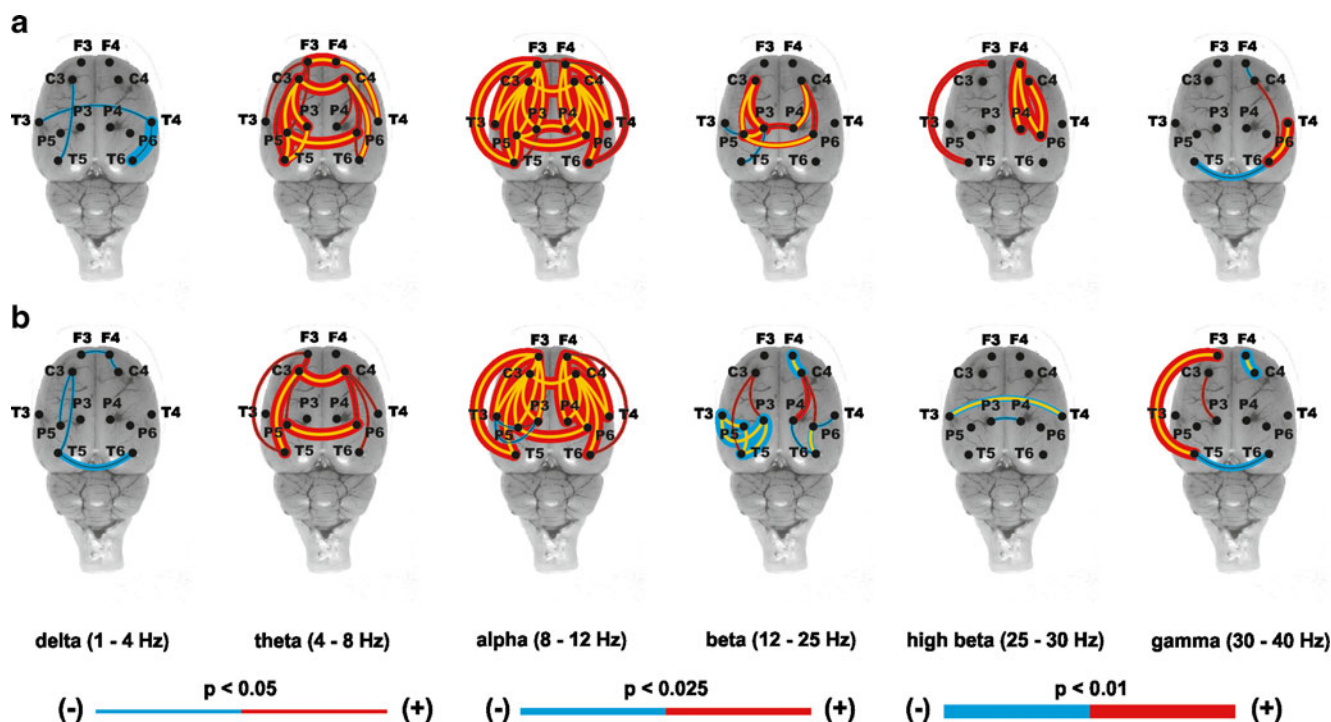
by 2C-B 50 mg/kg with increased time spent in the centre of the arena can be attributed to an occurrence of stereotyped behavior which is a behavioral pattern characteristic for psychedelics, entactogens as well as stimulants e.g. (Gentry et al. 2004; Gold et al. 1989; Palenicek et al. 2011a; Paulus and Geyer 1992). Increased time in the centre can also reflect either the inhibitory locomotor action of 2C-B or decreased anxiety of animals (Bourin et al. 2007; Palenicek et al. 2008; Sykes 1986).

The disruption of PPI reflects alterations in informational processing (Swerdlow et al. 2000). Hallucinogenic, entactogenic and stimulant drugs which induce an inadequate sensory filtering by manipulations with serotonin and dopamine systems typically induce such a deficit (Brunell and Spear 2006; Bubenikova et al. 2005; Geyer 1998; Palenicek et al. 2008; Palenicek et al. 2010; Swerdlow et al. 2003). Therefore, it is not surprising that PPI was significantly disrupted in our experiments. Nevertheless, mainly during the onset of its action, the 2C-B-induced PPI changes were also accompanied by decreased startle response per se. Other psychedelics, MDMA or amphetamine show inconsistent effects on ASR e.g. (Brunell and Spear 2006; Bubenikova et al. 2005; Davis 1987; Davis and Walters 1977; Palenicek et al. 2008; Palenicek et al. 2010; Swerdlow et al. 2003; Varty et

al. 2001) making comparisons difficult. It can reflect decreased anxiety of animals (Bourin et al. 2007) which is in line with the observation of increased time in the centre in the open field test. Another support for this hypothesis is given by our recent results where 2C-B, similar to MDMA, decreased anxiety in a test of ultrasonic vocalization (Kubesova et al. 2011) and that its amphetamine congener 4-iodo-2,5-dimethoxyiodoamphetamine (DOI) showed anxiolytic properties in various tests for anxiety (Masse et al. 2007a; Masse et al. 2007b). Since 2C-B in humans is reported to induce euphoria, a mechanism called pleasure attenuation of ASR (Koch 1999; Koch and Schnitzler 1997) as well as altered motor coordination or ataxia may also theoretically contribute partly to this (Swerdlow et al. 2000; Wecker and Ison 1986). However, a major effect of the latter mentioned can be excluded since 2C-B decreased startle also at 60 min after administration where the drug had minimal or slight hyperlocomotor effects.

