

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Neurovědy



**Mgr. Lenka Kletečková**

*Význam NMDA antagonistů v animálních modelech ischemického  
poškození mozku a deprese*

*The importance of NMDA antagonists in animal models of ischemic injury and  
major depressive disease*

Dizertační práce

Vedoucí závěrečné práce / Školitel: RNDr. Karel Valeš, Ph.D.

Praha 2019

**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, 11. 2. 2019

Jméno a příjmení: Lenka Kletečková

Podpis:

## **Poděkování:**

V první řadě bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Karlu Valešovi Ph.D. za cenné odborné rady, trpělivost a lidský přístup, se kterým jsem se u něj setkala. Zároveň je pro mne ctí, že díky němu mohu pracovat na unikátních a zajímavých projektech. Děkuji samozřejmě i ostatním členům našeho týmu za inspirativní a přátelskou atmosféru.

Dále bych ráda poděkovala celému oddělení Neurofyziologie paměti Fyziologického ústavu AV ČR, kde jsem působila dlouhou dobu a kam se velmi ráda kdykoliv vracím. Zejména jsem vděčná prof. RNDr. Alešovi Stuchlíkovi, DrSc. za počáteční příležitost zde pracovat a paní Michaelae Radostné za ochotu a skvělý nápomocný laboratorní servis.

Mé díky patří i oddělení Vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR, obzvláště doc. PharmDr. Haně Kubové, DrSc. a Mgr. Grygoriyovi Tsenovovi Ph.D. za pomoc s odbornou metodikou a přínosné konzultace a také paní Blance Čejkové za ochotu a vždy bezchybnou laboratorní práci.

Současně bych chtěla poděkovat kolegyním z oddělení Steroidních inhibitorů Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR a kolegům z Centra biomedicínského výzkumu FN Hradec Králové za syntézu testovaných látek.

V neposlední řadě děkuji svému partnerovi, rodině a přátelům za obrovskou podporu a motivaci ke studiu a setrvání ve vědecké činnosti.

**Identifikační záznam:**

KLETEČKOVÁ, Lenka. *Význam NMDA antagonistů v animálních modelech poškození mozku a deprese. [The importance of NMDA antagonists in animal models of ischemic injury and major depressive disease]*. Praha, 2019. 105 stran, 4 přílohy. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Národní ústav duševního zdraví, Vedoucí práce Valeš, Karel.

# ABSTRAKT

Glutamatergní systém je hlavním excitačním systémem a glutamátové receptory jsou hojně exprimovány v celé nervové soustavě. Jejich nejrozšířenější typ N-methyl-D-aspartátové (NMDA) receptory jsou esenciální pro fyziologický vývoj nervové tkáně, synaptickou plasticitu a kognitivní procesy. Na druhou stranu nadměrná aktivace těchto receptorů vede k excitotoxickému poškození nervové tkáně a pozdějším velmi vážným neurologickým následkům na budoucí kvalitu života pacienta. Narušení glutamatergního systému je společným rysem pro hypoxicko-ischemické poškození, traumatické poranění, neurodegenerativní onemocnění i neuropsychiatrické choroby. Proto jsou glutamatergní systém a potažmo NMDA receptory atraktivním cílem současného neurofarmakologického výzkumu.

Předložená práce se zabývá různými typy molekul modulačně inhibujících NMDA receptor. Výzkum je zaměřen zejména aplikovaným směrem s cílem ohodnotit možný terapeutický potenciál studovaných látek. První skupinu látek představují neuroaktivní steroidy pregnanolon glutamát a pregnanolon hemipimelát inhibičně alostericky modulující NMDA receptor. U těchto molekul jsme s pomocí histologických a behaviorálních metod prokázali jejich neuroprotektivní efekt v hypoxicko-ischemickém a excitotoxickém poškození nervové tkáně. Druhou skupinou látek jsou takrin a jeho 7-methoxyderivát (7-MEOTA) inhibičně ovlivňující současně acetylcholin esterázu a NMDA receptor. Zde jsme popsali vysokou účinnost 7-MEOTA v animálním modelu excitotoxického poškození dorzálního hipokampu. Použitá molekula vykazovala silnější neuroprotektivní efekt než klinicky používaný memantin. Poslední částí studie tvoří zkoumání rychlého mechanismu účinku antagonisty NMDA receptoru ketaminu v modelu depresivního onemocnění, kde jsme popsali aktivaci signální dráhy mTOR po podání ketaminu a její propojení se stresovou reakcí organismu.

Jednotícím prvkem práce je glutamatergní systém hrající roli ve všech animálních modelech a zároveň NMDA receptor, který ovlivňují všechny studované molekuly. Testované látky prokázaly slibný neuroprotektivní potenciál využitelný v budoucnu v preklinických modelech onemocnění CNS spjatých s glutamatergním systémem.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** glutamatergní systém, NMDA receptor, excitotocita, neuroaktivní steroid, takrin, 7-MEOTA, ketamin, neuroprotektivní efekt

# ABSTRACT

Glutamatergic system is the main excitatory system and glutamatergic receptors are the most abundantly expressed in whole central nervous system. The most widespread type of glutamatergic receptors are N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors which are essential for physiological development of nervous tissue, synaptic plasticity and cognitive processes. On the other hand, over-activation of these receptors leads to excitotoxic damage of nervous tissue and serious neurological consequences for future quality of life. Disruption of glutamatergic system is common feature for hypoxic-ischemic damage, traumatic brain injury, neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. Therefore glutamatergic system and specifically NMDA receptors are an attractive target for neuropharmacological research.

Presented thesis explores the effect of several molecules with modulating inhibiting effect on NMDA receptor. Work is preferentially focused on application research; the main aim is evaluated therapeutic potential of studied compounds. First group of compounds is represented by neuroactive steroids pregnanolone glutamate and pregnanolone hemipimelate, which are allosteric inhibitors of NMDA receptor. Here, their neuroprotective effect is demonstrated in hypoxic-ischemic and excitotoxic damage of nervous tissue. Second group of molecules explore tacrine and its 7-methoxyderivative (7-MEOTA). Apart from NMDA action these molecules have simultaneously inhibitory effect on acetylcholine esterase. Here we describe high efficiency of 7-MEOTA in animal model of excitotoxic damage of dorsal hippocampus. Importantly 7-MEOTA shows stronger neuroprotective effect compared to clinically used memantine. The last part of study is a research of rapid antidepressant effect of NMDA receptor antagonist ketamine in the model of major depressive disease. We describe an activation of mTOR signal pathway following administration of ketamine and its connection with stress reaction of organism.

Together, present thesis shows a putative role of glutamatergic system in animal models of excitotoxicity, hypoxic-ischemic damage and major depressive disorder. We proved utility of varied compounds in neuroprotection – all act via NMDA receptor. Tested agents demonstrated a promising neuroprotective potential to be explored in preclinical models of CNS diseases associated with glutamatergic system.

**KEY WORDS:** glutamatergic system, NMDA receptor, excitotoxicity, neuroactive steroid, tacrine, 7-MEOTA, ketamine, neuroprotective effect

# SEZNAM ZKRATEK

3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenáza
7-MEOTA	7-methoxyderivát takrinu
AAPA	Aktivní alotetické vyhýbání se místu
ALBINO	Klinická zkouška: Efekt allopurinolu spolu s hypotermií na kognitivní následky v hypoxicko-ischemickém poranění mozku (angl. Effect of Allopurinol in addition to hypothermia for hypoxic-ischemic brain injury on neurocognitive outcome)
ALLO	Allopregnanolon
ALLOS	Allopregnanolon sulfát
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionát
ANOVA	Analýza variance
APP	Prekurzorový protein pro amyloid (z angl. amyloid precursor protein)
Asp	Aspartát
BDNF	Neurotrofický faktor odvozený od mozku (z angl. brain-derived neurotrophic factor)
CA1	Hipokampální oblast <i>cornu ammonis 1</i>
CA3	Hipokampální oblast <i>cornu ammonis 3</i>
CDX	$\beta$ -cyklodextrin
CNS	Centrální nervový systém
D-Asp	D-aspartát
D-cykloS	D-cykloserin
DG	Hipokampální oblast <i>gyrus dentatus</i>
DGh	Svrchní část <i>gyrus dentatus</i>
DGl	Spodní část <i>gyrus dentatus</i>
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteroin sulfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-Ser	D-serin
EPO	Erytropoetin
ET-1	Endothelin-1
E	Embryonální den
F	Hodnota testového kritéria
FJB	Histologické barvení FJB (z angl. Fluoro Jade B)
GABA	Kyselina $\gamma$ -aminomáselná
Gln	Glutamin
GLNT	Glutaminový transportér
Glu	Glutamát
Gly	Glycin
GSK3 $\beta$	Kináza glykogensyntázy 3 $\beta$ (z angl. glycogen synthase kinase-3 $\beta$ )
Hb	<i>Habenula</i>

HSP	z angl. heat shock protein
KAINTr	Kainátový receptor
KCC2	Chlorido-draselný transportér 2 (z angl. potassium-chloride transporter 2)
KYN	Kynurenin
KYNA	Kyselina kynureninová
LD	Laterodorzální thalamus
LTP	Dlouhodobá potenciace (z angl. long term potentiation)
MBP	z angl. myelin basic protein
MCAO	Okluze <i>arteria cerebri media</i> (z angl. middle cerebral artery occlusion)
MEM	Memantin
mGluRs	Metabotropní glutamátové receptory
MK-801	Dizocilpin maleát
mTOR	Signální dráha mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin)
mTORC1	Signální dráha mTOR komplex 1 (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1)
MWM	Morrisovo vodní bludiště
NaSSA	Noradrenergní a specifická serotoninergní antidepresiva
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMDAr	N-methyl-D-aspartátové receptory
OBX	Bilaterální olfaktorická bulbektomie
P450c17	17 $\alpha$ -hydroxyláza/17,20-lyáza
P450scc	Enzymatický komplex štěpící postranní řetězec cholesterolu
PA-hPim	Pregnanolon hemipimelát
PB	Fosfátový pufr
PBMCs	Periferní krevní mononukleární buňky
PBS	Fosfátový pufr obohacený o soli
PCP	Fencyklidin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Pregnanolon glutamát
PHS	Pregnanolon hemisukcinát
PLC	Fosfolipáza C
PREG	Pregnenolon
PREGS	Pregnenolon sulfát
PROG	Progesteron
PS	Pregnanolon sulfát
P	Postnatální den
QUIN	Kyselina chinolinová
RSC	Retrosplenální kortex
SARI	Antidepresiva se zdvojeným serotoninovým působením
SEM	Střední odchylka od průměru
SK K <sup>+</sup> kanál	Draslíkový kanál aktivovaný malou vodivostí vápníku (z angl. small conductance calcium-activated potassium channel)
SNRI	Inhibitor zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu



SSRI	Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu
THA	Takrin
THDOC	allotetrahydrodeoxykortikosteron
TM2	Transmembránový segment 2
Trp	Tryptofan
VGLUT	Vezikulární glutamátový transportér
VP	Ventroposterolaterální thalamická jádra

# OBSAH

1	ÚVOD.....	14
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	15
2.1	Glutamátergní systém v mozku.....	15
2.2	Metabotropní glutamátové receptory.....	15
2.3	Ionotropní glutamátové receptory.....	16
2.4	Odčerpávání a recyklace glutamátu.....	16
2.5	NMDA receptory.....	18
2.5.1	Struktura a aktivace NMDA receptoru.....	18
2.5.2	Farmakologické a přirozené způsoby modulace NMDA receptoru.....	19
2.5.3	Excitotoxicita a její farmakologické ovlivnění antagonisty NMDA receptoru.....	23
2.5.4	Glutamát a NMDA receptory ve vývoji.....	26
2.6	Neurosteroidy.....	28
2.6.1	Mechanismus působení neurosteroidů.....	29
2.6.2	Interakce neurosteroidů s NMDA receptory.....	29
2.6.3	GABA <sub>A</sub> receptor a jeho interakce s neurosteroidy.....	31
2.6.4	Fyziologický význam neurosteroidů u zralé nervové tkáně.....	32
2.6.5	Význam neurosteroidů ve vývoji nervové tkáně.....	33
2.6.6	Terapeutický potenciál neurosteroidů a neuroaktivních steroidů.....	34
2.6.7	Studované neuroaktivní steroidy pregnanolon glutamát a pregnanolon hemipimelát.....	35
2.7	Animální modely použité v práci.....	36
2.7.1	Animální modely deprese.....	36
2.7.2	Animální modely neuroprotektce.....	37
3	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY.....	39
3.1	Neuroprotektivní efekt podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů.....	39
3.1.1	Hypotéza:.....	39
3.1.2	Cíle práce:.....	39
3.2	Neuroprotektivní vliv pregnanolon hemipimelátu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu.....	40
3.2.1	Hypotéza:.....	40
3.2.2	Cíl práce:.....	40
3.3	Porovnání neuroprotektivního efektu takrinu, 7-metoxyderivátu takrinu a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu.....	41

3.3.1	Hypotéza:.....	41
3.3.2	Cíl práce:.....	41
3.4	Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR.....	42
3.4.1	Hypotéza:.....	42
3.4.2	Cíl práce:.....	42
4	MATERIÁL A METODY .....	43
4.1	Chemikálie a roztoky.....	43
4.1.1	3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamát a pregnanolon hemipimelát .....	43
4.1.2	THA, 7-MEOTA a memantin hydrochlorid .....	43
4.1.3	Ketamin .....	43
4.1.4	Rapamycin .....	43
4.1.5	Fosfátový pufr obohacený o soli (PBS) pro přípravu NMDA a endothelinu-1 ..	43
4.1.6	Roztok NMDA použitý pro indukci excitotoxické léze .....	44
4.1.7	Endotelin – 1 pro indukci fokálního ischemického poškození .....	44
4.1.8	Fosfátový pufr 0,2 M (PB).....	44
4.1.9	0,01 M PBS pro účely transkardiální perfuze .....	44
4.1.10	4% Paraformaldehyd (PFA) pro transkardiální perfuzi.....	44
4.1.11	Sacharóza .....	44
4.1.12	Pufr lýzující mononukleární krevní buňky po separaci médiem Ficoll-Paque Plus 44	
4.2	Zvířata.....	45
4.2.1	Experimenty na dospělých potkanech .....	45
4.2.2	Experimenty na mláďatech .....	45
4.3	Protokoly operací u použitých animálních modelů .....	45
4.3.1	NMDA léze dorzálního hipokampu .....	45
4.3.2	Fokální ischemie u mláďat P12 indukovaná intrahipokampální infuzí ET-1.....	46
4.3.3	Olfaktorická bulbektomie a následující časové uspořádání experimentu pro hodnocení aktivity mTOR.....	47
4.4	Transkardiální perfuze .....	48
4.5	Histologické zpracování tkáně .....	49
4.5.1	Fluoro Jade B .....	49
4.5.2	Skórování řezů s FJB.....	49
4.6	Morrisovo vodní bludiště.....	49
4.7	Molekulární metody .....	50

4.7.1	Izolace periferních krevních mononukleárních buněk pomocí média Ficoll-Paque Plus	50
4.7.2	ELISA pro analýzu aktivity mTOR	51
4.8	Analýza a statistické zpracování dat	51
4.8.1	Experiment 1 (Neuroprotektivní efekt PG)	51
4.8.2	Experiment 2 (Neuroprotektivní efekt PA-hPim)	52
4.8.3	Experiment 3 (Neuroprotektivní efekt THA, 7-MEOTA a memantinu)	52
4.8.4	Experiment 4 (Aktivace signální dráhy mTOR po podání ketaminu)	52
5	VÝSLEDKY	53
5.1	Neuroprotektivní efekt podání $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů	53
5.1.1	Vyloučení možného neurotoxického vlivu PG na nedospělou mozkovou tkáň	53
5.1.2	Prokázání neuroprotektivního účinku PG v animálním modelu fokální ischemie u potkaních mláďat	53
5.2	Neuroprotektivní vliv pregnanolon hemipimelátu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu	56
5.3	Porovnání neuroprotektivního efektu takrinu, 7-derivátu takrinu a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu	58
5.4	Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR	62
6	DISKUZE	63
6.1	Neuroprotektivní efekt podání $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů	63
6.2	Neuroprotektivní vliv PA-hPim v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu	68
6.3	Porovnání neuroprotektivního efektu THA, 7-MEOTA a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu	72
6.4	Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR	74
7	SOUHRN	78
7.1	Neuroprotektivní efekt $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů	78
7.2	Neuroprotektivní vliv pregnanolon hemipimelátu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu	78
7.3	Porovnání neuroprotektivního efektu takrinu, 7-metoxyderivátu takrinu a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu	78
7.4	Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR	79
8	SUMMARY	80

8.1	Neuroprotective effect of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats .....	80
8.2	Neuroprotective effect pregnanolone hemipimelate in the animal model of extensive excitotoxic damage of hippocampus .....	80
8.3	Comparison of neuroprotective effect of tacrine, 7-methoxyderivative of tacrine and memantine in the animal model of extensive excitotoxic damage of hippocampus .....	80
8.4	Antidepressant effects of ketamine in the model of olfactory bulbectomy and its connection with mTOR signal pathway.....	81
9	ZÁVĚR .....	82
10	LITERATURA .....	83
11	SEZNAM PUBLIKACÍ .....	103
12	PŘÍLOHY .....	105

# 1 ÚVOD

Neuropsychiatrická a neurodegenerativní onemocnění v současné společnosti představují stále významnější ekonomickou zátěž. Podle databázi World Health Organization více než miliarda světové populace trpí chorobami spjatými s centrální nervovou soustavou (CNS). Ačkoliv je současný výzkum velmi orientován na řešení této celosvětově důležité problematiky, stále nejsou známy příčiny vzniku těchto onemocnění a zároveň u některých případů chybí odpovídající terapeuticky účinné látky.

Glutamát, nepostradatelný pro fyziologické fungování organismu, je hlavním excitačním neurotransmiterem savců. Glutamátergní systém vyskytující se po celé nervové soustavě je tvořen metabotropními a ionotropními glutamátovými receptory zodpovídající za synaptický přenos odpovědi. Mezi ionotropní glutamátové receptory se řadí N-methyl-D-aspartátové receptory (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátové (AMPA) a kainátové. NMDA receptory jsou spjaty s procesy synaptické plasticity, paměti a učení. Na druhou stranu jejich nadměrná aktivace vede ke glutamátem indukované toxicitě a s tím souvisejícími budoucími zdravotními dopady. Proces excitotoxicity je společným rysem pro patologii ischemického infarktu nervové tkáně, traumatické poranění i neurodegenerativní choroby. Zejména pokud se jedná o ischemický infarkt v perinatálním období, následky excitotoxického poškození mohou být fatální v podobě epilepsie a neuropsychologických poruch vedoucí ke ztrátě kvality života v pozdějším věku. Zároveň s tím je třeba říci, že v oblasti neurodegenerativních onemocnění je situace řešení problematiky složitější z důvodu stárnutí populace. NMDA receptory jsou velice atraktivním cílem i díky objevu rychlého antidepresivního působení jednorázové aplikace ketaminu (antagonista NMDA receptoru). Jeho podání by mohlo pomoci překlenout dobu nástupu účinku „klasických“ antidepresiv. Výzkum v oblasti depresivní poruchy je pro společnost navíc podstatný z hlediska jejího výskytu v produktivním období života. Molekuly vážící se na NMDA receptory jsou tedy přední oblastí zájmu současného farmaceutického a medicínálního výzkumu.

Z tohoto důvodu se v dizertační práci věnujeme studiím popisující nové terapeutické přístupy ovlivnění NMDA receptoru. Popsané molekuly jsou zajímavé svým specifickým působením na receptor. První skupinou testovaných látek jsou neuroaktivní steroidy, které jsou syntetické analogy přírodně se vyskytujících neurosteroidů. Tyto látky na rozdíl od ostatních molekul se steroidním charakterem působí přímo na NMDA receptor, proto je jejich účinek rychlý a dobře cílený. Druhou skupinu látek jsou takrin a jeho 7-methoxyderivát, obě látky jsou reverzibilními inhibitory acetylcholin esterázy, později však byl popsán i jejich efekt na NMDA receptor. Výrazný terapeutický potenciál obou typů látek a jeho nedostatečné popsání je důvodem, proč jsme se na ně zaměřili. Poslední studovanou látkou je výše zmiňovaný ketamin jako modelová molekula za účelem pochopení mechanismů rychlého antidepresivního účinku látek ovlivňujících NMDA receptor.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Glutamátergní systém v mozku

Excitační působení glutamátu (Glu) v savčím mozku je známo od 50. let minulého století, v 70. letech byl Glu popsán jako hlavní excitační neurotransmitter pro CNS obratlovců. Glu je z hlediska životosprávy nejrozšířenější aminokyselinou, nicméně nebyl dosud prokázán žádný negativní vliv Glu obsaženého v potravě na nervovou tkáň. Tato aminokyselina vznikající transaminací  $\alpha$ -ketoglutarátu je podkladem pro přenos a zpracování informace. Presynapticky je Glu uskladněn ve váčcích v koncentraci až 20 mM spolu ionty  $Mg^{2+}$ , po jeho výlevu aktivuje postsynaptické glutamátové receptory na povrchu buňky a následně je ze synaptické štěrbině rychle odčerpáván transportéry pro excitační aminokyseliny. Z důvodu excitačního efektu Glu je esenciální držet jeho nízkou extracelulární koncentraci, proto jsou enzymy účastníci se jeho syntézy, degradace i transportu přítomné v neuronech i gliích v celé nervové soustavě. Narušení regulačního systému Glu má za následek jeho nadměrné uvolňování či nedostatečné odčerpávání, což vede k nadměrné aktivaci glutamátových receptorů a poté k odumírání nervových buněk. Tento proces je nazýván „excitotoxicita“ a bude v práci podrobně popsán a diskutován později (Curtis and Watkins 1960, Takagaki 1996)

Glutamátové receptory jsou hojně exprimovány v celém mozku i míše a to v primárně na neuronech, vyskytují se ovšem i na gliích, z hlediska lokalizace jsou zabudovány především postsynapticky, presynapticky, ale i extrasynapticky. Postupem času bylo objeveno velké množství receptorů vázajících Glu. Tato různorodost je způsobena charakterem molekuly Glu, která má vysokou flexibilitu dovolující za tělesné teploty několik energeticky výhodných konformací. Většina buněk v nervovém systému exprimuje alespoň jeden typ glutamátového receptoru, které dělíme do dvou hlavních skupin: metabotropní a ionotropní (Bridges, Stanley et al. 1991).

### 2.2 Metabotropní glutamátové receptory

Práce je zaměřena zejména na ionotropní NMDA receptory, nicméně je vhodné velmi stručně popsat metabotropní glutamátové receptory (mGluRs). Tyto receptory sdílejí běžnou molekulární topologii jiných receptorů spojených s G-proteiny. Mají sedm transmembránových domén s dlouhou extracelulární N-koncovou doménou a intracelulárně uloženou C-koncovou část. Jejich funkce spočívá v regulaci neurotransmise, excitability a přispívají k synaptické plasticitě (Lesage and Steckler 2010). mGluRs mají malou sekvenční homologii s jinými typy metabotropních receptorů a podle mechanismu přenosu signálu existují tři třídy těchto receptorů. Skupina I je exprimována na postsynaptické membráně, tyto receptory aktivují fosfolipázu C (PLC) přes  $G_q$  proteiny a následně produkují diacylglycerol a inositoltrifosfát. Kromě PLC mají mGluRs1 přímý vliv i na  $K^+$  a  $Ca^{2+}$  iontové kanály. Skupiny II a III, exprimovány presynapticky i postsynapticky, inhibují adenylcyklázu cestou  $G_i/G_o$ .

proteinů, jejich duální lokalizace jim zabezpečuje větší možnosti regulace glutamátového přenosu (Lesage and Steckler 2010).

### 2.3 Ionotropní glutamátové receptory

Všechny tři třídy ionotropních glutamátových receptorů patří do jedné genové rodiny, jsou to tetramery s vnitřním iontovým kanálem, který je součástí receptoru. Složení podjednotek určuje jejich biofyzikální vlastnosti a farmakologii. Rozdělujeme tři skupiny ionotropních glutamátových receptorů: NMDA, AMPA a kainátové receptory. AMPA a NMDA receptory (NMDAr) jsou v synapsích kolokalizovány, jejich vzájemný poměr je velmi variabilní. Tato práce je zaměřena primárně na NMDAr. Jejich struktura, způsob aktivace a farmakologie bude popsána v následujících kapitolách.

Po vazbě glutamátu na AMPA a NMDA receptory lze pozorovat smíšený excitační postsynaptický proud. První rychlejší složka s vyšší amplitudou je nesena AMPA receptory (AMPAr) zatímco druhá pomalejší složka s nižší amplitudou je nesena NMDAr. AMPAr jsou rychle aktivovány (časová konstanta 0,1 ms) a zároveň i rychle deaktivovány (časová konstanta 1,5 ms), skládají se ze čtyř různých podjednotek GluA1 – 4 do tetramerů, přičemž každá podjednotka obsahuje jedno vazebné místo pro glutamát. Iontový kanál AMPAr po jeho aktivaci vede primárně dovnitř tekoucí  $\text{Na}^+$  proud, který je vyvažován ven tekoucím  $\text{K}^+$  proudem. Výjimkou jsou AMPAr s modifikovanou GluA2 v astrocytech striata či hipokampu, které jsou permeabilní i pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$  (proces tzv. Q/R editingu); (Hollmann, Hartley et al. 1991, Higuchi, Single et al. 1993). Tato skutečnost je velmi důležitá pro buňky neobsahující NMDAr. AMPAr jsou posttranslačně regulovány fosforylací, která má vliv na aktivitu receptoru i jeho distribuci (Lee, Takamiya et al. 2003).

Posledním typem ionotropních glutamátových receptorů jsou receptory kainátové, které můžeme nalézt pre- i postsynapticky, avšak nejsou tak rozšířené jako AMPAr a NMDAr. Jejich propustnost pro  $\text{Ca}^{2+}$  je minimální a kinetika je pomalejší než v případě AMPAr. Účastní se zejména mechanismů plasticity.

### 2.4 Odčerpávání a recyklace glutamátu

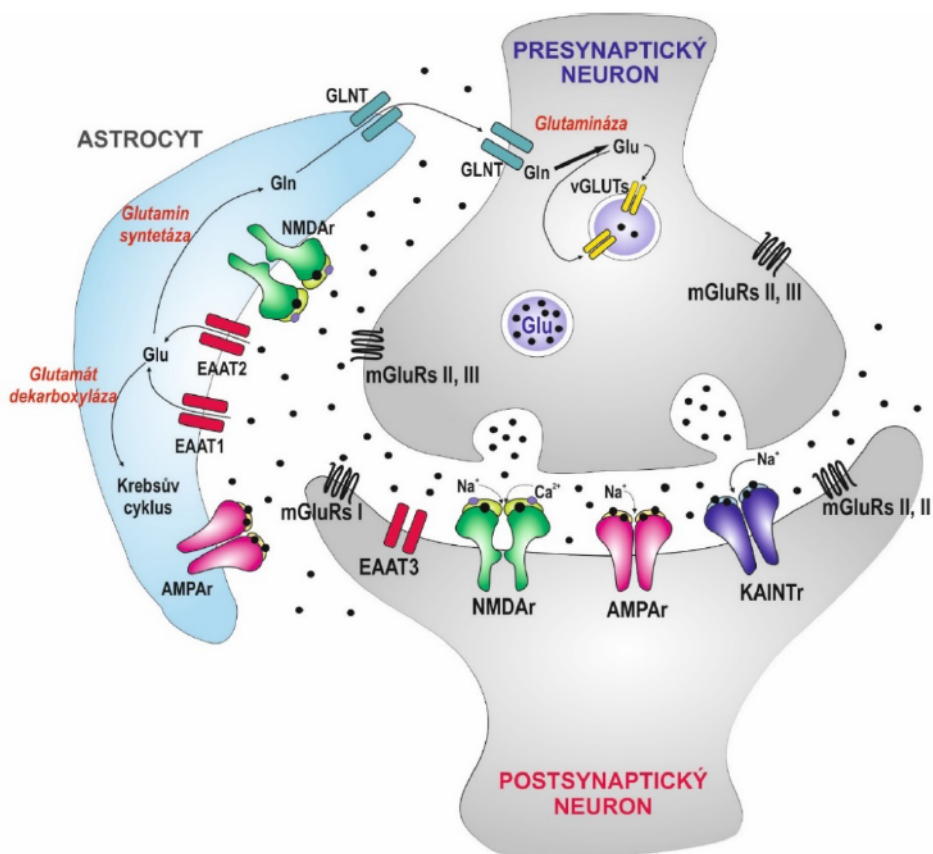
Jak již bylo řečeno efektivní a rychlé odčerpávání Glu je díky jeho excitabilitě esenciální pro fyziologickou činnost CNS. Při patologických stavech zvýšená koncentrace Glu vede excitotoxickému poškození nervové tkáně.

Glu je ze synaptické štěrbině odstraněn po jeho výlevu transportéry excitačních aminokyselin 1 - 5 (EAAT) uloženými v plasmatické membráně. Transport Glu zpět do buňky je elektrogenní a využívá hnací síly iontů, spolu s Glu jsou do buňky čerpány  $3\text{Na}^+$  a  $\text{H}^+$  a extracelulárního prostoru  $\text{K}^+$ . Transportér EAAT1 (též GLAST) selektivní pro astrocyty je exprimován napříč celou CNS, dále se vyskytuje také v retině a cirkumventrikulárních orgánech (Lehre, Davanger et al. 1997, Berger and Hediger 2000). EAAT2 (též GLT-1) je též



exprimován především v astrocytech a to s větší četností než EAAT1 (Danbolt, Storm-Mathisen et al. 1992). Bylo prokázáno, že EAAT2 odčerpává až 95% Glu v předním mozku, dále se nachází v hipokampu a mozečku (Danbolt, Storm-Mathisen et al. 1992, Haugeto, Ullensvang et al. 1996, Lehre and Danbolt 1998). EAAT3 je specifický neuronální transportér syntetizovaný napříč celou CNS neexprimovaný v gliích (Holmseth, Zhou et al. 2012). Nejvíce je přítomen v dendritech hipokampu a neokortexu. Transportér Glu EAAT4 je lokalizován především v Purkyňových buňkách mozečku (Dehnes, Chaudhry et al. 1998). Posledním transportérem Glu je EAAT5 vyskytující se převážně v retině (Arriza, Eliasof et al. 1997). Z cytoplasmy je Glu transportován do synaptických váčků pomocí vezikulárních glutamátových transportérů (VGLUTs).

Recyklaci odčerpaného Glu zajišťuje glutamát-glutaminový cyklus probíhající mezi astrocyty a neurony. V astrocytech je Glu konvertován ATP-dependetní cestou na glutamin pomocí glutaminsyntetázy (Erecinska and Silver 1990). Vzniklý glutamin je přenesen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -dependentní pumpou do extracelulárního prostoru a následně vychytáván nervovým zakončením neuronu. Poté je glutamin přeměněn zpět na funkční Glu uskladněný v synaptických váčcích. Glutamátergní systém v mozku spolu s jeho odčerpáváním je znázorněn na obr. 2.4.



**Obr. 2.4:** Schématické souhrnné znázornění tripartitní glutamátergní synapse. Gln – glutamin, Glu – glutamát, mGluRs – metabotropní glutamátové receptory, GLNT – glutaminový transportér, EAAT – transportér pro excitační aminokyseliny, NMDAr – NMDA receptory, AMPAr – AMPA receptory, KAINTr – kainátové receptory. Převzato a upraveno podle (Rubio, Drummond et al. 2012).

## 2.5 NMDA receptory

NMDAr jsou nejrozšířenějšími receptory v mozku, jejich význam pro fyziologickou funkci organismů je esenciální. Klíčové jsou zejména pro synaptickou plasticitu, procesy spojené s pamětí a učením, správný vývoj organismu atd. Z hlediska synaptické plasticity se NMDAr podílejí na indukci dlouhodobé potenciace (LTP) nejen v hipokampu, kde vtok  $\text{Ca}^{2+}$  vede aktivaci signálních drah souvisejících s posílením přenosu mezi zúčastněnými neurony. Na druhé straně jejich nadměrná aktivace vedoucí k excitotoxickému poškození nervové tkáně je společným rysem při ischemickém mozkovém infarktu, traumatickém poranění, neurodegenerativních i psychiatrických onemocněních. Z tohoto důvodu jsou již několik desetiletí jedním z předních témat výzkumu neurofarmakologie. Terapeutické využití farmak ovlivňujících NMDAr má značné limitace. Především z toho důvodu, že látky interagující s NMDAr mohou působit i v nepostížených oblastech mozku a narušit tak fyziologické procesy spojené s NMDAr.

### 2.5.1 Struktura a aktivace NMDA receptoru

Z hlediska struktury jsou NMDAr heterotetramerní iontové kanály složené ze tří typů podjednotek GluN1, GluN2 a GluN3. Všechny tyto podjednotky existují ve více formách, GluN1 má 8 různých izoform, GluN2 se vyskytuje ve variantách A až D a GluN3 podjednotka nabývá dvou variant GluN3A či GluN3B (Monyer, Sprengel et al. 1992). Všechny podjednotky mají shodnou topologii, extracelulárně se vyskytující N-terminální část spolu s ligand-vázací doménou, 4 transmembránové segmenty a intracelulární C-terminální část. Podjednotkové složení určuje farmakologické vlastnosti NMDAr. Aby byl NMDAr funkční, musí obsahovat nejméně jednu GluN1 podjednotku. Nejčastěji se vyskytují receptory složené z dvou GluN1 podjednotek obsahujících vazebné místo pro Gly a dvou GluN2 podjednotek obsahujících vazebné místo pro Glu (Traynelis, Wollmuth et al. 2010).

Iontový kanál NMDAr formovaný intracelulárním pohyblivým transmembránovým segmentem 2 je během klidového membránového potenciálu blokován ionty  $\text{Mg}^{2+}$  (Ruppersberg, Kitzing et al. 1994). Pro aktivaci receptoru a následné otevření iontového kanálu je za potřeby dodržet dvě podmínky. První z nich je depolarizace membrány a druhou navázání koagonistů tj. dvou molekul Glu na GluN2 či GluN3 podjednotky a dvou molekul Gly na GluN1 podjednotky (Kleckner and Dingledine 1988, Clements and Westbrook 1991). Iontový kanál NMDAr po aktivaci má vysokou permeabilitu pro  $\text{Ca}^{2+}$ , který po vtoku do buňky působí na celou řadu signálních kaskád. Dále NMDAr protékají ven ionty  $\text{K}^+$  a  $\text{Na}^+$ . NMDAr může být dále aktivován aspartátem (Asp) namísto Glu a D-serinem (D-Ser) místo Gly (Johnson and Ascher 1992, Gunderson, Chaudhry et al. 1998). Dále může jako koagonista místo Glu sloužit i D-Asp (Errico, Nistico et al. 2008). Nahrazení Glu je možno také sírou obsahujícími analogy Glu a Asp (L-homocysteinová kyselina, L-homocysteinsulfonová kyselina, L-cysteinová kyselina, L-cysteinsulfonová kyselina) a endogenní dipeptid N-acetyl-aspartyl-glutamát (NAAG) (Thompson and Kilpatrick 1996). NAAG je agonistou NMDAr v *nucleus geniculatus lateralis* a především selektivním agonistou mGluR skupiny III (Harata, Katayama et al. 1999).