It is of note that attenuated startle reaction can also interfere with the PPI itself. The main confounding factor would be “floor effects” of the drug (Swerdlow et al. 2000), representing the failure of decreasing startle which is of very low magnitude. Yet according to the average baseline startle amplitude on “no-stimulus” which was below 5 manufacturer’s





**Fig. 9** EEG coherence for amphetamine 4 mg/kg treated animals ( $n=10$ ) 10–20 (a) and 25–35 min (b) after the administration—comparison to baseline record. Amphetamine induced robust increases in coherence in the theta and alpha bands; during the onset of its action, the increases were obvious also in the beta, high beta and partly in the gamma bands. On the contrary, at 25–35 min after administration, a decrease in coherence in the beta and high beta bands was dominant. At both intervals, a slight

decrease in coherence in the delta band was also present. (The *red color* indicates an increase of coherence, *blue color* indicates a decrease of coherence. Statistical significance of the changes found (paired *t* test) is expressed by the thickness of the line as displayed at the bottom of the image. If a *yellow line* is shown, then the data also survived FWE correction)

arbitrary units (data not shown) this can be excluded since even ASR was decreased (between 35–72 manufacturer's arbitrary units) it could still be sufficiently inhibited by pre-pulse. Moreover, the number of animals did not differ between 2C-B treated animals and controls (on average less than 20 %, which is typical in rats). Finally, the measurement at 60 min after administration yielded smaller changes in the ASR while the deficits in the PPI persisted.