Pravděpodobnost otevření iontového kanálu NMDAr je modulována mimo jiné cholesterolem obsaženým v plasmatické membráně. Na buněčné kultuře mozečku bylo prokázáno, že minimalizované množství cholesterolu vede k redukci odpovědi zprostředkovaných NMDAr, jeho zvýšené desenzitizaci a snížené pravděpodobnosti otevření iontového kanálu receptoru. Na druhou stranu obohacení prostředí o cholesterol má za následek potenciaci odpovědi NMDAr. Tyto efekty nebyly pozorovány na AMPA či kainátových receptorech. Zdá se tedy, že interakce lipidů s NMDAr má velký význam pro jeho funkci (Korinek, Vyklicky et al. 2015). Pro regulaci internalizace NMDAr do plasmatické membrány jsou zásadní posttranslační modifikace, mezi které patří N-glykosylace. Tento proces probíhající v endoplasmatickém retikulu vyúsťuje v specifické připojení řetězců glykanů na aminokyselinu Asn. Pro podjednotku GluN1 je esenciální N-glykosylace na Asn 203 a Asn 368, bez nich NMDAr neopustí plasmatické retikulum a nedojde tak k jeho zabudování na povrch buňky (Lichnerova, Kaniakova et al. 2015). V současné době byly popsány 3 glykosylační místa na podjednotce GluN3A (Asn 145, Asn 264, Ans 275). N-glykosylace na NMDAr jsou zásadní pro jeho uvolnění z endoplasmatického retikula a následnou internalizaci do plasmatické membrány (Skrenkova, Lee et al. 2018). Ovlivnění posttranslačních modifikací NMDAr může představovat důležitý bod pro regulaci neurotransmise.

### **2.5.2 Farmakologické a přirozené způsoby modulace NMDA receptoru**

NMDAr může být farmakologicky modulován celou řadou látek na vazebných místech pro agonisty Glu a Gly, dále blokátory kanálu obsazujícími vazebné místo pro  $Mg^{2+}$  (např. ketamin a dizocilpin), existují též látky se specifickou interakcí pouze pro určité podjednotky. Navíc se na NMDAr nacházejí vazebná místa pro jeho přirozené modulátory  $Zn^{2+}$ , polyaminy, metabolity kynureninové dráhy, neurosteroidy atd. Díky existenci takto velkého množství alosterických míst pro agonisty i antagonisty je zde velký potenciál pro farmakologické zásahy přirozeně se vyskytujícími i syntetizovanými látkami. Kompetitivní antagonisté NMDAr a antagonisté glycinového vazebného místa budou vzhledem k jejich možnostem ovlivnit excitotoxické poškození popsány v pozdější podkapitole. Možnosti modulace NMDAr shrnuje obr. 2.5.

Jedním z mnoha přirozených modulátorů NMDAr jsou neurosteroidy. Studium neuroprotektivních vlastností neuroaktivních steroidů tvoří významnou část této práce, proto budou neurosteroidy a neuroaktivní steroidy popsány dále v samostatné kapitole.

#### **2.5.2.1 Nonkompetitivní antagonisté**

Nonkompetitivní antagonisté jsou látky z pravidla mimikující účinek  $Mg^{2+}$  uvnitř iontového kanálu, po depolarizaci však stále setrvávají na svém místě, jsou tudíž jeho blokátory efektivní při jakékoli koncentraci agonisty. Mezi nejznámějšími nonkompetitivními antagonisty patří disociativní anestetikum ketamin, dále látky fencyklidin (PCP) a dizocilpin maleát (MK-801).

Ketamin je využit ve veterinárně a v pediatrii jako anestetikum, nicméně jeho použití je limitováno následnými psychotomimetickými stavy (Krystal, Karper et al. 1994). Obdobný vedlejší účinek v zesílené formě následuje i po požití PCP. Na druhou stranu je třeba zmínit antidepresivní efekt subanestetické dávky ketaminu, který byl na základě animálních i klinických studií prokázán (Zarate, Singh et al. 2006). K nástupu antidepresivního působení ketaminu dochází velmi rychle na rozdíl od klasických antidepresiv. Použití ketaminu při léčbě depresivní poruchy tedy představuje nový způsob řešení akutních sebevražedných stavů pacientů. V roce 2010 byla publikována práce Li et al. popisující vliv ketaminu na signální dráhu mTOR (z angl. mammalian target of rapamycin); (Li, Lee et al. 2010).

Z hlediska animálních studií je široce využívaná látka MK-801, stejně jako PCP a ketamin je blokátorem kanálu NMDAr. Tato molekula významně redukuje ischemické poškození nervové tkáně, nicméně její použití v klinické praxi je nepřijatelné díky vážným vedlejším účinkům v podobě psychotomimetických projevů (Gill, Foster et al. 1987, Chi, Anwar et al. 1991). U zvířat podání MK-801 vede k indukci zvýšené lokomoce, hyperaktivity, při vyšších dávkách k poruchám koordinace, stereotypickému chování, dále také kognitivnímu deficitu (Andine, Widermark et al. 1999, van der Staay, Rutten et al. 2011, Kubik, Buchtova et al. 2014). Aplikace MK-801 u potkana je proto relevantním animálním modelem psychózy. Mezi nonkompetitivní antagonisty patří i látky ovlivňující pouze určité podjednotky např. ifenprodil preferenčně inhibující GluN2B podjednotku na aktivovaných NMDAr.

#### 2.5.2.2 *Unkompetitivní antagonist memantin*

Antagonisté, schopní se na receptor navázat pouze při jeho určitém konformačním stavu, se nazývají unkompetitivní. Jejich vazba většinou bývá podmíněna předchozí vazbou agonisty na receptor a jeho následnou aktivací. Z těchto důvodů unkompetitivní antagonisté mají nejsilnější účinek v místech s největší koncentrací agonisty, v případě NMDAr v oblastech s vysokou koncentrací Glu. Díky tomu se z farmaceutického hlediska jeví jako potenciálně ideální terapeutické látky. Nejznámějším zástupcem unkompetitivních antagonistů NMDAr je memantin. Tato látka prokázala své neuroprotektivní vlastnosti v mnoha animálních i klinických studiích (Orgogozo, Rigaud et al. 2002, Reisberg, Doody et al. 2003). V současné době se memantin používá k léčbě Alzheimerovy choroby (Gauthier, Loft et al. 2008). Obvykle je pacienty dobře tolerován, nicméně byly popsány i případy halucinací po léčbě touto látkou u pacientů s korovou demencí s Lewyho tělísky (Mathys, McCarrell et al. 2013).

#### 2.5.2.3 *Zinek*

Zn<sup>2+</sup> je inhibiční modulátor GluN2 podjednotky NMDAr, jeho přirozená homeostáza je esenciální pro správnou funkci organismu a jeho nedostatečnost je asociována se zhoršenou kognicí a paměťovými deficity, změnou chování, depresí atd (Peters, Koh et al. 1987, Christine and Choi 1990). Byly prokázány korelace mezi prenatální deficiencí Zn a snížením objemu mozku u hlodavců, zhoršenou proliferací a zvýšeným rizikem vzniku schizofrenie (Dvergsten, Fosmire et al. 1983, Dvergsten, Fosmire et al. 1984, Dvergsten, Johnson et al. 1984, Grabrucker, Rowan et al. 2011). Dále mnoho studií na zaměřených na depresivní poruchu

popsalo snížení koncentrace Zn v séru pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami (Swardfager, Herrmann et al. 2013). Následně bylo zjištěno, že doplnění Zn vede ke zlepšení psychického stavu u resistantních pacientů, což potvrdilo jeho antidepresivní působení stejně jako u jiných látek ovlivňujících NMDAr např. ketamin (Nowak, Siwek et al. 2003, Siwek, Dudek et al. 2009). Zn také hraje významnou roli v patogenezi Alzheimerovy choroby. Zinek-obsahující metaloproteázy jsou nezbytné pro enzymatické neamyloidogenní zpracování prekursorového proteinu pro amyloid (APP) (Kuhn, Wang et al. 2010). Zároveň za patologických podmínek je  $Zn^{2+}$  akumulován a vede k exitototoxickému poškození (Inoue, Branigan et al. 2010).

#### 2.5.2.4 *Metabolity kynureninové dráhy*

NMDAr jsou dále významně modulovány produkty kynureninové dráhy metabolizující aminokyselinu tryptofan (Trp). Enzymy účastnící se kynureninové dráhy jsou přítomné v periferním i centrálním nervovém systému. Přibližně 99% Trp, který není využitý k syntéze proteinů, je metabolizováno touto drahou, jejími produkty poté jsou kyselina chinolinová (QUIN), kynurenin (KYN), kyselina kynurenová (KYNA) a další.

QUIN je silně neurotoxická látka s prooxidativními vlastnostmi produkovaná aktivovanými mikroglie a makrofágy zejména během zánětlivého procesu (Pemberton, Kerr et al. 1997, Chiarugi, Meli et al. 2001). Po jejím uvolnění z mikroglie působí jako agonista NMDAr, zejména receptory v hipokampu, striatu a neokortexu jsou na QUIN hodně senzitivní (Orlando, Alsdorf et al. 2001, Pittaluga, Pattarini et al. 2001, Kumar 2004). Krom NMDAr QUIN negativně ovlivňuje odčerpávání Glu astrocyty a inhibuje astroglální glutaminytétázu (Tavares, Tasca et al. 2000, Tavares, Tasca et al. 2002). Dále byla popsána kolokalizace QUIN s hyperfosforylovaným tau proteinem v mozcích pacientů s Alzheimerovým onemocněním (Guillemin, Brew et al. 2005, Rahman, Ting et al. 2009). Vzhledem k prokázanému spojení mezi NMDAr a schizofrenií není překvapivý nález zvýšené hladiny QUIN v plasmě pacientů s touto chorobou (Ravikumar, Deepadevi et al. 2000).

KYNA působí jako antagonist NMDAr na vazebném místě pro Gly (Kessler, Terramani et al. 1989). S patogenezi schizofrenie je spojována i zvýšená hladina KYNA v mozkomíšním moku, Brodmanově aree 9 a předním cingulu pacientů (Schwarcz, Rassoulpour et al. 2001, Miller, Llenos et al. 2006). Inhibice NMDAr způsobená vysokou produkcí KYNA může negativně ovlivnit glutamátergí transmissi, což může vyústit až v manifestaci příznaků schizofrenie. Dysregulace kynureninové dráhy byla dále popsána u pacientů s depresivní poruchou, kde byly nalezeny zvýšené koncentrace QUIN a snížené koncentrace KYNA v cerebrospinálním moku (Bay-Richter, Linderholm et al. 2015, Savitz, Drevets et al. 2015).

#### 2.5.2.5 *Polyaminy*

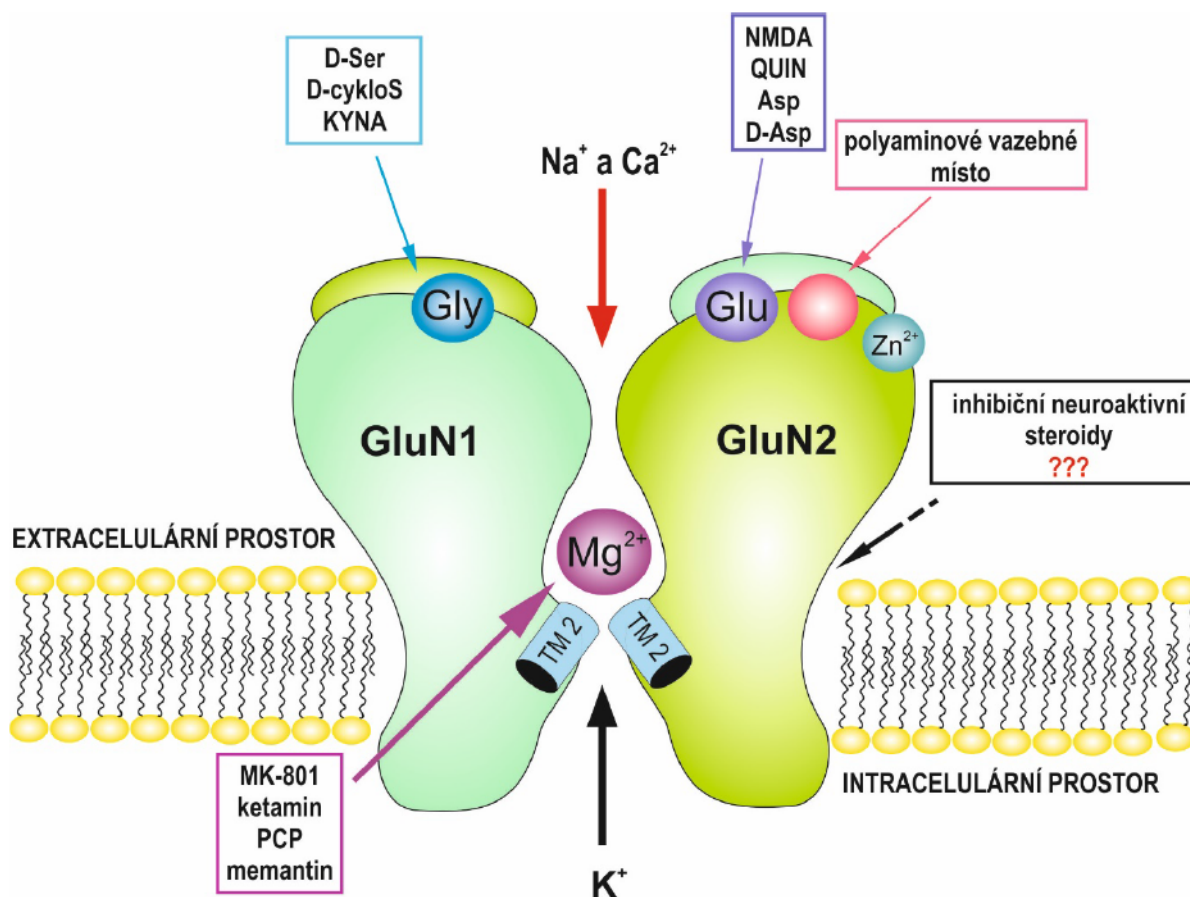
Polyaminy spermin a spermidin vznikající dekarboxylací L-ornithinu a jeho následnou transformací NMDAr ovlivňují navázáním na polyaminové vazebné místo. Efekt sperminu na

NMDAr obsahující GluN2B podjednotku je stimulační a vede k zlepšení kognitivních procesů učení a paměti (Rubin, Boemo et al. 2000, Berlese, Sauzem et al. 2005). Bylo prokázáno, že nízké intrahipokampální dávky spermidinu zlepšují konsolidaci paměti. Tento účinek může být zablokován aplikací arcainu, který je kompetitivním antagonistou polyaminového vazebného místa (Reynolds 1990, Rubin, Boemo et al. 2000).

#### 2.5.2.6 Aminokyseliny a jejich deriváty

Výše bylo popsáno, že NMDAr může být aktivován i jinými aminokyselinami než Glu a Gly a to konkrétně Asp, D-Asp a D-Ser. Asp namísto Glu může být koagonistou NMDAr v oblasti suprachiasmatických jader u potkana. Studie probíhala na koronárních řezech za použití metody terčíkového zámku celé buňky (Brautigian and Eagles 1998).

Zjištění, že NMDAr může být aktivován i D-formami aminokyselin (D-Asp a D-Ser) bylo ve své době velmi překvapivé, jelikož panoval všeobecný názor, že D-formy se přirozeně nevyskytují. Později bylo objeveno, že tyto konkrétní D-formy syntetizují aspartát-racemáza a serin-racemáza. D-Asp se vyskytuje převážně neonatálně v subventrikulární zóně a hipokampu. V dospělosti přetrvává v *gyrus dentatus* hipokampu, kde se podílí na procesech spojených s neurogenézí. Deplece aspartát racemázy u dospělých myší vede k defektům v neurogenезi, což naznačuje zapojení D-Asp v její regulaci (Kim, Duan et al. 2010). D-Ser byl zaznamenán především v kortexu, hipokampu, striatu, středním mozku, mozečku a míše, jeho rozšíření kopíruje výskyt NMDAr (Hashimoto, Nishikawa et al. 1992, Hashimoto, Kumashiro et al. 1993, Hashimoto, Oka et al. 1995). Mozek obsahuje až 1/3 D-Ser z celkového množství Ser. V supraoptickém jádře hypothalamu je hlavním koagonistou NMDAr (Hashimoto, Nishikawa et al. 1992, Panatier, Theodosis et al. 2006). Přidání rekombinantní oxidázy D-aminokyselin (enzym degradující D-formy aminokyselin) došlo k inhibici většiny odpovědí zprostředkovaných NMDAr. Práce Shleper et al. ukazuje nesporný význam D-Ser v neurotoxickém poškození vyvolaném nadměrnou aktivací NMDAr. Studie na organotypických řezech hipokampu prokázala, že odstranění D-Ser vyústí v téměř úplnou redukci neuronálního poškození vyvolaného NMDAr. V použitém modelu byl tedy D-Ser dominantním a nezbytným koagonistou NMDAr namísto Gly (Shleper, Kartvelishvily et al. 2005). Dalšími nálezy potvrzující důležitost D-Ser je jeho zvýšená hladina v cerebrospinálním moku u pacientů s Alzheimerovou chorobou a naopak jeho snížená hladina u pacientů se schizofrenií (Labrie, Wong et al. 2012, Madeira, Lourenco et al. 2015). D-Ser je zároveň prekurzorem pro syntézu D-cykloserinu (D-cykloS), který byl v minulosti používán jako antituberkotikum. Krom jeho hlavního mechanismu účinku na alanin-racemázu a D-alanin-ligázu byl popsán jeho účinek na NMDAr, kde je parciálním agonistou vazebného místa pro Gly. D-cykloS zvyšuje odpověď NMDAr na endogenní Glu bez toho aniž by ho aktivoval (Thomas, Hood et al. 1988). Podání D-cykloS by tak mohlo být využito u neuropsychiatrických onemocnění. U pacientů se schizofrenií aplikace D-cykloS vedla k významné redukci negativních příznaků nemoci a zlepšení výsledků kognitivních testů (Goff 2017).



**Obr. 2.5:** Schématické znázornění farmakologického a přirozeného ovlivnění NMDAr. Molekuly D-Ser, D-cykloS a KYNA se váží na vazebné místo pro Gly, zatímco NMDA, QUIN, Asp a D-Asp se váží na vazebné místo pro Glu. Vnitřek iontového kanálu formovaný TM2 je za klidového membránového potenciálu obsazen  $Mg^{2+}$ , farmakologicky může být pak ovlivněn látkami MK-801, ketaminem, PCP a memantinem. Vazebné místo pro inhibiční neurosteroidy není dosud známo, je zde však předpokládána úloha membrány a membránových oblastí NMDAr. Asp – aspartát, D-Asp – D-aspartát, D-Ser – D-serin, D-cykloS – D-cykloserin, Gly – glycin, Glu – glutamát, KYNA – kyselina kynurenová, NMDA – N-methyl-D-aspartát, PCP – fencyklidin, QUIN – kyselina chinolinová, TM 2 – transmembránový segment 2. Převzato a upraveno z (Paoletti and Neyton 2007).

### 2.5.3 Excitotoxicita a její farmakologické ovlivnění antagonisty NMDA receptoru

Excitotoxicita je specifický typ poškození nervové tkáně zprostředkovaný glutamátem. Fenomén excitotoxicity popsal prof. Olney et al. v 70. letech minulého století (Olney 1971). Jeho hypotéza byla podpořena zjištěním, že i analogy Glu působící excitačně a neurotoxicky. Bylo prokázáno, že látka NMDA vede k silnému vtoku vápníku do buňky a zároveň rozsáhlému excitotoxickému poškození (Berdichevsky, Riveros et al. 1983). Tento typ poškození je společným jmenovatelem pro mnoho patologických stavů nervového systému, vyskytuje se například u ischemického infarktu, traumatického poranění či neurodegenerativních onemocnění. Všechny výše vyjmenované podmínky vedou k narušení membránového

potenciálu, hromadění extracelulárního  $K^+$ , následné depolarizaci a uvolnění velkého množství Glu do extracelulárního prostoru. Glu poté tonicky aktivuje NMDAr v extracelulárním prostoru. Jelikož není energie na jeho odčerpání ze synaptického prostoru. Skrz nadměrně aktivované NMDAr poté do buňky proudí enormní množství  $Ca^{2+}$ . Získaný vápník poté spouští další výlev vápenatých iontů z buněčných organel a následnou buněčnou smrt pomocí apoptózy či nekrózy. S procesem excitotoxicity je dále spojen oxidační stres, laktátová acidóza, zánětlivá reakce a neurodegenerativní změny v postižené oblasti mozku. Přispění synaptických a extrasynaptických NMDAr receptorů k výslednému poškození záleží na lokalizaci látky působící excitotoxické poškození (Sattler, Xiong et al. 2000). Jelikož excitotoxicita přímo souvisí s NMDAr, stává se tak atraktivním cílem farmakologického výzkumu. V klinických zkouškách bylo testováno již několik látek ovlivňujících NMDAr např. midafotel, selfotel, gavestinel, aptiganel, remacemid atd.

#### *2.5.3.1 Kompetitivní antagonisté NMDAr z pohledu excitotoxického poškození*

Kompetitivní antagonisté NMDAr jsou látky vázající se na vazebné místo pro Glu. Jejich potenciální terapeutický účinek je v oblastech s excitotoxickým poškozením značně limitován díky vytěsňováním dané látky samotným Glu. I přes tuto komplikaci v minulosti byly tyto látky zkoumány jako možná neuroprotektivní léčiva. Nejznámějšími kompetitivními antagonisty testovanými v klinických zkouškách byly midafotel a selfotel (GSC 19755).

V animálních modelech se selfotel jevil velmi nadějně, nicméně jeho podání pacientům v klinické studii neprokázalo žádné signifikantní účinky ve srovnání s placebem. Naopak pacienti vykazovali vyšší mortalitu. Zároveň byly popsány i jiné nežádoucí účinky ve formě paranoidních reakcí a halucinací (Grotta, Clark et al. 1995, Davis, Albers et al. 1997).

Krom antagonistů vazebného místa pro Glu existují pochopitelně i antagonisté vazebného místa pro Gly. Mezi antagonisty glycinového vazebného místa na NMDAr testované v klinických zkouškách patří licostinel a gavestinel. Obě látky byly organismem dobře tolerované, bez vážných psychotomimetických efektů. Licostinel však neprokázal žádný signifikantní neuroprotektivní efekt ve srovnání s placebem, navzdory tomu, že byla použita dávka srovnatelná s animálními modely (Albers, Clark et al. 1999). Také gavestinel v klinické zkoušce v roce 2006 nepotvrdil neuroprotektivní působení na redukci objemu ischemického ložiska měřeného pomocí MRI (Warach, Kaufman et al. 2006).

#### *2.5.3.2 Nonkompetitivní antagonisté NMDAr z pohledu excitotoxického poškození*

Nonkompetitivní antagonisté NMDAr např. ketamin, PCP a MK-801 byly účinní v mnoha animálních modelech ischemického poškození, ale díky již zmíněným vedlejším účinkům je jejich použití humánní medicíně nemožné. Dalším nonkompetitivním antagonistou NMDAr testovaný v léčbě ischemie byl aptiganel, který navzdory slibným výsledkům z animálních studií v klinických zkouškách zhoršil mortalitu experimentálních pacientů oproti placebo (Albers, Goldstein et al. 2001). Podání atiganelu také vedlo k nežádoucím účinkům v podobě hypertenze, ventrikulární arytmie, edému a zmatenosti.



Remacemid je nonkompetitivní antagonist s nízkou afinitou k NMDAr úspěšný v *in vivo* testech. Při klinické zkoušce u pacientů s hypoxicko / ischemickým poškozením však bylo objeveno, že je nemožné dosáhnout a udržet neuroprotektivní koncentraci molekuly v mozku známou z animálních modelů v horizontu několik hodin po jeho podání (Dyker and Lees 1999).

#### 2.5.3.3 *Inhibitory GluN2B podjednotky*

Molekulárními experimenty bylo prokázáno, že aktivaci GluN2B obsahujících extrasynaptických NMDAr dochází k stimulaci signálních drah spojených s buněčnou smrtí (Martel, Ryan et al. 2012). Z tohoto důvodu byly vyvinuty látky selektivně inhibující pouze NMDAr s GluN2B podjednotkou, které jsou efektivní při experimentech *in vitro* i *in vivo*. Tyto látky zároveň nevykazují běžné vedlejší účinky některých antagonistů NMDAr. Prvně objevený selektivním GluN2B NMDAr antagonistou byl ifenprodil, jeho deriváty eliprodil a traxoprodil postoupili až do klinických zkoušek. V případě eliprodilu nedošlo k potvrzení signifikantního neuroprotektivního efektu (Lees 1997). Traxoprodil též svůj neuroprotektivní vliv nepotvrdil (Merchant, Bullock et al. 1999). V současné době se však diskutuje o jeho rychlém antidepresivním působení, podobně jako u ketaminu (Poleszak, Stasiuk et al. 2016).

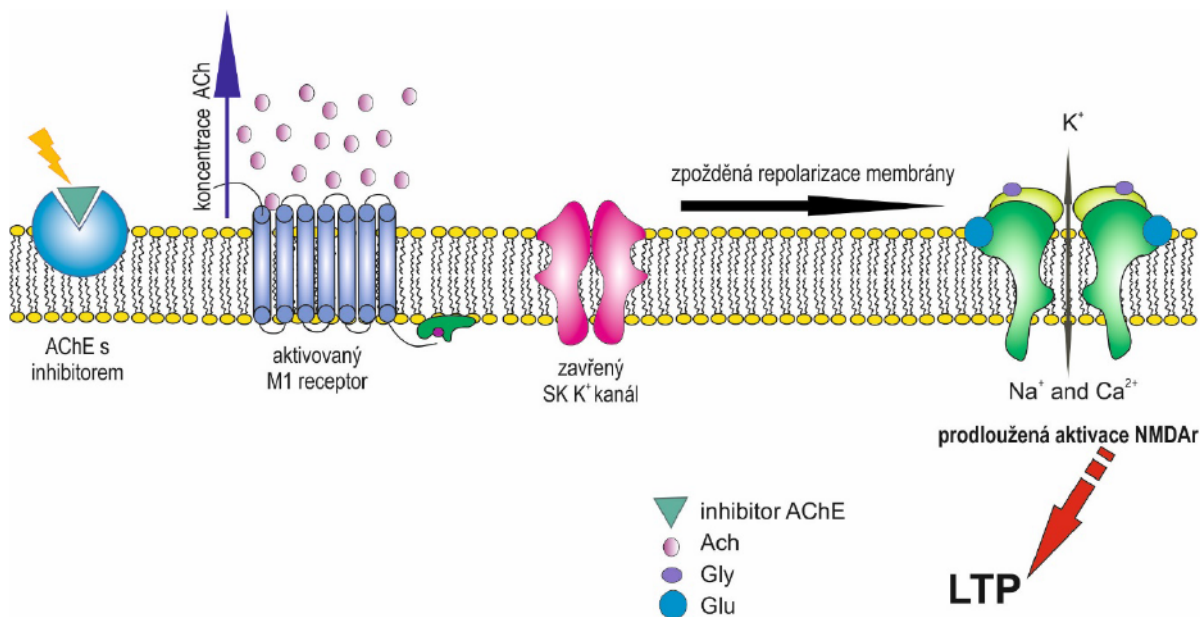
Závěrem je třeba říci, že nedostatečná úspěšnost NMDAr antagonistů při klinických zkouškách je multifaktoriálního charakteru. První příčinou jsou nepřijatelné vedlejší efekty a druhou je pravděpodobně krátké terapeutické okno pro podání těchto látek.

#### 2.5.3.4 *Látky kombinující působení na NMDAr s jinými neurotransmiterovými systémy*

Z pohledu současného farmakologického výzkumu jsou velmi zajímavým tématem molekuly kombinující současné ovlivnění více receptorových systémů. Jako jejich příklad uvedu takrin a jeho 7-methoxyderivát (7-MEOTA), jelikož předložená práce se z části zabývá i jejich neuroprotektivním potenciálem. Takrin (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin; THA) je reversibilní inhibitor acetylcholinesterázy (Freeman and Dawson 1991, Davis and Powchik 1995). Ve vysoké koncentraci THA dále působí na adenosinové receptory a blokuje iontové kanály pro  $Ca^{2+}$  (Wagstaff and McTavish 1994). Později byl dokázán i jeho přímý inhibiční efekt na NMDAr redukcí excitotoxicity způsobené aktivací NMDAr v myši kultuře (Davenport, Monyer et al. 1988). Místo navázání THA na NMDAr je pravděpodobně lokalizováno velmi blízko vstupu do iontového kanálu. Dále byl popsán nepřímý vliv THA na NMDAr spočívající v inhibičním působení THA na acetylcholinesterázu. Při zvýšené koncentraci acetylcholinu jsou aktivovány M1 acetylcholinové receptory a inhibovány  $Ca^{2+}$ -dependentní draslíkové kanály, což vede k depolarizaci membrány a následné aktivaci NMDAr (Horak, Holubova et al. 2017). Tento nepřímý vliv THA na NMDAr je znázorněn na obr. 2.5.3.4.

THA byl prvním použitým léčivem v terapii Alzheimerovy choroby. Cholinergní systém bývá u tohoto onemocnění poškozen jako první a zároveň se zde vyskytuje excitotoxické poškození. Z tohoto důvodu byl zkoumán potenciálně neuroprotektivní vliv THA na toto neurodegenerativní onemocnění. Díky komplexnímu účinku THA tak byly popsány efekty

netypické pro běžné inhibitory cholinesteráz. Konkrétně bylo zaznamenáno zvýšení krevního průtoku v mozku u pacientů s Alzheimerovým onemocněním a snížení sekrece prekurzorového proteinu pro amyloid  $\beta$  (Lahiri 1994, Harkins, Taylor et al. 1997). Nicméně velmi krátce na to byl THA z farmakologického trhu stažen díky vážným vedlejším efektům na gastrointestinální trakt a hepatotoxicitě (Pan, Yu et al. 2007). Z tohoto důvodu byl syntetizován 7-methoxyderivát takrinu (7-MEOTA) s totožnými farmakologickými vlastnostmi, ale limitovanou hepatotoxicitou. THA a 7-MEOTA jsou příkladem molekul kombinujících současný vliv na cholinergní systém a NMDAr.



**Obr. 2.5.3.4:** Schématické znázornění nepřímé modulační NMDAr takrinem. Takrin může v hipokampu modulovat NMDAr pomocí metabotropního muskarinového acetylcholinového receptoru 1 (M1 mAChR) ovlivněného inhibítorem. Zvýšená dostupnost acetylcholinu díky inhibici jeho degradace aktivuje M1 mAChR a vede k inhibici  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentního draslíkového kanálu. Toto má za následek opožděnou repolarizaci plasmatické membrány a následnou prodlouženou dobu aktivace NMDAr, která vede k usnadnění LTP. AChE – acetylcholin esteráza, SK  $\text{K}^+$  kanál – z angl. small conductive calcium-activated potassium channel, Ach – acetylcholin, Gly – glycin, Glu – glutamát, LTP – z angl. long term potentiation.

#### 2.5.4 Glutamát a NMDA receptory ve vývoji

Vývoj mozku probíhá v prenatálním, neonatálním i postnatálním stádiu. Neurotransmitery se vyskytující se od brzkého prenatálního stádia jsou nejprve syntetizovány ve fylogeneticky starší kaudální části mozku (Herlenius and Lagercrantz 2004). Během vývoje mozek prochází kritickými periodami, kdy určitý druh stimulu je esenciální pro další procesy např. pro proliferaci, diferenciaci a migraci. Glu je dominantní excitační aminokyselina během prenatálního vývoje s možným trofickým efektem na synaptogenezi. V myším kortexu Glu

roste prenatalně v období E13 – E17 (E = embryonální den), což odpovídá intenzivní neurogenezi a klesá E17 – E19, kdy probíhá apoptóza glutamatergních pyramidálních buněk ve ventrikulární a subventrikulární zóně. Poté hladina Glu roste v perinatálním období růstovém období E21 – P5, počínaje P0 se kortexu začínají dostávat axony z thalamu tvořící excitační synapse s kortikálními neurony. V období P11 – P15 (P = postnatální den) množství Glu klesá o cca 25%, což opět koreluje s apoptózou v myším kortexu a znovu vzrůstá P21 – P30 (Benítez-Díaz, Miranda-Contreras et al. 2003).

Jak bylo řečeno Glu působí na velké množství receptorů a to metabotropní i ionotropní, obě skupiny prodělávají ve vývoji velké změny ve své expresi. U NMDAr dochází ke změnám v expresi podjednotek v závislosti na časové ose a typu oblasti mozku, což velmi silně ovlivňuje jejich elektrofyziologické a farmakologické vlastnosti. V embryonálním stádiu se vyskytuje GluN2B a GluN2D podjednotka, obě jsou během prvních dvou týdnů nahrazeny, Glu2A za GluN2B a GluN2C za GluN2D podjednotku (Williams, Russell et al. 1993, Takai, Katayama et al. 2003). GluN2A se poté v dospělosti vyskytuje v celém mozku, GluN2C v mozečku a GluN2D vymizí téměř úplně. GluN1 podjednotka je pro funkční NMDAr esenciální a proto je exprimována v celém mozku napříč vývojem, zvířata s delecí genu pro GluN1 umírají krátce po narození (Forrest, Yuzaki et al. 1994). U nezralé mozkové tkáni NMDAr ve formě GluN1/GluN2B mohou být více aktivovány i přes blokádu iontů  $Mg^{2+}$ , zatímco ve zralé tkáni NMDAr GluN1/GluN2A umožňují LTP a s tím i procesy spojené učením (Tang, Shimizu et al. 1999). Geneticky modifikované myši GluN2A<sup>-/-</sup> jsou schopné přežít, ale mají zhoršenou LTP a s tím i prostorovou orientaci (Sakimura, Kutsuwada et al. 1995). Pro porovnání GluN2B<sup>-/-</sup> myši jsou méně životaschopné, mají zhoršenou LTD a narušený neuronální vývoj (Kutsuwada, Sakimura et al. 1996, Brigman, Wright et al. 2010). V neonatálním stádiu se GluN2B vyskytuje zejména v kortikálních a hipokampálních neuronech na synaptických i extrasynaptických místech (Tovar and Westbrook 1999, Thomas, Miller et al. 2006). V rozmezí P39 – P92 u potkana dochází k redukci GluN2B podjednotky, stále je však extrasynapticky zachována (Harris and Pettit 2007). Proto jsou v animálních modelech úspěšní selektivní antagonisté GluN2B podjednotky. Se změnou podjednotkového složení přichází i změna v podobě glutamatergních synapsí. NMDAr jsou v glutamatergní synapsi exprimovány jako první, během postnatálního vývoje dochází k navýšení jejich počtu a preferenční distribuci NMDAr do centra synapse, zároveň jsou zabudovány i extrasynapticky (Somogyi, Tamas et al. 1998).