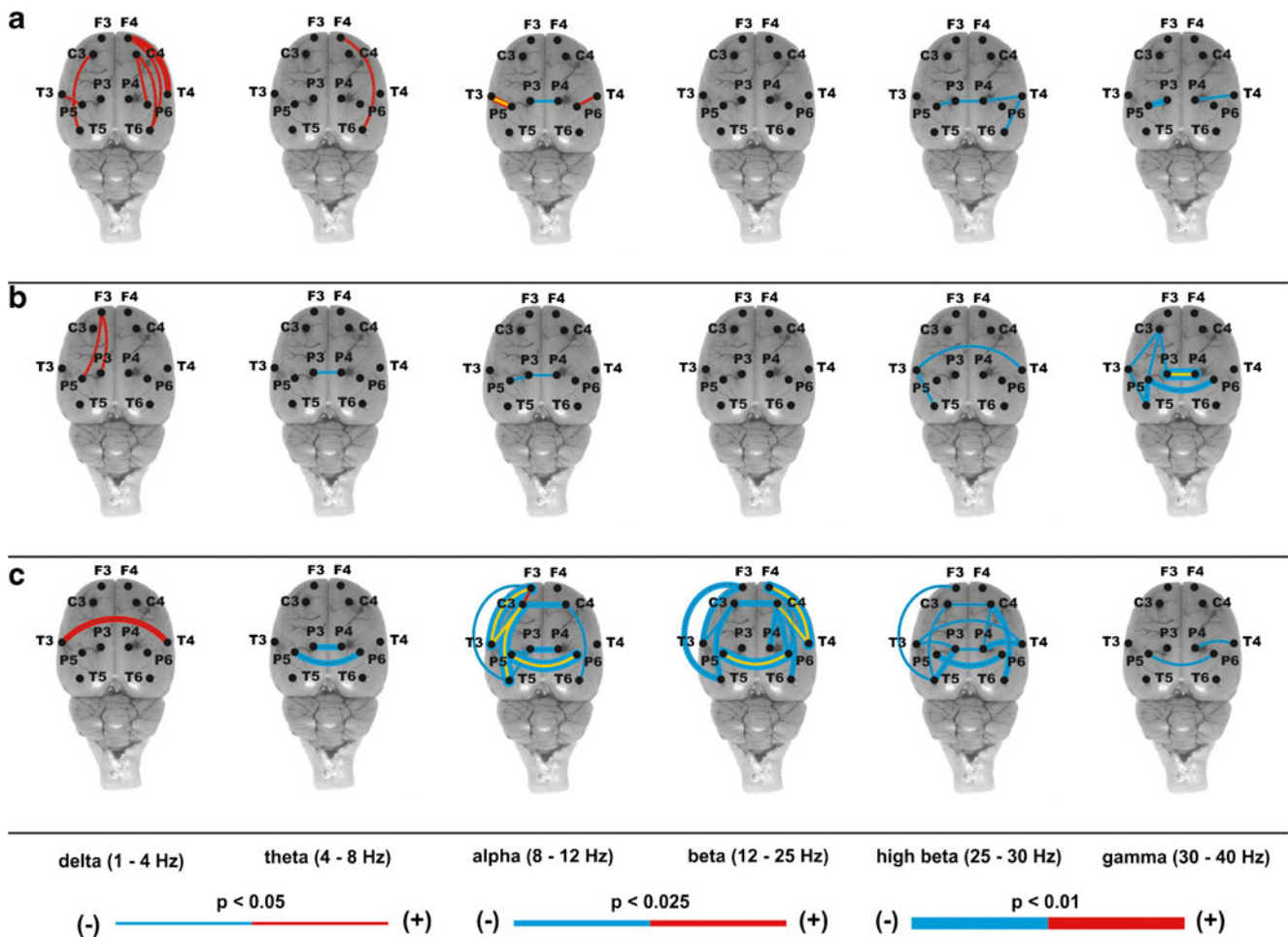
#### Microdialysis experiments

2C-B 25 mg/kg increased the release of dopamine (DA) in both main compartments of NAc indicating it is involved in the observed locomotor changes, sensorimotor gating deficits as well as in its psychotomimetic and addictive potential. Since there was a drop in DOPAC levels, it clearly shows that the drug has inhibitory effects on monoamine oxidase (MAO). On the contrary, 3-MT was increased indicating that catechol-O-methyl transferase (COMT) remained unaffected. However, it is not clear how the final product HVA, which was increased, was produced. 3-MT can be converted to HVA; however again MAO is necessary (Youdim and Riederer 2004). There are two main forms of MAO, MAO A and B, which have different roles in different parts of the brain in the

deactivation of dopamine (Jahng et al. 1997). Probably the different local involvement of these two forms of MAO in DA metabolism and the selective effects of 2C-B on only one type of MAO can underlie these changes (Kalgutkar et al. 2001). Further experiments will be needed to explain this discrepancy. The increase in DA can also be related to the effects on the dopamine transporter, which is also possible due to the structural similarity of the drug with dopamine releasing agents such as amphetamine. Again, further experiments will be needed.

#### EEG findings

We did not observe any specific changes in the EEG in controls during the first 30 min after the vehicle administration. However, 1 h after the administration of the vehicle a decrease in the power in the high beta and gamma bands, an increase in delta power and a decrease in coherence in the alpha–high beta bands were observed. We suggest the sleep–wake cycle could contribute to these changes since comparable observations in rats and mice were described during the slow wave sleep stages (Maloney et al. 1997; Vyazovskiy et al. 2004). On the contrary to amphetamine or 2C-B treated animals, control animals had to be handled