Výzkum naznačuje zapojení NMDAr v kontrole proliferace nervových progenitorových buněk a zároveň i jejich úlohu při radiální či tangenciální migraci. Byl popsán vliv NMDAr na proliferaci v *gyrus dentatus* u hlodavců, primátů i člověka (Cameron, McEwen et al. 1995, Eriksson, Perfilieva et al. 1998, Gould, Tanapat et al. 1998). V experimentech *in vivo* bylo prokázáno, že blokace NMDAr během prvního postnatálního týdne zvyšuje proliferaci granulárních buněk v hipokampu (Cameron, McEwen et al. 1995).

Ve vyvíjejícím se mozku se glutamatergní neurony vyskytují zejména ventrikulární zóně hipokampu a poté migrují do kortikální vrstvy pomocí radiální migrace, Glu je zde pravděpodobně velmi důležitým chemotaktickým faktorem. Pokud v mozečku budou NMDAr blokovány vysokou koncentrací  $Mg^{2+}$  či antagonistou, dojde k narušení migrace granulárních

buněk z vnější do vnitřní granulární vrstvy (Rossi and Slater 1993). Zatímco při navýšení koncentrace NMDA a Gly dojde k jejímu posílení (Komuro and Rakic 1993).

Jak již bylo řečeno NMDAr a Glu ovlivňují proliferaci, migraci a synaptickou plasticitu ve vyvíjejícím se mozku. V období velmi intenzivní synaptogeneze a mozkového růstu jsou NMDAr hypersenzitivní k excitotoxickému poškození nervové tkáně. U potkana je tato perioda v rozmezí od pozdně prenatálního do dvou týdnů postnatálního vývoje a u člověka od třetího trimestru těhotenství do tří let života po narození (Dobbing and Sands 1979). Během této doby blokáce NMDAr pomocí antagonistů způsobí rozsáhlou apoptotickou neurodegeneraci. Tento jev byl objeven v roce 1999 prof. Ikonomidou et al. při studiu animálního modelu traumatického poranění mozku u 7 dní starých potkaních mláďat. Traumatické poranění parietálního kortexu vede k malé ohraničené excitotoxické lézi v místě infarktu a následné apoptóze ve vzdálenějších strukturách. Podání MK-801 v popsaném modelu vedlo k zmenšení lokální excitotoxické léze v místě traumatického infarktu, ale zároveň mělo za následek i výrazné zhoršení apoptózy ve vzdálenějších regionech. Již samotná aplikace MK-801, ketaminu a PCP způsobí v nezralé nervové tkáni masivní apoptotickou neurodegeneraci v několika strukturách vyvíjejícího mozku. Citlivost mozkových struktur vůči neuronálnímu poškození způsobené vystavením antagonistů NMDAr vykazuje věkovou závislost. Senzitivita k MK-801 je vysoká v postnatálním období u potkana P0 – P3, dále se zvyšuje ve dnech P3 – P7 a klesá v období P7 – P14 (Ikonomidou, Bosch et al. 1999). Mechanismus způsobující MK-801 podmíněnou apoptotickou neurodegeneraci pravděpodobně souvisí s úbytkem trofických faktorů BDNF (z angl. brain-derived neurotrophic factor) a neurotrofinu 3 a dále se snížením exprese antiapoptotického proteinu Bcl2 (Hansen, Briem et al. 2004). Stejný jev na vyvíjející se mozek byl popsán u agonistů GABA<sub>A</sub> receptoru benzodiazepinů a barbituratů a zároveň i u ethanolu, který je současně antagonistou NMDAr a agonistou GABA<sub>A</sub> receptorů (Olney, Ishimaru et al. 2000, Ikonomidou, Bittigau et al. 2001). Popsaná problematika antagonistů NMDAr a agonistů GABA<sub>A</sub> receptoru ve vývoji má esenciální význam zejména v oblasti pediatrické péče, z důvodu použití vhodných anestetik u dětských pacientů a léčby závislostí u gravidních matek.

## 2.6 Neurosteroidy

Steroidy jsou tělu vlastní lipofilní látky složené z tří cyklohexanových kruhů (A, B, C) a jednoho cyklopentanového (D). Z hlediska prostorové konformace se mohou přírodní i syntetické steroidy vyskytovat v *cis* nebo *trans* uspořádání určující jejich biologické vlastnosti. Steroidní látky jsou esenciální pro fyziologickou funkci organismu, např. cholesterol je nezbytný pro integritu plasmatické membrány, steroidní hormony ovlivňují reakci na stres či reprodukci a v neposlední řadě žlučové kyseliny zúčastňující se trávení jsou též steroidního charakteru.

Steroidy syntetizované v mozku *de novo* nebo ze steroidních prekurzorů dopravených krví se nazývají neurosteroidy. Tento termín poprvé zavedl francouzský biochemik Étienne – Émile Baulieu, když prokázal existenci dehydroepiandrosteronu (DHEA), pregnenolonu (PREG) a jejich sulfátů ve vysoké koncentraci i po odstranění gonád a nadledvinek.

Neurosteroidy působí jako přímé modulátory excitability neurotransmiterových receptorů např. NMDAR, AMPA receptorů, receptorů pro  $\gamma$ -amino máselnou kyselinu (GABA), glycinových receptorů, sigma receptorů atd. Není výjimkou, že jeden neurosteroid je schopen působit na více typů receptorů opačným efektem (Harrison and Simmonds 1984, Wu, Gibbs et al. 1991).

Enzymy účastnící se syntézy neurosteroidů jsou exprimovány v neuronech, astrocytech i oligodendrocytech. Velká část z nich patří do rodiny cytochromů P450. Veškeré neurosteroidy vznikají z cholesterolu. Iničiačním krokem je přenos molekuly cholesterolu na vnitřní mitochondriální membránu a poté jeho konverze na PREG pomocí enzymatického komplexu štěpící postranní řetězec cholesterolu (P450scc). P450scc se nachází ve zralé nervové tkáni potkana zejména v hippokampu, kortexu, amygdale a bazálních gangliích (Mellon and Deschepper 1993). Hlavní prekursor pro neurosteroidy PREG je poté transformován  $3\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenázou ( $3\beta$ -HSD) na progesteron (PROG) (Compagnone and Mellon 2000). PREG i PROG mohou být dále zpracovávány  $17\alpha$ -hydroxylázou/ $17, 20$ -lyázou (P450c17) na jejich  $17$ -hydroxy formy, přičemž následným štěpením vazby mezi C17 a C20 vzniká DHEA a androstendion, které mohou být prekursory pro syntézu testosteronu a estradiolu. Další možností je redukce PROG na  $5\alpha$ -dihydroprogesteron a poté konverze na allopregnanolon (ALLO), isoallopregnanolon a pregnanolon. PROG rovněž slouží jako výchozí molekula pro syntézu kortikosteronu a aldosteronu (Mellon and Vaudry 2001).

Sulfotransferázy katalyzují přenos skupiny  $SO_4^{2-}$  na neurosteroidy obsahující  $-OH$  skupinu na C3 pozici např. u DHEA, PREG a ALLO. Sulfatace molekuly ve velmi významném krokem z hlediska působení na neurotransmiterové receptory. Sulfátová skupina může být odejmuta sulfatázami (Compagnone and Mellon 2000).

### **2.6.1 Mechanismus působení neurosteroidů**

Klasické steroidní hormony zahrnující androgeny, mineralokortikoidy, glukokortikoidy estrogeny atd. syntetizované gonádami a endokrinními žlázami působí intracelulárně na jaderné receptory ovlivněním genové exprese.

První důkaz odlišného mechanismu působení steroidních látek podal kanadský lékař studující a působící v Praze Hans Hugo Bruno Selye v roce 1941. V jeho práci popsal rychlý sedativní a anestetický efekt metabolitů progesteronu na CNS hlodavců (Selye 1941). Neurosteroidy přímo modulují neurotransmiterové receptory CNS i PNS (nongenomický způsob) a ovlivňují tak excitabilitu nervové tkáně (Rupprecht 2003). Zda neurosteroid působí na daný receptor aktivačně či inhibičně záleží zejména na jeho prostorové konformaci a případných substituentech na cholesterolovém skeletu.

### **2.6.2 Interakce neurosteroidů s NMDA receptory**

Vliv neurosteroidů na NMDAR je široce zkoumané téma díky zapojení glutamátergního systému do celé řady patologií CNS. Nicméně stále není známo vazebné alosterické místo

neurosteroidů na NMDAr, předpokládána je existence různých vazebných míst pro aktivační a inhibiční neurosteroidy. S určitostí se dá prohlásit, že neurosteroidy nepůsobí jako blokátory iontového kanálu (např. MK-801, ketamin, PCP). Společným rysem pro všechny steroidy modulující NMDAr je nabitá skupina navázaná na uhlíku C3 steroidního skeletu. Z hlediska prostorové konfigurace chirálních uhlíků C3 a C5 může steroidní molekula nabývat lomeného či planárního tvaru, přičemž planární uspořádání je typické pro neurosteroidy potenciující NMDAr a lomené pro neurosteroidy inhibující (Park-Chung, Wu et al. 1997, Korinek, Kapras et al. 2011).

Typickým inhibičním alosterickým modulátorem NMDAr je endogenní neurosteroid pregnanolon sulfát (20-oxo-5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ -yl sulfát; PS), jehož navázání na NMDAr je nezávislé na membránovém potenciálu, ale zároveň je podmíněno aktivací receptoru; tzv. use-dependentní způsob. Alosterická inhibice PS způsobí 70% redukci proudu procházejícího přes NMDAr (Petrovic, Sedlacek et al. 2005). Míra inhibice je závislá na podjednotkovém uspořádání receptoru, PS s větší silou inhibuje NMDAr složené z GluN1 a GluN2C či GluN2D podjednotek (Horak, Vlcek et al. 2004). Dále bylo prokázáno, že vazebné místo PS se nachází na extracelulární straně NMDAr v membránové oblasti a je odlišné od vazebného místa pro dizocilpin, glycin, polyaminy a Mg<sup>2+</sup> (Park-Chung, Wu et al. 1997, Borovska, Vyklicky et al. 2012). Rovněž byl popsán význam membrány a membránových oblastí pro navázání PS na NMDAr (Borovska, Vyklicky et al. 2012). Obecně se dá říci, že deriváty pregnanolonu zahrnující např. pregnanolon hemisukcinát, pregnanolon hemiglutarát a pregnanolon hemioxalát působí na NMDAr inhibičně. Přirozeně se vyskytujícími neurosteroidy přímo inhibující NMDAr jsou také estradiol a testosteron (Korinek, Kapras et al. 2011). Estradiol prokázal své neuroprotektivní účinky v animálních modelech i u lidí, zmírňuje poškození tkáně po excitotoxickém poškození, oxidačním stresu a zároveň usnadňuje její reparaci (Raghava, Das et al. 2017).

Pregnenolon sulfát (20-oxo-pregn-5-en-3 $\alpha$ -yl sulfát; PREGS) se od PS liší pouze přítomností dvojnásobné vazby na steroidním skeletu mezi uhlíky C5 a C6, stejně jako PS se v CNS vyskytuje naprosto přirozeně (Weill-Engerer, David et al. 2002). PREGS byl prvním neurosteroidem, u kterého byl prokázán potenciační vliv na NMDAr, tzn. zvýšení pravděpodobnosti otevření iontového kanálu NMDAr po jeho navázání (Wu, Gibbs et al. 1991). Elektrofyziologická měření popsala velmi vysoký nárůst odpovědi NMDAr po společné inkubaci s 300  $\mu$ M PREGS, obdobný nálezný byl opakován i v případě buněčné kultury hipokampálních neuronů (Wu, Gibbs et al. 1991). PREGS preferenčně potenciačně působí na NMDAr obsahující GluN1 spolu s GluN2A či GluN2B podjednotkou. Syntetické analogy PREGS též působí aktivačně na NMDAr.

PREGS i PS zároveň ovlivňují i jiné receptory, např. GABA<sub>A</sub>, AMPA či kainátové (Weaver, Land et al. 2000). Dalšími endogenními neurosteroidy s pozitivním efektem na NMDAr jsou sulfatované molekuly DHEAS a ALLOS. Především v případě DHEAS byl zaznamenán jeho příznivý vliv na paměť.

### 2.6.3 GABA<sub>A</sub> receptor a jeho interakce s neurosteroidy

GABA (kyselina  $\gamma$ -animomásečná), hlavní inhibiční neurotransmitter ve zralé tkáni CNS, je zásadní pro dlouho i krátkodobé ovlivnění excitability. Role GABA ve vývoji nervové soustavy je však mnohem rozmanitější, působí mimo jiné jako trofický faktor pro ovlivnění proliferace, migrace, diferenciacie a zrání synapsí (Owens and Kriegstein 2002). Během maturace nervové tkáně má GABA, na rozdíl od dospělosti, excitační účinek a to díky vysoké koncentraci Cl<sup>-</sup> uvnitř buňky. Postupem času tato koncentrace klesá díky zvyšující se expresi K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> kotransporteru KCC2 (z angl. potassium chloride cotransporter 2), což má za následek změnu působení GABA z excitace na inhibici. K tomuto jevu u potkana dochází během prvních dvou postnatálních týdnů (Rivera, Voipio et al. 1999).

Bylo prokázáno, že přibližně 33% synapsí v savčím kortexu je GABAergních. Z hlediska struktury GABA<sub>A</sub> receptor je pentamerický protein složený z pěti podjednotek, které tvoří iontový kanál pro Cl<sup>-</sup>, který po vstupu do buňky působí hyperpolarizaci postsynaptického neuronu. Existuje několik typů podjednotek a ty se dále mohou vyskytovat v několika izoformách ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\beta_{1-3}$ ,  $\gamma_{1-3}$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$ ,  $\rho_{1-3}$ ), nejčastější podobou GABA<sub>A</sub> receptoru je  $2\alpha + 2\beta + \gamma/\delta$ . Podobně jako u NMDAR podjednotkové složení je zde rozhodující pro kinetiku a farmakologii receptoru, např. pro formaci benzodiazepinového vazebného místa je esenciální přítomnost  $\gamma$  podjednotky (Sieghart and Sperk 2002). Antagonisté GABA<sub>A</sub> receptoru jsou bikukulin (kompetitivní) a pikrotoxin (nonkompetitivní) a pozitivními alosterickými modulátory benzodiazepiny, barbituráty a ethanol. Samostatným tématem je působení neurosteroidů na GABA<sub>A</sub> receptor, jelikož stejně jako v případě NMDAR ho mohou aktivovat či inhibovat.

Pozitivními modulátory jsou pro GABA<sub>A</sub> receptor ALLO, pregnanolon, progesteron, testosteron, allotetrahydrodeoxykortikosteron (THDOC), negativními pak PREGS a DHEAS. Na základě struktury steroidního skeletu můžeme určit vliv neurosteroidu na GABA<sub>A</sub> receptor, např. sulfátová skupina na C3 předurčuje inhibiční charakter molekuly bez ohledu na její prostorovou konformaci, přítomnost dvojně vazby atd. (Wang, He et al. 2002). Na druhou stranu 3 $\beta$ -hydroxyderiváty (obou konformací 5 $\alpha$  i 5 $\beta$ ) působí na GABA<sub>A</sub> receptor mírně potenciačně, zatímco 3 $\alpha$ -hydroxyderiváty (ALLO, pregnanolon) potenciují GABA<sub>A</sub> receptor s větší silou (v řádu stovek procent); (Kokate, Svensson et al. 1994, Wang 2011). Na GABA<sub>A</sub> receptoru jsou pravděpodobně dvě vazebná místa pro neurosteroidy, jedno pro inhibiční neurosteroidy a druhé pro aktivační (Hosie, Wilkins et al. 2006). Neurosteroidy pozitivně modulující GABA<sub>A</sub> receptor zvyšují vstup Cl<sup>-</sup>, tímto potlačují anxieta v animálních modelech deprese, zároveň mají sedativní a antiepileptický efekt (Wieland, Lan et al. 1991, Timby, Balgard et al. 2006). Na druhou stranu bylo experimentálně prokázáno u lidí i zvířat, že allosterické modulátory s pozitivním působením na GABA<sub>A</sub> receptor u určitého procenta populace mohou naopak indukovat úzkost, podrážděnost a agresivitu. Silná podrážděnost byla přítomna u 3 - 6% osob a mírné příznaky u 20 - 30%. Tento účinek byl pozorován u ALLO, benzodiazepinů, barbiturátů i ethanolu. Pravděpodobně je tato bipolární odpověď závislá na konkrétní koncentraci daného neurosteroidu (Beauchamp, Ormerod et al. 2000, Ben-Porath and Taylor 2002, Miczek, Fish et al. 2003, Duke, Giancola et al. 2011).