**Fig. 10** EEG coherence for vehicle treated animals (controls,  $n=9$ ) 15–25 (a), 25–35 (b) and 55–65 min (c) after the administration—comparison to baseline record. Only minor changes were observed in control animals during the first 30 min. These were a slight increase in coherence in the delta band and a slight decrease in the high beta and gamma bands. At 55–60 min after administration, there was mainly a

decrease in coherence in the alpha, beta and high beta bands. (The red color indicates an increase of coherence, blue color indicates a decrease of coherence. Statistical significance of the changes found (paired  $t$  test) is expressed by the thickness of the line as displayed at the bottom of the image. If a yellow line is shown, then the data also survived FWE correction)

during these later phases of recording to prevent sleep. The second variable which might contribute to the observed effects is a fact that control animals in our experiments were exposed to a mild sleep deprivation by handling. This could also result in (artificial) spectral and coherence changes (Everson et al. 1989a; Everson et al. 1989b; Rechtschaffen et al. 1999).

2C-B decreased EEG power in higher frequency bands except 2C-B 50 mg/kg treatment 1 h after administration which induced an increase of theta power. Similar power increase within theta and alpha bands was induced by amphetamine. This theta/alpha peak most likely reflects the locomotor activity of animals as was already shown for amphetamine (Young 1988) and congruently might reflect increased wakefulness (Ambrosini et al. 1994). It is also supported by our more recent findings (behavioral activity,

moving, eating, grooming etc. was associated with clear 7–8 Hz peak (Palenicek et al. 2011c; Palenicek et al. 2011d)) and is also congruent with others (Maloney et al. 1997; Vyazovskiy et al. 2006; Vyazovskiy et al. 2007). Since at the same time there was a peak in the DA release in the NAc, we suggest it is an underlying neurobiological substrate of these changes. Some similarities can also be found in other studies with phenylalkylamine psychedelics and LSD in rats where an increase in the frontal alpha1 (7–9.5 Hz) EEG power was described (Dimpfel et al. 1988; Dimpfel et al. 1989). Interestingly, the increase was not present during the onset of action of these drugs but at later stages where other authors have described an increase in behavioral activities induced by these compounds (Geyer et al. 1979; Marona-Lewicka et al. 2005). MDMA used in the above mentioned study (Dimpfel et al. 1989) also induced

an increase in the alpha at 2.4 mg/kg (this dose produces hyperlocomotion (Palenicek et al. 2005)) but not with lower doses, again indicating a resemblance of these effects. On the contrary to the theta/alpha peak, the observed general power decrease after 2C-B was also observed with other psychedelics (LSD, mescaline, psilocin and DOB) in our recent experiments (Fujakova et al. 2011; Tyls et al. 2011) and power decreases in all other frequency bands were also seen in the mentioned studies with psychedelics as well as entactogens N-methyl-1-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-butanamine (MBDB) and MDMA (Dimpfel et al. 1988; Dimpfel et al. 1989). Since the behavioral activity of animals was inhibited along with the EEG power decreases, these findings might reflect common serotonergic mechanisms with psychedelic drugs, e.g. stimulation of 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors.

2C-B also induced several changes in brain functional connectivity and again as with behavioral experiments these were dose and time specific. The main observation was a consistent disconnection with 2C-B 10 mg/kg contrary to 2C-B 50 mg/kg where an increase in connectivity in higher parts of the spectrum was observed.

It is difficult to compare our results to other authors since there is a substantial lack of such experiments throughout the literature. In our previous study, we have found an overall increase in coherence after ketamine administration which was present along with increased locomotor activity (Palenicek et al. 2011b). Congruently, an increase in coherence associated with behavioral activity was observed in our recent studies (Palenicek et al. 2011c; Palenicek et al. 2011d) and by Maloney et al. 1997. Therefore the increase of coherence in 2C-B 50 mg/kg and also in amphetamine treated animals might again reflect their hyperlocomotor effects and might be related to dopamine increase in NAc. On the contrary the decreases of coherence that were present mainly with the 2C-B 10 mg/kg are in line with our recent findings in other serotonergic hallucinogens (psilocin, mescaline, DOB and LSD; Fujakova et al. 2011; Tyls et al. 2011).

According to Lisman and Buzsaki 2008, synchronous gamma and theta oscillations are related to cognitive functions and processing of spatial representations. Thus, the disturbances of these oscillations observed in our spectral and coherence analysis might reflect the disturbed informational processing including the appropriate acquisition and processing of spatial representations. We might then associate it to the observed behavioral changes (altered locomotion, stereotypy or disrupted PPI) and hypothesize it reflects the psychedelic potential of 2C-B.

#### Underlying neurobiological substrates

Underlying neurochemical substrates, which contribute to the observed behavioral changes, most likely involve

stimulation of serotonergic as well as dopaminergic systems. The most probable explanation of time and dose dependent biphasic effects is related to pharmacodynamics. We propose that while dopamine increases 1 h after the administration of 2C-B, the initial effects of the drug are more related to its direct action at serotonin receptors (Moya et al. 2007), while in later stages especially for high doses of the drug, dopamine plays an important role. A support for this statement is found in studies with LSD, where the initial effects of the drug correspond to its agonist effects on serotonin 5-HT<sub>2A/C</sub> receptors, while latter effects can be attributed to its affinity at dopaminergic receptors (Marona-Lewicka et al. 2005; Marona-Lewicka and Nichols 2007). The other possible explanation is that a sequestration of the parent drug into various compartments (2C-B has been shown to accumulate in the lungs) with subsequent continuous release may lead to gradual penetration to the brain (Rohanova et al. 2008) and thus might be relevant for delaying some behavioral effects of the drug. A similar pattern of accumulation in the lungs has been reported for its amphetamine analog DOB (Berankova et al. 2007) and another congener *para*-methoxymethamphetamine (PMMA) (Palenicek et al. 2011a; Rohanova and Balikova 2009). Finally, the drug can be metabolized to an active metabolite which might have a different pharmacological action as has been described e.g. for MDMA (metabolized to 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDA) (Segura et al. 2001) or PMMA (metabolized to *para*-methoxyamphetamine (PMA)) (Rohanova and Balikova 2009). However to-date no metabolite of 2C-B has been investigated as being possibly active (Carmo et al. 2004; Carmo et al. 2005; Kanamori et al. 2005; Rohanova et al. 2008).

The NAc increase in DA levels can be definitely positively linked to the hyperlocomotor effects of the drug and it can also contribute to the disruption of sensorimotor gating (NAc core) (Geyer et al. 2001). Furthermore, it can contribute to the theoretical addictive potential of this substance (Lingford-Hughes and Nutt 2003; Roberts and Koob 1997) and to its potential to induce psychotic symptoms (NAc shell) (Breier et al. 1998; Vollenweider et al. 1999).