#### 2.6.4 Fyziologický význam neurosteroidů u zralé nervové tkáně

Jak již bylo řečeno, neurosteroidy vyskytující se přirozeně mají řadu funkcí v CNS i PNS. Dále jsou velmi důležité během vývoje organismu, tato velmi specifická oblast bude popsána později. Byl prokázán pozitivní vliv PREGS a DHEAS na paměť a učení (obě látky jsou pozitivními modulátory NMDAr a negativními modulátory GABA<sub>A</sub> receptorů); (Ladurelle, Eychenne et al. 2000). PREGS se v hipokampu přirozeně vyskytuje a jeho koncentrace je přímo úměrná kognitivním schopnostem zvířat. Infuze PREGS *in vivo* stimulovala neurogenezi, adhezi neuronů a plasticitu v hipokampu (Mayo, Lemaire et al. 2005). Kognitivní schopnosti zvířat i jejich výkon v paměťových testech mohou být zlepšeny podáním PREGS a DHEAS (Flood, Morley et al. 1995). Zároveň je známo, že hladina DHEA a DHEAS u lidské populace zřetelně klesá a věkem (Orentreich, Brind et al. 1984). Následně byla popsána nízká hladina DHEA a DHEAS u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou (Weill-Engerer, David et al. 2002).

Dosavadní studie prokázaly anxiolytický, antidepressivní, sedativní a dokonce antipsychotický vliv neurosteroidů, psychické stavy jsou tedy krom jiného ovlivněny i neurosteroidy. Například ALLO a THDOC jsou známy pro svůj silný anxiolytický účinek, nízká hladina ALLO koreluje s mírou agresivity a úzkostí u myší (ALLO i THDOC pozitivně ovlivňují GABA<sub>A</sub> receptory a negativně působí na NMDAr); (Crawley, Glowa et al. 1986, Maguire, Stell et al. 2005, Eser, Schule et al. 2006). Anxiolytický efekt ALLO je zprostředkován jeho pozitivním působením na GABA<sub>A</sub> receptor a může být blokován podáním pikrotoxinu. Není překvapivé, že ALLO a THDOC modulují i reakci organismu na stres, kdy jejich koncentrace po vystavení stresovému stimulu velmi rychle roste (Purdy, Morrow et al. 1991, Reddy and Rogawski 2002). Tento jev byl popsán v animálních modelech při aplikaci mírných elektrických šoků a v testu nuceného plavání tzv. forced swimming test (Barbaccia, Roscetti et al. 1996, Barbaccia, Roscetti et al. 1997).

Velmi důležitá je role neurosteroidů při vývoji a léčbě depresivního onemocnění. U depresivních pacientů byla nalezena snížená koncentrace ALLO v plasmě i CSF, zatímco koncentrace THDOC v plasmě byla zvýšená (Strohle, Pasini et al. 2000). Bylo zjištěno, že podání široce používaného antidepressiva fluoxetinu vede k normalizaci hladin obou popsanych neurosteroidů (Uzunov, Cooper et al. 1996, Strohle, Pasini et al. 2000). Sulfatované formy neurosteroidů PREGS a DHEAS též mají antidepressivní efekt v animálních modelech i u lidí.

Neurosteroidy ovlivňují organismus na buněčné úrovni. Ve studii Marukami et al. prokázali existenci pregnenolon-vázacího proteinu na mikrotubulech. PREG po jeho navázání kontroluje dynamiku a stabilizaci mikrotubulů u neuronů, což naznačuje význam neurosteroidů pro stárnutí organismu (Marukami, Fellous et al. 2000). Dále byl zjištěn vliv neurosteroidů na myelinizaci, kdy po aplikaci PROG (pozitivní modulátor GABA<sub>A</sub> receptoru) na buněčnou kulturu došlo ke zvýšené expresi myelin basic proteinu (MBP) a dále zvýšenému počtu oligodendrocytů exprimujících MBP (Koenig, Schumacher et al. 1995). PROG působí promyelinizačně díky jeho vlivu na proliferaci a zrání oligodendrocytů. Dále je samozřejmě diskutován vliv neurosteroidů na neurogenezi, např. DHEA (inhibiční modulátor GABA<sub>A</sub> receptoru a potenciační modulátor NMDAr) zvyšuje počet nově vzniklých buněk v *gyrus dentatus* u potkana a dále antagonizuje tlumící účinek kortikosteronu na proliferaci a



neurogenezi (Karishma and Herbert 2002). DHEA podporuje také proliferaci nervových kmenových buněk, výsledkem této kaskády je zvýšená neurogeneze, která může být eliminována antagonisty NMDAr a sigma receptorů (Suzuki, Wright et al. 2004). Vyvážené koncentrace neurosteroidů během dospělosti chrání nervovou tkáň před degradací způsobenou toxickými vlivy (endo i exogenními). Porušení neurosteroidogeneze se vyskytuje ve stresových situacích, psychiatrických onemocněních a neurodegenerativních onemocněních (Knytl P 2016).

### 2.6.5 Význam neurosteroidů ve vývoji nervové tkáně

Pro těhotenství je charakteristická zvýšená koncentrace neurosteroidů ve volné i konjugované formě v mozku matky i plodu. Neurosteroidy jsou produkovány v těhotenství nadledvinkami plodu a placentou. Jejich funkce stále není zcela objasněna, zřejmě se podílí na stabilizaci těhotenství a účastní se neurohumorální stresové reakce ženy během porodu. Pravděpodobně mají též ochrannou funkci proti ischemicko-hypoxickému poškození v perinatálním období, kdy plod je schopen zvýšit produkci neurosteroidů v odpovědi na infarkt jako prevenci před kognitivním či motorickým poškozením.

Funkční syntéza neurosteroidů je esenciální pro správný vývoj organismu. Přítomnost enzymu P450scc konvertující cholesterol na pregnenolon byla v mozku prokázána už od raného vývoje. Ablace genu pro P450scc vede k úmrtí takto geneticky upravených myší 1 – 2 dny po narození, pouze pár jich přežilo týden (Hu, Hsu et al. 2002). V souvislosti s tématem neuroprotektce plodu jsou nejvíce zmiňované neurosteroidy pozitivně ovlivňující GABA<sub>A</sub> receptor např. ALLO, který je syntetizován z progesteronu. Hill et al. v roce 2007 prokázali, že produkce progesteronu placentou se zvyšuje během těhotenství, tak aby mohl být pak využit jako prekursor pro ostatní neurosteroidy. S tímto nálezem souvisí vzrůst koncentrací 3 $\alpha$ - a 5 $\alpha$ -izomerů pregnanolonu, současně pokles 5 $\beta$  izomerů pregnanu a zvýšená sulfatace neuroinhibičních steroidů (3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon) během gravidity (Hill, Cibula et al. 2007). V animálním modelu akutního fetálního ischemicko-hypoxického poškození v pozdní fázi těhotenství byl popsán výrazný nárůst koncentrace ALLO (3 $\alpha$ 5 $\alpha$ ) v šedé i bílé hmotě 2 -3 hodiny po infarktu (Nguyen, Yan et al. 2004). Pokud vznik ALLO po infarktu bude zablokovan podáním finasteridu (inhibitor 5 $\alpha$ -reduktázy) dojde k zvýšenému množství apoptózy zejména v hipokampálních oblastech CA1 a CA3, dále také v kortexu a mozečku (Yawno, Yan et al. 2007). Potlačení syntézy ALLO za fyziologických podmínek vede k zvýšenému počtu degenerujících buněk ve fetálním mozku (Yawno, Hirst et al. 2009). Koncentrace ALLO klesá přirozeně po narození a je udržovaná na nízké hladině po celé neonatální období (Nguyen, Yan et al. 2004). Pregnenolon sulfát, působící jako negativní modulátor GABA<sub>A</sub> receptorů a zároveň pozitivní modulátor NMDAr, v hipokampálních kulturách indukuje LTP v CA1 oblasti hipokampu (Sliwinski, Monnet et al. 2004). Jak již bylo řečeno výše PREGS v dospělosti pozitivně ovlivňuje kognitivní funkce. Dalším neurosteroidem s regulační funkcí ve vývoji je progesteron syntetizovaný během neonatální periody Purkyňovými buňkami, kde stimuluje diferenciaci mozečku. Na řezech mozečku i *in vivo* v neonatální tkáni progesteron podporuje

růst dendritů mozečku, formaci dendritických trnů i synaptickou denzitu Purkyňových buněk (Sakamoto, Ukena et al. 2001, Sakamoto, Ukena et al. 2002).

### 2.6.6 *Terapeutický potenciál neurosteroidů a neuroaktivních steroidů*

Neuroaktivní steroidy jsou steroidní molekuly mimikující působení neurosteroidů nevytvářející nervovou tkáň. Důvodem jejich syntézy je zejména krátká doba působení tělu vlastních neurosteroidů, které jsou rychle metabolizovány. Sulfatované estery jako PS a PREGS jsou po určité době hydrolyzovány na pozici C3 a tím pádem se již nemohou navázat na neurotransmiterové receptory jako v předešlé formě. Neuroaktivní steroidy reprezentují v současné době velmi zajímavé téma v oblasti neurobiologie.

Syntéza a s ní hladina neurosteroidů v organismu se mění v závislosti na věku, během stresových podmínek, při probíhajícím chronickém zánětu a samozřejmě i u nerodegenerativních onemocnění. Neurosteroidy i neuroaktivní steroidy mají nesporný terapeutický potenciál prokázaný při experimentech *in vitro* i *in vivo*. Hladina neuroprotektivních neurosteroidů se v mozku mění za patologických okolností, např. během nerodegenerativních onemocnění jako je Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. U pacientů s Alzheimerovou chorobou byl zaznamenán pokles hladiny ALLO v temporálním kortexu a prefrontálním kortexu, zatímco koncentrace DHEA a PREG byla zvýšená (Naylor, Kilts et al. 2010).

Detailní mechanismus neuroprotektivního účinku neurosteroidů zatím není znám, nicméně objevují se souvislosti mezi neurosteroidy a potlačení zánětlivé imunitní reakce organismu. ALLO a PROG snižují produkci prozánětlivých cytokinů v místě poranění nervové tkáně, čímž redukuje vznik pozdějšího edému (VanLandingham, Cekic et al. 2007). Aplikace PROG také zlepšila myelinizaci a zvýšila expresi BDNF v animální modelu poranění míchy a po kryolýzi periferního nervstva (De Nicola, Gonzalez et al. 2006). Jelikož ALLO působí potenciačně na GABA<sub>A</sub> receptory, jeho podání v animálních modelech epilepsie vede ke snížení četnosti záchvatů, mortality a buněčné smrti (Leskiewicz, Budziszewska et al. 1997).

Neuroprotektivní vliv neurosteroidů byl popsán dále v animálních modelech ischemického poškození mozku. Administrace DHEA v dávce 20 mg/kg 3 – 48 hodin před ischemickým inzultem zmírnila poškození nervové tkáně v hipokampální oblasti CA1 a zároveň zmírnila kognitivní deficit zvířat (Li, Klein et al. 2001). Dalším neuroaktivním steroidem se signifikantně neuroprotektivním účinkem v modelech ischemie je 3 $\alpha$ -ol-5 $\beta$ -pregnan-20-one hemisukcinát (PHS). U této molekuly byla popsána redukce velikosti postižené tkáně v modelu okluze *arteria cerebri media* (angl. middle cerebral artery occlusion; MCAO) po podání PHS. V další studii stejného týmu bylo demonstrováno snížení následků reversibilní ischemie v oblasti páteřní míchy při aplikaci PHS (Lapchak 2004, Lapchak 2006).

Z hlediska medicínálního využití se jeví slibnými i pozitivní C3 hemiesterové alosterické steroidní modulatory NMDAr analogů pregnenolonu a androstenu v kontextu léčby neuropsychiatrických chorob spjatých s hypofunkcí glutamatergního systému (Krausova, Slavikova et al. 2018).

Zatím nejvíce úspěšným syntetickým steroidem je ganaxolon vyvinutý firmou Marinus Pharmaceutical. Ganaxolon, methylovaný derivát ALLO, je CNS selektivní pozitivní alosterický modulátor GABA<sub>A</sub> receptorů s prokázaným antiepileptickým účinkem v mnoha animálních modelech epilepsie. V klinických studiích byl dobře tolerován dospělými i dětmi (Yawno, Miller et al. 2017).

### ***2.6.7 Studované neuroaktivní steroidy pregnanolon glutamát a pregnanolon hemipimelát***

Jak již bylo řečeno, nadměrná aktivace NMDAr vede excitotoxickému poškození nervové tkáně, které je společným jmenovatelem pro akutní i chronická neurologická onemocnění. V posledních 25 letech bylo vyvinuto mnoho antagonistů NMDAr s potenciálně neuroprotektivním účinkem. Přestože jejich testování v animálních modelech bylo úspěšné, v pozdějších klinických zkouškách selhaly. Společným vedlejším efektem pro mnoho látek ovlivňujících NMDAr je jejich psychotomimetický účinek způsobený ovlivněním běžné synaptické aktivity. Molekulárním podkladem tohoto účinku u nonkompetitivních antagonistů NMDAr je jejich dlouhé působení uvnitř iontového kanálu receptoru v nepostižených oblastech mozku. Z tohoto důvodu je potřeba se zaměřit na vývoj látek, které budou preferenčně blokovat tonicky aktivované NMDAr v postižených strukturách s možností rychlého opuštění iontového kanálu. Takto působí např. unkompetitivní NMDAr antagonista memantin, který je v současné době využíván při léčbě Alzheimerovy choroby. Obdobný mechanismus účinku byl prokázán i u neurosteroidu PS. Nicméně PS je v mozku velmi snadno hydrolyzován, proto byl syntetizován analog endogenního PS 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamát (PG); (Kapras, Slavickova et al. 2012). Struktura PG je znázorněna na obr. 5.1.1, sulfátová skupina PS je u PG nahrazena kyselinou glutamovou. Z hlediska farmakokinetiky PG po intraperitoneálním podání rychle transportován přes hematoencefalickou bariéru s maximální koncentrací v mozkové tkáni 60 min po aplikaci (Rambousek, Bubenikova-Valesova et al. 2011). Dále je PG dobře odbouráván a nedochází k jeho akumulaci v mozku ani v ostatních tkáních organismu. V našich předchozích studiích byl popsán mechanismus účinku PG na NMDAr, zároveň PG ovlivňuje i GABA<sub>A</sub> receptory (Bukanova, Solntseva et al. 2018). Stejně jako PS i PG je use-dependentní (inhibiční působení je podmíněno aktivací příslušného receptoru agonistou) a napěťově nezávislý allosterický inhibitor NMDAr (Petrovic, Sedlacek et al. 2005). V předchozí práci byl také demonstrován neuroprotektivní účinek PG v modelu excitotoxického poškození (Rambousek, Bubenikova-Valesova et al. 2011). Dalším sledovaným neuroaktivním steroidem je pregnanolon hemipimelát (PA-hPim), jeho struktura je znázorněna na obr. 5.2.1. Podobně jako PG i PA-hPim je syntetickým analogem PS, rozdílný je odlišný substituent na C3. Obě látky se jsme se rozhodli otestovat v animálních modelech poškození nervové tkáně. Neuroaktivní steroidy jsou atraktivním výzkumným tématem i díky možnosti ovlivnění více neurotransmitterových systémů jednou molekulou.

## 2.7 Animální modely použité v práci

Použití vhodně zvolených animálních modelů je esenciální pro porozumění studovaných patologických procesů. V našem případě jsme se zaměřili na výzkum ischemického infarktu v mozkové tkáni, který je silně spjatý s problematikou neuroprotektce a glutamátové excitotoxicity a na depresivní onemocnění. Neuropsychiatrická i neurodegenerativní onemocnění jsou velmi vážným problémem současné společnosti, proto je nezbytné hledat nové terapeutické přístupy. Tato práce shrnuje působení několika typů molekul v animálních modelech ischemie, excitotoxicity a deprese. Společným rysem všech zde použitých modelů je klíčová role glutamátergního systému.

### 2.7.1 Animální modely deprese

Depresivní porucha je multifaktoriální, heterogenní a často chronické onemocnění značně limitující osoby především v produktivním věku, postihující 5 – 15% mužů a 9 – 26% žen (Bares M 2006). Klinické studie uvádějí, že přibližně u 30 – 40% pacientů není účinná léčba antidepresivem první volby. Díky vysokému počtu pacientů nereagujících na terapii klasickými antidepresivy je esenciální ve výzkumu používat validní animální modely tohoto psychiatrického onemocnění. Animální modely deprese mohou být založeny na genetické manipulaci (metodika optogenetiky, geneticky modifikovaná zvířata), stresu (sociální stres, chronický mírný stres, naučená bezmocnost), farmakologické manipulaci, indukci narušení cirkadiálního rytmu či počáteční chirurgické manipulaci s pozdějšími neurochemickými změnami (olfaktorická bulbektomie); (Fava and Kendler 2000).