#### Conclusion

2C-B is a potent centrally active compound which induces behavioral, neurochemical and electrophysiological changes comparable to other psychedelics as well as to entactogens and stimulants. The drug has time and dose dependent biphasic effects of action which are presumably linked to time differences in the involvement of serotonin and dopamine systems. The effects of 2C-B on DA levels and turnover in the NAc suggest it presumably inhibits MAO and may be related to its addictive and psychotomimetic potential. The EEG findings showed robust effects on functional connectivity in the brain which might correlate to altered sensorimotor

processing and its psychedelic potential. A temporal correlation of 2C-B's effects on locomotion and correlation between EEG changes and locomotor behavior are emerging.

**Acknowledgements** This study was supported by the grants IGA MHCR NS 10374, NS 10375, NT 13897, MEYSCR 1M0517, MHCR MZ0PCP2005, MICR VG20122015075 and VG20122015080. We thank Craig Hampson BSc (Hons) for his helpful comments and language correction.

## References

- Acuna-Castillo C, Villalobos C, Moya PR, Saez P, Cassels BK, Huidobro-Toro JP (2002) Differences in potency and efficacy of a series of phenylisopropylamine/phenylethylamine pairs at 5-HT (2A) and 5-HT(2C) receptors. *Br J Pharmacol* 136:510–519
- Adams LM, Geyer MA (1982) LSD-induced alterations of locomotor patterns and exploration in rats. *Psychopharmacol (Berl)* 77:179–185
- Ambrosini MV, Gambelungho C, Mariucci G, Bruscellini G, Adami M, Giuditta A (1994) Sleep-wake variables and EEG power spectra in Mongolian gerbils and Wistar rats. *Physiol Behav* 56:963–968
- Berankova K, Szkutova M, Balikova M (2007) Distribution profile of 2,5-dimethoxy-4-bromoamphetamine (DOB) in rats after oral and subcutaneous doses. *Forensic Sci Int* 170:94–99
- Bossong MG, Van Dijk JP, Niesink RJ (2005) Methylone and mCPP, two new drugs of abuse? *Addict Biol* 10:321–323
- Bourin M, Petit-Demouliere B, Dhonnchadha BN, Hascoet M (2007) Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 21:567–574
- Breier A, Adler CM, Weisenfeld N, Su TP, Elman I, Picken L, Malhotra AK, Pickar D (1998) Effects of NMDA antagonism on striatal dopamine release in healthy subjects: application of a novel PET approach. *Synapse* 29:142–147
- Bronson ME, Jiang W, DeRuiter J, Clark CR (1995) A behavioral comparison of Nexus, cathinone, BDB, and MDA. *Pharmacol Biochem Behav* 51:473–475
- Brunell SC, Spear LP (2006) Effects of acute ethanol or amphetamine administration on the acoustic startle response and prepulse inhibition in adolescent and adult rats. *Psychopharmacology* 186:579–586
- Bubenikova V, Votava M, Horacek J, Palenicek T (2005) Relation of sex and estrous phase to deficits in prepulse inhibition of the startle response induced by ecstasy (MDMA). *Behav Pharmacol* 16:127–130
- Carmo H, de Boer D, Remiao F, Carvalho F, dos Reys LA, de Lourdes BM (2004) Metabolism of the designer drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in mice, after acute administration. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 811:143–152
- Carmo H, Hengstler JG, de Boer D, Ringel M, Remiao F, Carvalho F, Fernandes E, dos Reys LA, Oesch F, de Lourdes BM (2005) Metabolic pathways of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): analysis of phase I metabolism with hepatocytes of six species including human. *Toxicology* 206:75–89
- Caudevilla-Galligo F, Riba J, Ventura M, Gonzalez D, Farre M, Barbanj MJ, Bouso JC (2012) 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): presence in the recreational drug market in Spain, pattern of use and subjective effects. *J Psychopharmacol* 26:1026–1035
- Cole MD, Lea C, Oxley N (2002) 4-Bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B): a review of the public domain literature. *Sci Justice* 42:223–224
- Davis M (1987) Mescaline: excitatory effects on acoustic startle are blocked by serotonin2 antagonists. *Psychopharmacol (Berl)* 93:286–291
- Davis M, Walters JK (1977) Psilocybin: biphasic dose-response effects on the acoustic startle reflex in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 6:427–431
- de Boer D, Bosman I (2004) A new trend in drugs-of-abuse; the 2C-series of phenethylamine designer drugs. *Pharm World Sci* 26:110–113
- de Boer D, Gijzels MJ, Bosman IJ, Maes RA (1999) More data about the new psychoactive drug 2C-B. *J Anal Toxicol* 23:227–228
- de Boer D, Bosman IJ, Hidvegi E, Manzoni C, Benko AA, dos Reys LJ, Maes RA (2001) Piperazine-like compounds: a new group of designer drugs-of-abuse on the European market. *Forensic Sci Int* 121:47–56
- Deutch AY, Cameron DS (1992) Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience* 46:49–56
- Dimpfel W, Spuler M, Borbe HO (1988) Monitoring of the effects of antidepressant drugs in the freely moving rat by radioelectroencephalography (tele-stereo-EEG). *Neuropsychobiology* 19:116–120
- Dimpfel W, Spuler M, Nichols DE (1989) Hallucinogenic and stimulatory amphetamine derivatives: fingerprinting DOM, DOI, DOB, MDMA, and MBDB by spectral analysis of brain field potentials in the freely moving rat (Tele-Stereo-EEG). *Psychopharmacol (Berl)* 98:297–303
- EMCDDA (2004) Report on the risk assessment of 2C-I, 2C-T-2 and 2C-T-7 in the framework of the joint action on new synthetic drugs. European monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA)
- Everson CA, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1989a) Sleep deprivation in the rat: III. Total sleep deprivation. *Sleep* 12:13–21
- Everson CA, Gilliland MA, Kushida CA, Pilcher JJ, Fang VS, Refetoff S, Bergmann BM, Rechtschaffen A (1989b) Sleep deprivation in the rat: IX. Recover Sleep 12:60–67
- Fiserova M, Consolo S, Krsiak M (1999) Chronic morphine induces long-lasting changes in acetylcholine release in rat nucleus accumbens core and shell: an in vivo microdialysis study. *Psychopharmacol (Berl)* 142:85–94
- Fujakova M, Palenicek T, Tyls F, Kubesova A, Brunovsky M, Krajca V, Horacek J (2011) The effect of phenylethylamine hallucinogens on quantitative electroencephalography and behavior in rats. *Behav Pharmacol* 22:e38
- Gentry WB, Ghafour AU, Wessinger WD, Laurenzana EM, Hendrickson HP, Owens SM (2004) (+)-Methamphetamine-induced spontaneous behavior in rats depends on route of (+)METH administration. *Pharmacol Biochem Behav* 79:751–760
- Geyer MA (1998) Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry* 31(Suppl 2):73–79
- Geyer MA, Light RK, Rose GJ, Petersen LR, Horwitz DD, Adams LM, Hawkins RL (1979) A characteristic effect of hallucinogens on investigatory responding in rats. *Psychopharmacol (Berl)* 65:35–40
- 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. *Psychopharmacol (Berl)* 156:117–154
- Glennon RA, Titeler M, Lyon RA (1988) A preliminary investigation of the psychoactive agent 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine: a potential drug of abuse. *Pharmacol Biochem Behav* 30:597–601
- Gold LH, Geyer MA, Koob GF (1989) Neurochemical mechanisms involved in behavioral effects of amphetamines and related designer drugs. *NIDA Res Monogr* 94:101–126
- Hegadoren KM, Martin-Iverson MT, Baker GB (1995) Comparative behavioural and neurochemical studies with a psychomotor

- stimulant, an hallucinogen and 3,4-methylenedioxy analogues of amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 118:295–304
- Huang HH, Bai YM (2011) Persistent psychosis after ingestion of a single tablet of '2C-B'. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:293–294
- Jahng JW, Houpt TA, Wessel TC, Chen K, Shih JC, Joh TH (1997) Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization. *Synapse* 25:30–36
- Kalgutkar AS, Dalvie DK, Castagnoli N Jr, Taylor TJ (2001) Interactions of nitrogen-containing xenobiotics with monoamine oxidase (MAO) isozymes A and B: SAR studies on MAO substrates and inhibitors. *Chem Res Toxicol* 14:1139–1162
- Kanamori T, Tsujikawa K, Ohmae Y, Iwata YT, Inoue H, Kishi T, Nakahama T, Inouye Y (2005) A study of the metabolism of methamphetamine and 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in isolated rat hepatocytes. *Forensic Sci Int* 148:131–137
- Koch M (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59:107–128
- Koch M, Schnitzler HU (1997) The acoustic startle response in rats—circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res* 89:35–49
- Krebs-Thomson K, Geyer MA (1996) The role of 5-HT(1A) receptors in the locomotor-suppressant effects of LSD: WAY-100635 studies of 8-OH-DPAT, DOI and LSD in rats. *Behav Pharmacol* 7:551–559
- Krebs-Thomson K, Paulus MP, Geyer MA (1998) Effects of hallucinogens on locomotor and investigatory activity and patterns: influence of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Neuropsychopharmacology* 18:339–351
- Kubesova A, Palenicek T, Votava M, Fujakova M, Tyls F, Sustkova M, Krsiak M (2011) The influence of 5-HT<sub>1A/2A</sub> antagonists on changes in ultrasonic vocalization in rats induced by administration of MDMA and 2C-B. *Behav Pharmacol* 22:e71
- Lát J (1973) The analysis of habituation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 33:771–789
- Lingford-Hughes A, Nutt D (2003) Neurobiology of addiction and implications for treatment. *Br J Psychiatry* 182:97–100
- Lisman J, Buzsaki G (2008) A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophr Bull* 34:974–980
- Lobos M, Borges Y, Gonzalez E, Cassels BK (1992) The action of the psychoactive drug 2C-B on isolated rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol* 23:1139–1142
- Maloney KJ, Cape EG, Gotman J, Jones BE (1997) High-frequency gamma electroencephalogram activity in association with sleep-wake states and spontaneous behaviors in the rat. *Neuroscience* 76:541–555
- Marona-Lewicka D, Nichols DE (2007) Further evidence that the delayed temporal dopaminergic effects of LSD are mediated by a mechanism different than the first temporal phase of action. *Pharmacol Biochem Behav* 87:453–461
- Marona-Lewicka D, Thisted RA, Nichols DE (2005) Distinct temporal phases in the behavioral pharmacology of LSD: dopamine D<sub>2</sub> receptor-mediated effects in the rat and implications for psychosis. *Psychopharmacol (Berl)* 180:427–435
- Masse F, Hascoet M, Bourin M (2007a) Effect of GABAergic ligands on the anxiolytic-like activity of DOI (a 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist) in the four-plate test in mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:483–491
- Masse F, Nic Dhonnchadha BA, Hascoet M, Bourin M (2007b) Anxiolytic-like effect of 5-HT<sub>2</sub> ligands and benzodiazepines co-administration: comparison of two animal models of anxiety (the four-plate test and the elevated plus maze). *Behav Brain Res* 177:214–226
- Moya PR, Berg KA, Gutierrez-Hernandez MA, Saez-Briones P, Reyes-Parada M, Cassels BK, Clarke WP (2007) Functional selectivity of hallucinogenic phenethylamine and phenylisopropylamine derivatives at human 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 321:1054–1061
- Nichols DE (1986) Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs* 18:305–313
- Palenicek T, Votava M, Bubenikova V, Horacek J (2005) Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. *Physiol Behav* 86:546–553
- Palenicek T, Bubenikova V, Votava M, Horacek J (2006) Účinky selektivního antagonisty serotoninového 5-HT<sub>2C</sub> receptoru SB242084 na lokomoci potkana v animálních modelech psychóz (The effects of selective antagonist of serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor SB242084 on rat's locomotion in animal models of psychosis). *Adiktologie* 10:16–19
- Palenicek T, Hlinak Z, Bubenikova-Valesova V, Votava M, Horacek J (2007) An analysis of spontaneous behavior following acute MDMA treatment in male and female rats. *Neuro Endocrinol Lett* 28:781–788
- Palenicek T, Balikova M, Bubenikova-Valesova V, Horacek J (2008) Mescaline effects on rat behavior and its time profile in serum and brain tissue after a single subcutaneous dose. *Psychopharmacol (Berl)* 196:51–62
- Palenicek T, Hlinak Z, Bubenikova-Valesova V, Novak T, Horacek J (2010) Sex differences in the effects of N, N-diethyllysergamide (LSD) on behavioural activity and prepulse inhibition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:588–596
- Palenicek T, Balikova M, Rohanova M, Novak T, Horacek J, Fujakova M, Hoschl C (2011a) Behavioral, hyperthermic and pharmacokinetic profile of para-methoxymethamphetamine (PMMA) in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 98:130–139
- Palenicek T, Fujakova M, Brunovsky M, Balikova M, Horacek J, Gorman I, Tyls F, Tislerova B, Sos P, Bubenikova-Valesova V, Hoschl C, Krajca V (2011b) Electroencephalographic spectral and coherence analysis of ketamine in rats: correlation with behavioral effects and pharmacokinetics. *Neuropsychobiology* 63:202–218
- Palenicek T, Fujakova M, Tyls F, Brunovsky M, Kubesova A, Horacek J, Krajca V (2011c) Quantitative EEG in animal models of psychosis: the impact of behaviour. *Eur Neuropsychopharmacol* 21: S317
- Palenicek T, Fujakova M, Tyls F, Kubesova A, Brunovsky M, Horacek J, and Krajca V (2011d) The impact of behavior on cortical EEG in rats. Neuroimaging through the lifespan: Brain development and brain diseases from adolescence to senescence—Joint meeting of ISNIP/ISBET/ECNS September 7–10, 2011, University of Heidelberg, Germany, Abstrakt Book: 106
- Paulus MP, Geyer MA (1992) The effects of MDMA and other methylenedioxy-substituted phenylalkylamines on the structure of rat locomotor activity. *Neuropsychopharmacology* 7:15–31
- Paxinos G, Watson C (2003) The rat brain in stereotaxic coordinates, 4th edn. Elsevier, Academic Press, New York
- Pontieri FE, Tanda G, Di CG (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:12304–12308
- Principe JC, Smith JR (1986) Design and implementation of linear phase FIR filters for biological signal processing. *IEEE Trans Biomed Eng* 33:550–559
- Rechtschaffen A, Bergmann BM, Gilliland MA, Bauer K (1999) Effects of method, duration, and sleep stage on rebounds from sleep deprivation in the rat. *Sleep* 22:11–31
- Roberts AJ, Koob GF (1997) The neurobiology of addiction: an overview. *Alcohol Health Res World* 21:101–106
- Rohanova M, Balikova M (2009) Studies on distribution of para-methoxymethamphetamine (PMMA) designer drug in rats using