Bilaterální olfaktorická bulbektomie (OBX) je chirurgicky indukovaný model deprese vyúsťující v rozsáhlé změny v endokrinním, imunitním a neurotransmiterovém systému. OBX jsme vybrali díky její dobré reprodukovatelnosti a neurochemickým změnám postihujícím glutamátergní systém, na který jsme zaměřeni. Olfaktorické bulby u potkana jsou neuroanatomicky bilaterální extenze rostrální části telecephala zařazované jako součást limbického systému a propojené s posteriorním pyriformním kortexem, amygdalou a striatem. Při jejich oboustranném odstranění dochází k neurodegenerativním, neurochemickým, strukturálním a behaviorálním změnám podobně jako u pacientů trpících depresí. Následné depresivní chování není výsledkem pouhé ztráty čichu, ale souvisí zároveň se ztrátou detekce feromonů díky odstranění vomeronasálního orgánu spolu s čichovým epitelem a především s retrográdní degenerací neuronů vyskytující se i v kortexu, hippocampu, amygdale, *locus coeruleus* a *nucleus raphe* (Leonard and Tuite 1981, Carlsen, De Olmos et al. 1982, Nesterova, Gurevich et al. 1997). Po OBX se dále objevuje zvětšení objemu postranních mozkových komor a zmenšení objemu hippocampu (Wrynn, Mac Sweeney et al. 2000). Strukturální změny v kortexu, hippocampu a amygdale jsou původci následného kognitivního deficitu po OBX. Podobné rysy byly zaznamenány i u pacientů s depresí. Po OBX byl prokázán úbytek synapsí a dendritických trnů v pyriformním kortexu, CA1 a CA3 oblastech hippocampu, tyto strukturální defekty mohou být napraveny chronickým podáváním antidepresiv (Hall and Macrides 1983, Duman, Heninger et al. 1997, Norrholm and Ouimet 2001). V glutamátergním systému potkanů po OBX byla popsána snížená denzita NMDAR v prefrontální a pyriformním kortexu, thalamických jádrech a amygdale (Dennis, Beauchemin et al. 1994). Zároveň po podání

antagonistů NMDAr OBX potkanům nedochází k zvýšení lokomotorické aktivity (Redmond, Kelly et al. 1995). Všechna tato fakta naznačují hypofunkci glutamatergního systému u OBX. Oproti tomu denzita GABA<sub>A</sub> receptorů je zvýšená (Dennis, Beauchemin et al. 1993). Z hlediska neurochemie byla popsána snížená koncentrace noradrenalinu, která může být napravena rovněž chronickým podáním antidepresiv (desipramin a sertalin); (Song and Leonard 1994, Song and Leonard 1995). Není překvapivé, že u potkanů po OBX byly zjištěny změny v serotoninergním systému nejvíce patrné v amygdale a frontálním kortexu. Dále byl zaznamenán pokles hladiny 5-hydroxyindolacetátu (metabolit serotoninu); (Lumia, Teicher et al. 1992, Redmond, Kelly et al. 1997). Behaviorální změny jsou u OBX potkanů patrné zejména hyperlokomocí, zvýšenou exploračí prostředí a hyperaktivitou (van Riezen and Leonard 1990). Kognitivní deficit se projevuje zejména zhoršenou prostorovou orientací v Morrisově vodním bludišti (MWM) a radiálním bludišti, který může být napraven chronickým podáním antidepresiv (Wang, Noda et al. 2007, Morales-Medina, Juarez et al. 2013). Z důvodu změn intelektu je OBX používán i jako model Alzheimerovy choroby, kde je degenerace čichového epitelu jedním z prvních příznaků (Devanand, Michaels-Marston et al. 2000). Zároveň u potkanů po OBX byla popsána i zvýšená hyperfosforylace tau proteinu, kognitivní a paměťový deficit a především neurodegenerace, která je přítomna zároveň i u hypoxicko-ischemického a excitotoxického poškození (Mucignat-Caretta, Bondi et al. 2006, Nakajima, Yamakuni et al. 2007, Hu, Wang et al. 2012).

### **2.7.2 Animální modely neuroprotektce**

Validní animální modely zaměřené na testování potenciálně neuroprotektivních látek představují velmi důležitou součást neurovědního výzkumu. Na základě jejich volby se odvíjí následující experimenty a případný postup testovaných látek do klinických zkoušek. V předložené práci se vyskytují dva modely zohledňující neuroprotektivní účinek použitých molekul. Konkrétně unilaterální a bilaterální NMDA léze a fokální ischemie dorzálního hipokampu u mláďete potkana. Model NMDA léze selektivně postihuje NMDAr. Jelikož v první řadě je nutno znát účinek testovaných látek na tyto konkrétní receptory, vybrali jsme arteficiální model NMDA léze vhodný k testování farmak (PAh-Pim, takrim a jeho analog 7-MEOTA). Na druhou stranu fokální ischemie indukovaná lokalizovanou infuzí endothelinu-1 do nezralé mozkové tkáně je blíže klinickým projevům. Tento model byl použit k probádání neuroprotektivního účinku PG v perinatálním období, jelikož neuroaktivní steroidy mohou představovat věkově vázaná farmaka. Zároveň z předchozí práce jsme měli potvrzený jeho neuroprotektivní efekt na NMDA lézi u dospělého potkana.

#### **2.7.2.1 NMDA léze**

Jak již bylo řečeno excesivní aktivace NMDAr vede vtoku iontů Ca<sup>2+</sup> do buňky, které spouští signální kaskády vedoucí k formaci volných radikálů, cytokinů, aktivaci fosfolipáz, endonukleáz, kaspáz a následné buněčné smrti vinou excitotoxického působení Glu (Sattler and Tymianski 2001). Excitotoxicita je společný rys pro většinu patologií CNS např. pro ischemicko-hypoxické poškození, traumatické poškození a neurodegenerativní onemocnění.

Technika lézí je v neurobiologickém výzkumu dobře popsána, slouží k lokalizovanému poškození určité struktury a tím pádem k objasnění její funkce behaviorálními testy. Z metodického hlediska samotný Glu nemůže být použit pro lézi kvůli jeho rychlé metabolizaci, která znemožní jeho dlouhodobý účinek, proto se používá NMDA. NMDA léze byly v minulosti hojně používané pro výzkum zapojení hipokampu do paměťových procesů a učení, kdy bylo prokázáno narušení paměti při bilaterálním poškození hipokampu (Ferbinteanu and McDonald 2001). Rozsah destrukce struktury pak záleží na použité koncentraci roztoku NMDA a celkovém objemu tekutiny. V případě infuze roztoku NMDA do hipokampu dochází k bezprostřednímu vzniku epileptických záchvatů, narušení paměťových funkcí a prostorové orientace (Zaczek and Coyle 1982, Dillon, Qu et al. 2008). NMDA léze hipokampu zároveň také vhodným modelem pro testování potenciálně neuroprotektivních látek (Rambousek, Bubenikova-Valesova et al. 2011).

#### 2.7.2.2 Fokální ischemie indukovaná aplikací endothelinu-1 do nezralé mozkové tkáně

Perinatální období je rizikové pro vznik hypoxicko-ischemického infarktu, který se vyskytuje v 1 cca 2300 narození (Schulzke, Weber et al. 2005). Infarkt v takto raném věku je jednou z nejčastějších příčin smrti, v případě přežití vede k celoživotním následkům v podobě motorického či kognitivního deficitu a případných epileptických záchvatů.

Přesně lokalizovaná infuze endothelinu-1 (ET-1) je považována za vhodný model hypoxicko-ischemického infarktu. ET-1 je peptid složený z 21 aminokyselin klasifikovaný jako nejsilnější přírodní vazokonstriktor (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). V minulosti bylo experimentálně zjištěno, že aplikace ET-1 do těsné blízkosti *arteria cerebri media* vede k podobným změnám jako přímá okluze této arterie (Macrae, Robinson et al. 1993, Roof, Schielke et al. 2001). Podání ET-1 do mozkové tkáně vede ke zvýšené koncentraci Glu a následnému excitotoxickému poškození nervové tkáně, následované rozvojem ischemické léze a epileptických záchvatů. Mátéffyová et al. popsala vliv unilaterální aplikace 40 pmol ET-1 do dorzálního hipokampu u 12-denního mláděte potkana (P12). Během prvních 100 min u zvířat po infarktu došlo k rozvoji konvulzivních epileptických záchvatů, následně po dvou měsících bylo zaznamenáno zhoršení prostorové paměti a ve třech měsících u 62,5 – 100% zvířat přetrvávaly spontánní záchvaty nekonvulzivního charakteru. Podání ET-1 do dorzálního hipokampu u P12 je reprodukovatelný model perinatálního ischemicko-hypoxického infarktu (Mateffyova, Otahal et al. 2006).

## 3 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Zastřešujícím tématem celé práce je výzkum účinku syntetických molekul modulujících inhibičně NMDA receptory. Tyto molekuly jsou si podobné svojí neurobiologií, vlastnostmi a mechanismem účinku. Celkovým cílem práce je prozkoumat a kriticky zhodnotit potenciální terapeutické využití těchto látek na preklinické úrovni u onemocnění CNS spojených s excitotoxickým poškozením, ischemickým infarktem a depresí.

### 3.1 Neuroprotektivní efekt podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů

Perinatální ischemický infarkt vede k velmi vážným celoživotním neurologickým následkům v podobě motorických či kognitivních deficitů či vzniku epilepsie. Podkladem těchto neuropatologických změn je masivní uvolnění Glu. Neuroaktivní steroid PG use-dependentním způsobem preferenčně inhibuje tonicky aktivované NMDAR zodpovědné za excitotoxické působení Glu a zároveň pozitivně alostericky ovlivňuje GABA<sub>A</sub> receptory. Na druhou stranu je všeobecně známým faktem, že látky ovlivňující NMDAR a GABA<sub>A</sub> receptory jsou pro vyvíjející se mozek toxické (Ikonomidou, Bosch et al. 1999, Ikonomidou, Bittigau et al. 2000). Předložená studie analyzuje potenciální neurotoxicitu PG a jeho neuroprotektivní efekt v animálním modelu fokální ischemie v perinatálním období (P12).

#### 3.1.1 Hypotéza:

Neurosteroidy představují přirozeně se vyskytující modulatory neurotransmiterových receptorů ve vývoji. Podání PG (syntetický analog PS) v modelu fokální cerebrální ischemie u mládřat potkana povede k redukci poškození postiženého dorzálního hipokampu díky, jelikož molekula PG je negativní alosterický modulator NMDAR a zároveň pozitivní alosterický modulator GABA<sub>A</sub> receptorů.

#### 3.1.2 Cíle práce:

- Vyloučit potenciální neurotoxické působení PG u P12 v porovnání s látkou MK-801 (pozitivní kontrola neurotoxicity).
- Vyhodnotit potenciální neuroprotektivní efekt neuroaktivního steroidu PG v modelu fokální cerebrální ischemie vyvolané infuzí endothelinu-1 do dorsálního hipokampu u P12.

## **3.2 Neuroprotektivní vliv pregnanolon hemipimelátu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu**

Tonicky aktivované NMDAr přispívají k excitotoxickému poškození nervové tkáně, které je asociované s pozdějšími neurologickými nálezy. Přírodně vyskytující se neurosteroid PS inhibující NMDAr je v mozku hydrolyzován. Proto by jeho podání v případě excitotoxických změn, by nevedlo k neuroprotektivnímu účinku. Z tohoto důvodu byly syntetizovány různé deriváty pregnanolon sulfátu s odlišnou délkou alifatického řetězce na substituentu C3 končící karboxylovou skupinou. V průběhu studie bylo demonstrováno, že odlišnost síly inhibice tonických vs. fázických receptorů je závislá na délce substituentu na C3.

### **3.2.1 Hypotéza:**

Podání derivátu PS s nejdelším substituentem na C3 (PAh-Pim) povede k ovlivnění hlavně tonicky aktivovaných NMDAr a následně i k redukci kognitivního deficitu vyvolaného bilaterální NMDA lézí.

### **3.2.2 Cíl práce:**

- Kriticky zhodnotit neuroprotektivní potenciál neuroaktivního steroidu PA-hPim v modelu excitotoxického poškození hipokampu (bilaterální NMDA-léze) vyvolávajícího kognitivní deficit paměťových funkcí.



### **3.3 Porovnání neuroprotektivního efektu takrinu, 7-metoxyderivátu takrinu a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu**

THA byl v minulosti první schválenou látkou pro léčbu Alzheimerovy choroby s předpokládaným vlivem primárně na cholinergní systém. Nicméně krátce poté byl stažen z trhu kvůli hepatotoxickým účinkům (Watkins, Zimmerman et al. 1994). Zároveň však byl popsán napěťově závislý účinek THA s relativně nízkou afinitou k NMDAr. Později byl syntetizován 7-metoxyderivát THA (7-MEOTA) postrádající toxicitu u zvířat i zdravých dobrovolníků bez dopadů na kognitivní funkce (Soukup, Jun et al. 2013). Studie porovnává vliv THA a 7-MEOTA na různé typy NMDAr a zároveň zkoumá potenciální neuroprotektivní účinek THA a 7-MEOTA v porovnání s memantinem v modelu unilaterální NMDA-léze.

#### **3.3.1 Hypotéza:**

Infuze THA / 7-MEOTA / memantinu spolu s roztokem NMDA do dorsálního hipokampu povede k redukci poškození nervové tkáně vyvolané lézí díky schopnosti těchto molekul inhibovat NMDAr.

#### **3.3.2 Cíl práce:**

- Zjistit a porovnat vliv aplikace THA, 7-MEOTA a memantinu na neurodegenerativní změny nervové tkáně v modelu excitotoxického poškození dorzálního hipokampu vyvolaného unilaterální infuzí NMDA.

### **3.4 Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR**

Ketamin je nonkompetitivním antagonistou NMDAr. Již delší dobu je znám jeho antidepresivní účinek s rychlou dobou nástupu, přetrvávající po dobu jednoho týdne (Zarate, Singh et al. 2006). Tento antidepresivní efekt však nemůže být vysvětlen výhradně jeho navázáním na NMDAr. Jedno z potenciálních zdůvodnění tohoto jevu je aktivace signální dráhy mTOR účastníci se regulace buněčného cyklu, proliferace, transkripce a proteosyntézy. Antidepresivní efekt ketaminu může být zablokovan podáním imunopresiva rapamycinu působícího na mTORC1 (z angl. mammalian target of rapamycin complex 1). Objasnění mechanismu antidepresivního účinku ketaminu by mohlo vést k výzkumu nových generací látek s rychlým antidepresivním účinkem.

#### **3.4.1 Hypotéza:**

Aplikace ketaminu v modelu OBX povede k aktivaci signální kaskády mTOR. Tato aktivace bude blokována včasným podáním rapamycinu před administrací samotného ketaminu.

#### **3.4.2 Cíl práce:**

- Otestovat potenciálně antidepresivní účinek ketaminu v animálním modelu deprese způsobené olfaktorickou bulbektomií a posoudit roli signální dráhy mTOR v antidepresivním účinku ketaminu.

# 4 MATERIÁL A METODY

## 4.1 Chemikálie a roztoky

### 4.1.1 *3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamát a pregnanolon hemipimelát*

Obě látky jsou syntetickými analogy přirozeně se vyskytujícího PS s přednostní inhibicí tonicky aktivovaných NMDAr. PG i PA-hPim byly připraveny na Ústavu organické chemie a biochemie oddělením Steroidních inhibitorů Akademie věd České Republiky a jejich čistota byla opakovaně kontrolována pomocí nukleární magnetické rezonance a tentovrstevné chromatografie. Vzhledem k jejich steroidnímu charakteru byly rozpuštěny v roztoku 88 mM  $\beta$ -cyklodextrinu (CDX, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) v požadovaných dávkách podle jednotlivých experimentů. Jejich pH bylo následně upraveno na 7,4 pomocí NaOH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

### 4.1.2 *THA, 7-MEOTA a memantin hydrochlorid*

7-MEOTA byla syntetizována Centrem biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové podle předem popsaného protokolu (Dejmek, 1990), její čistota byla detekována pomocí tenkovrstevné chromatografie. THA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), memantin hydrochlorid (Abcam, Cambridge, UK) a 7-MEOTA byly rozpuštěny na finální koncentraci 30  $\mu$ M ve sterilním fyziologickém roztoku (0,9% NaCl). Roztoky byly rozděleny na 10  $\mu$ m aliquoty a uskladněny při – 20 °C do doby dalšího použití.

### 4.1.3 *Ketamin*

Použitý roztok ketaminu o dávce 10 mg/kg podaný i.p. potkanům po olfaktorické bulbektomii vznikl zředěním ketaminu o dávce 100 mg/kg (Narketan, Vetoquino1, UK) pomocí fyziologického roztoku.

### 4.1.4 *Rapamycin*

Potkanům po olfaktorické bulbektomii byl rovněž podáván rapamycin (ApexBio, Houston, USA) rozpuštěný v DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Roztok DMSO a rapamycinu byl poté postupně doplněn fyziologickým roztokem tak aby výsledná koncentrace DMSO byla 20% a dávka rapamycinu 1mg/kg.

### 4.1.5 *Fosfátový pufr obohacený o soli (PBS) pro přípravu NMDA a endothelinu-1*

Jedna tableta PBS (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) byla rozpuštěna ve 200 ml redestilované vody a následně sterilizována pomocí filtrace (filtr s velikostí pórů 0,22  $\mu$ m). Roztok o koncentraci 10 mM a pH 7,4 byl rozdělen na aliquoty a uskladněn při – 20 °C do doby dalšího použití.

#### **4.1.6 Roztok NMDA použitý pro indukci excitotoxické léze**

Excitotoxické poškození dorzálního hipokampu bylo indukováno 25 mM roztokem NMDA, který vznikl smísením NMDA (Abcam, Cambridge, UK) spolu se sterilním 10 mM PBS. Roztok s upraveným pH na 7,4 byl rozdělen na aliquoty a uskladněn při – 20 °C do doby dalšího použití.

#### **4.1.7 Endotelin – 1 pro indukci fokálního ischemického poškození**

Fokální ischemie byla indukována intrahipokampální infuzí ET-1 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) rozpuštěného ve sterilním 10 mM PBS. Finální dávka ET-1 byla 40 pmol v 1 µl. Roztok byl rozdělen na malé aliquoty a uskladněn při – 20 °C do doby dalšího použití.

#### **4.1.8 Fosfátový pufr 0,2 M (PB)**

0,2 M roztok PB obsahoval: 101 mM roztok Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O a 205 mM roztok Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (obojí Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Druhý roztok byl k první přidáván postupně za účelem úpravy pH na hodnotu 7,4.