- gas chromatography-mass spectrometry. *Leg Med (Tokyo)* 11 (Suppl 1):S429–S430
- Rohanova M, Palenicek T, Balikova M (2008) Disposition of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and its metabolite 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine in rats after subcutaneous administration. *Toxicol Lett* 178:29–36
- Segura M, Ortuno J, Farre M, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, Llebaria A, Joglar J, Roset PN, Segura J, de la Torre R (2001) 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol* 14:1203–1208
- Shaw JC, O'Connor KP, Ongley OC (1978) EEG coherence as a measure of cerebral functional organization. In: Brazier MB, Petche H (eds) *Architectonics of the cerebral cortex*. Raven, New York, pp 245–256
- Shulgin AT, Carter MF (1975) Centrally active phenethylamines. *Psychopharmacol Commun* 1:93–98
- Shulgin A, Shulgin A (1991) *PIHKAL: a chemical love story*. Transform Press, Berkeley, CA
- Smolinske SC, Rastogi R, Schenkel S (2005) Foxy methoxy: a new drug of abuse. *J Med Toxicol* 1:22–25
- Spanos LJ, Yamamoto BK (1989) Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-)MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 32:835–840
- Sumnall H, Wooding O (2009) Mephedrone—an update on current knowledge. Centre for Public Health, Liverpool John Moores University
- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA (2000) Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11:185–204
- Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL (2001) Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacol (Berl)* 156:194–215
- Swerdlow NR, Stephany N, Wasserman LC, Talledo J, Shoemaker J, Auerbach PP (2003) Amphetamine effects on prepulse inhibition across-species: replication and parametric extension. *Neuropsychopharmacology* 28:640–650
- Sykes EA (1986) Mescaline-induced motor impairment in rats, assessed by two different methods. *Life Sci* 39:1051–1058
- Syslova K, Rambousek L, Kuzma M, Najmanova V, Bubenikova-Valesova V, Slamberova R, Kacer P (2011) Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: method combining freeze-drying with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:3382–3391
- Thatcher RW, Krause PJ, Hrybyk M (1986) Cortico-cortical associations and EEG coherence: a two-compartmental model. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 64:123–143
- Thatcher RW, Walker RA, Giudice S (1987) Human cerebral hemispheres develop at different rates and ages. *Science* 236:1110–1113
- Thatcher RW, Biver CJ, North DM (2003) Quantitative EEG and the Frye and Daubert standards of admissibility. *Clin Electroencephalogr* 34:39–53
- Thorlacius K, Borna C, Personne M (2008) Bromo-dragon fly—life-threatening drug. Can cause tissue necrosis as demonstrated by the first described case. *Lakartidningen* 105:1199–1200
- Tyls F, Palenicek T, Fujakova M, Kubesova A, Brunovsky M, Krajca V, Horacek J (2011) The effect of tryptamine hallucinogens on quantitative EEG and behavior in rats. *Behav Pharmacol* 22:e39
- Varty GB, Walters N, Cohen-Williams M, Carey GJ (2001) Comparison of apomorphine, amphetamine and dizocilpine disruptions of prepulse inhibition in inbred and outbred mice strains. *Eur J Pharmacol* 424:27–36
- Vollenweider FX, Vontobel P, Hell D, Leenders KL (1999) 5-HT modulation of dopamine release in basal ganglia in psilocybin-induced psychosis in man—a PET study with [<sup>11</sup>C]raclopride. *Neuropsychopharmacology* 20:424–433
- Vyazovskiy V, Achermann P, Borbely AA, Tobler I (2004) Interhemispheric coherence of the sleep electroencephalogram in mice with congenital callosal dysgenesis. *Neuroscience* 124:481–488
- Vyazovskiy VV, Ruijgrok G, Deboer T, Tobler I (2006) Running wheel accessibility affects the regional electroencephalogram during sleep in mice. *Cereb Cortex* 16:328–336
- Vyazovskiy VV, Tobler I, Winsky-Sommerer R (2007) Alteration of behavior in mice by muscimol is associated with regional electroencephalogram synchronization. *Neuroscience* 147:833–841
- Wecker JR, Ison JR (1986) Effects of motor-activity on the elicitation and modification of the startle reflex in rats. *Anim Learn Behav* 14:287–292
- Wishaw IQ, Haun F, Kolb B (1999) Analysis of behavior in laboratory rodents. In: Windhorst U, Johansson H (eds) *Modern techniques in neuroscience*. Springer, Berlin, Germany, pp 1243–1275
- Youdim MB, Riederer PF (2004) A review of the mechanisms and role of monoamine oxidase inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology* 63:S32–S35
- Young GA (1988) Relationship between amphetamine-induced effects on EEG power spectra and motor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 30:489–492