#### **4.1.9 0,01 M PBS pro účely transkardiální perfuze**

0,01 M PBS za účelem vyčištění cirkulárního systému od krve během transkardiální perfuze byl připraven smísením: 50 ml roztoku 0,2 M PB, 8,76 g NaCl a 0,2 g KCl (obojí Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Hodnota pH roztoku byla 7,4.

#### **4.1.10 4% Paraformaldehyd (PFA) pro transkardiální perfuzi**

40 g PFA (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) bylo rozpuštěno v 400 ml redestilované vody za stálého míchání a při teplotě 70 °C. Pro vyčeření a lepší rozpuštění bylo k roztoku přidáno pár kapek 0,2 M NaOH (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Roztok byl ihned zfiltrován, obohacen o 500 ml 0,2 M PB a doplněn na objem 1000 ml redestilovanou vodou. 4 % PFA skladovaný v tmavých lahvích při 4 °C byl připraven vždy nejdříve 24h před plánovanou transkardiální perfuzí či v den perfuze samotné.

#### **4.1.11 Sacharóza**

Pro kryoprotekci mozkové tkáně po transkardiální perfuzi byly použity 10, 20 a 30% roztoky sacharózy rozpuštěné v 0,1 M PB (připravené z 0,2 M PB) obohaceném o NaN<sub>3</sub> (vše Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

#### **4.1.12 Pufr lýzující mononukleární krevní buňky po separaci médiem Ficoll-Paque Plus**

Roztok lýzující mononukleární krevní buňky po separaci médiem Ficoll-Paque Plus obsahoval: 100ml 50 mM Tris HCl (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 10 g glycerolu (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 1% Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 44 mg kyseliny askorbové (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 5 mg sojového trypsinového inhibitoru (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 0,5 mg leupeptinu (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 0,5 mg

aprotininu (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 2 ml setu koktejlu proteázových inhibitorů III (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

## **4.2 Zvířata**

### **4.2.1 Experimenty na dospělých potkanech**

Všechny experimenty byly dělány na dospělých samcích potkanů kmene Wistar (250 – 350 g). Potkani byli drženi v kontrolovaném prostředí (teplota  $22 \pm 1$  °C, vlhkost 50 – 60%, světelný režim se světelnou fází vždy od 06:00 do 18:00) s volným přístupem k potravě a vodě. Experimenty byly provedeny v souladu se směrnicí Evropské Unie 2010/63/EU a schváleny Komisí pro péči a použití zvířat. Péče o zvířata a experimentální postupy jsou prováděny v souladu se směrnicemi ČR.

### **4.2.2 Experimenty na mláďatech**

Experimenty byly provedeny na dvanáctidenních mláďatech samců potkanů (P12) kmene Wistar. Den narození byl definován jako den 0. Mláďata byla držena v kontrolovaném prostředí (teplota  $22 \pm 1$  °C, vlhkost 50 – 60%, světelný režim se světelnou fází vždy od 06:00 do 18:00) spolu s matkou s volným přístupem k potravě a vodě. Experimenty byly schváleny Komisí pro péči a použití zvířat. Péče o zvířata a experimentální postupy jsou prováděny v souladu se směrnicemi ČR.

## **4.3 Protokoly operací u použitých animálních modelů**

### **4.3.1 NMDA léze dorzálního hipokampu**

Dospělý potkan kmene Wistar byl před zahájením operace umístěn do operačního boxu pro indukci anestezie isofluranem o koncentraci 3,5% (Abbot Laboratories, Illinois, USA). Poté byl přemístěn a upevněn do stereotaktického aparátu (TSE Systems, Bad Homburg vor der Höhe, Germany) s přívodem isofluranu a anestezie byla snížena. Oči byly překryty očním gelem (Visidic, Bausch Lomb, New York, USA) a operační pole bylo vydesinfikováno. Následně byl proveden iniciační řez na povrchu hlavy a očištění pojivové tkáně na povrchu lebky. Otvor pro infuzi NMDA 25 mM byl vyvrtán na koordinátách dorzálního hipokampu AP = - 4,0 mm, ML = 2,5 mm směrem od bregmy (Paxinos G. 2004). Aplikace NMDA byla provedena pomocí injekční stříkačky Hamilton (701n, 26G, Hamilton, USA) v hloubce DV = 4,6 mm za použití infuzní pumpy (TSE Systems, Bad Homburg vor der Höhe, Germany) s konstantní rychlostí 0,25  $\mu$ l/min. Kontrolám byl podán 10 mM PBS ve stejném objemu jako NMDA s totožnou rychlostí infuze.

#### *4.3.1.1 Modifikace NMDA léze dorsálního hipokampu pro experimenty s PA-hPim*

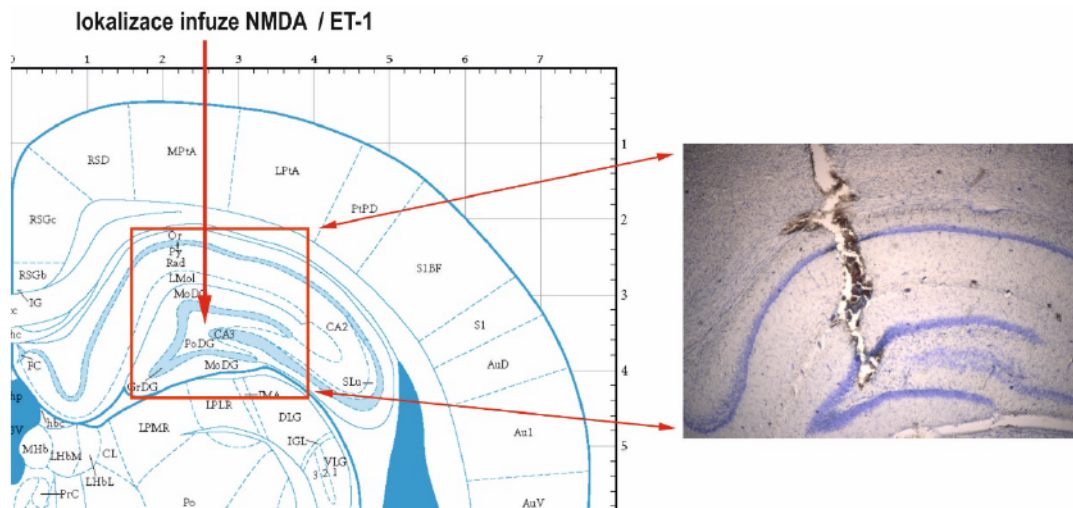
Z důvodu pozdějších behaviorálních testů byla NMDA léze provedena bilaterálně se shodnými koordinátami (AP = 4,0 mm; ML = ± 2,5 mm; DV = 4,6 mm). Objem 25 mM roztoku NMDA aplikovaný do každého hipokampu byl 1 µl. PA-hPim byl podán intraperitoneálně v dávce 1 mg/kg 5 min od ukončení infuze NMDA. Kontrolní zvířata místo PA-hPim obdržela 88 mM CDX. Po operaci měla zvířata volný přístup k vodě obsahující analgetika i k potravě (Nurofen pro děti, Reckitt Benckiser, ČR). Behaviorální testování v Morrisově vodním bludišti (MWM) následovalo týden po operaci.

#### *4.3.1.2 Modifikace NMDA léze pro experimenty s THA, 7-MEOTA a memantinem*

Aliquoty roztoků THA, 7-MEOTA a mematinu (MEM) o koncentraci 30 µM byly smíchány 25 mM NMDA v poměru 1 : 1 bezprostředně před operací. Následná směs byla aplikována unilaterálně do pravého dorsálního hipokampu (AP = - 4,0 mm; ML = 2,5 mm; DV = 4,6 mm) v celkovém objemu 2 µl. Levá hemisféra v tomto případě sloužila jako kontrola pro histologické zpracování FJB. Po operaci měla zvířata volný přístup k vodě obsahující analgetika i k potravě. Transkardiální perfuze následovala 24 h od excitotoxického inzultu.

#### *4.3.2 Fokální ischemie u mláďat P12 indukovaná intrahipokampální infuzí ET-1*

12-denní mláďata byla do operační místnosti přinesena spolu s matkou. Pro indukci anestezie bylo mládě přeneseno do boxu a uspáno pomocí isofluranu 2,5%. Poté bylo přeneseno a upevněno do stereotaktického aparátu (Kopf Instruments, Tujunga, USA) s přívodem isofluranu a anestezie byla snížena. Kůže byla rozstřížena, lebka očištěna a kanyla (Plastic One Inc., San Diego, USA) pro podání ET-1 byla umístěna unilaterálně do pravého dorsálního hipokampu (AP = - 3,7 mm; ML = 3,0 mm; DV = 3,5 mm) viz obr. 4.3.2. Koordináty byly individuálně přepočteny pro každé zvíře dle vzdálenosti bregma – lambda (Paxinos, Watson et al. 1985). ET-1 v dávce 40 pmol v celkovém objemu 1 µl byl aplikován pomocí infuzní pumpy s konstantní rychlostí 0,25 µl. Minutu po ukončení infuze byla kanyla vyjmuta a kůže byla zalepena organickým lepidlem (Collodium, Penta, Praha, ČR) a anestezie byla ukončena. PG v dávce 1 a 10 mg/kg byl podán 5 min od aplikace ET-1. Po operaci bylo mládě uloženo na 2,5 h do plastového boxu na vyhřívací destičku s kontrolou teploty a poté vráceno matce. Kontrolní zvířata obdržela 1 µl 10 mM PBS místo ET-1 a 88 mM CDX místo PG ve stejném objemu jako testovanou látku.



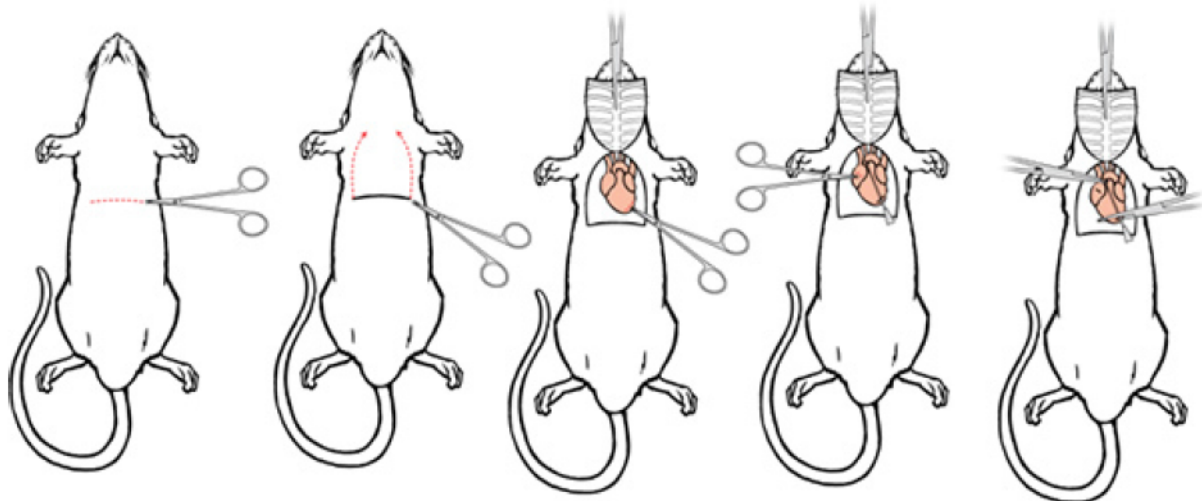
**Obr. 4.3.2:** Schématické znázornění umístění infuze 25mM roztoku NMDA či ET-1 o dávce 40 pmol/ $\mu$ l a verifikace její polohy v dorzálním hipokampu na obarveném řezu (Nissl). Upraveno podle (Paxinos G. 2004).

#### 4.3.3 Olfaktorická bulbektomie a následující časové uspořádání experimentu pro hodnocení aktivity mTOR

Dospělý potkan kmene Wistar byl uspán isofluranem 3,5% v boxu a poté přendán a upevněn do stereotaktického aparátu (TSE Systems, Bad Homburg vor der Höhe, Germany). Hladina isofluranu během operace byla 2%, pro lokální anestezii byl použit mesocaine 1% (Zentiva, Praha, ČR), a oči byly překryty očním gelem. Operační pole bylo vydesinfikováno a iniciační řez kůže byl proveden nad oblastí olfaktorických bulbů. Otvory pro odsátí olfaktorických bulbů byly vyvrtány bilaterálně (AP = + 8,0 mm, ML =  $\pm$  2,5 mm); (Paxinos G. 2004). Olfaktorické bulby byly odsáty zatuppenou hypodermickou jehlou spojenou s vodní pumpou. Krvácení vzniklé během odsávání bylo zastaveno, poté rána byla překryta lokálním antibiotikem Framycoín (Zentiva, Praha, ČR). Sham-operovaná zvířata podstoupila tu samou proceduru bez odsátí bulbů. Po operaci měla zvířata volný přístup k vodě obsahující analgetika i k potravě. Odběry krve byly provedeny 3 týdny po operaci. Tato doba je v literatuře uváděna jako vhodná pro ustanovení depresivního fenotypu u operovaných zvířat. Zvířata po olfaktorické bulbektomii (OBX), nebo sham-operovaná zvířata obdržela jednu i.p. injekci ketaminu (10 mg/kg) nebo fyziologického roztoku či ko-aplikaci ketamin 10 mg/kg a rapamycin 1 mg/kg nebo ko-aplikaci fyziologického roztoku a rapamycinu 1 mg/kg. Rapamycin 1 mg/kg byl vždy podán 30 min před aplikací ketaminu či fyziologického roztoku. Všechna zvířata obdržela stejný objem tekutiny na 1 kg živé váhy (1 ml/kg). Vzorky krve z ocasní žíly pro pozdější izolace periferních krevních mononukleárních buněk byly odebrány v časech 0 a 30 min po systémovém podání látek. Ze zpracovaných krevních vzorků se poté analyzovala míra fosforylovaného mTOR. Po ukončení behaviorálních experimentů byla zvířata dekapitována pro určení úspěšného provedení OBX.

#### 4.4 Transkardiální perfuze

Pro budoucí histologické zpracování pomocí barvení FJB bylo nutné provést fixaci tkáně pomocí transkardiální perfuze. Výhodou této přímé fixace přes oběhový systém je přirozený transport fixativa (4 % PFA) pomocí cévní sítě do celého organismu. Nejprve bylo zvíře předávkováno směsí anestetik Narketan (Vetoquinol, UK) a Rometar (Bioveta, ČR). Poté mu byl otevřen hrudní koš a prostřížena bránice, aby se uvolnil přístup k srdci. Zatupená jehla (18G) spojená s peristaltickou pumpou (Gilson, Middleton, USA) byla zavedena do levé komory a zajištěna svorkou. Následně byla prostřížena pravá srdeční předsíň. Tímto bylo zvíře připraveno na transkardiální perfuzi (znázorněno na obr. 4.4). Nejprve musí dojít k vymytí krve z oběhového systému pomocí vytemperovaného roztoku 0,01 M PBS na 37 °C. Poté co byla krev vymyta, bylo přistoupeno k fixaci tkáně vychlazeným roztokem 4% PFA. Tento roztok byl po celou dobu perfuze uložen v ledové lázni. Na počátku této fixační části u zvířete pozorujeme tremor. Spotřeba roztoků byla přibližně 100 ml 0,01 M PBS a 500ml 4% PFA na dospělého potkana, v případě P13 mláděte tato spotřeba činí 30 ml 0,01 M PBS a 100 ml 4% PFA. Po fixaci těla bylo nutné opatrně vyndat mozek z lebky a provést postfixaci tkáně jejím ponořením 4% PFA na 24 h při 4 °C. Následně tkáň musela být ochráněna před jejím roztrháním v mrazu pomocí kryoprotekce vzestupnou koncentrační řadou roztoků sacharózy (10, 20 a 30%) opět při 4 °C. Kryoprotekce je dokončena, když mozek klesne v roztoku 30% sacharózy na dno nádoby. Poté byl mozek zmrazen v suchém ledu a uskladněn do – 80 °C.



**Obr. 4.4:** Schématické znázornění transkardiální perfuze. Nejprve dochází k předávkování zvířete a následnému otevření hrudního koše. Poté je do levé komory zavedena hadička napojená na peristaltickou pumpu. Tělo je postupně promýváno 0,01M PBS a fixačním roztokem 4% PFA. Převzato z (Gage, Kipke et al. 2012).



## 4.5 Histologické zpracování tkáně

Mozek uložený v  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  byl přenesen do kryokatu (Leica, Wetzlar, Německo) vytemperovaného na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , teplota nože byla také  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Zde byl ponechán 1 hod a následně nakrájen na  $50\text{ }\mu\text{m}$  silné koronární řezy do 5ti sérií řezů. Pro barvení Fluoro Jade B (FJB) byla vždy vybrána jedna série řezů. Tyto řezy byly nataženy na želatinou pokrytá skla (P-LAB, Praha, ČR) a sušeny při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  do druhého dne, kdy probíhalo barvení FJB.

### 4.5.1 Fluoro Jade B

FJB (Histo-Chem, Arkansas, USA) je polyanionický fluoresceinový derivát, který se specificky váže na degenerující buňky nervové tkáně. Jeho excitační maximum je při  $480\text{ nm}$  a emisní maximum při  $525\text{ nm}$ . Fluorescenční filtr určený pro vizualizaci FJB je FITC. FJB je rychlá a spolehlivá metoda pro jednoznačnou kvalitativní detekci neurodegenerace. Jedinou nevýhodou je jeho neschopnost rozlišení apoptózy a nekrózy (Schmued and Hopkins 2000).

Želatinová skla sušená přes noc při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  byla inkubována 3 min v 99% ethanolu, poté 3 min v 70% ethanolu a 2 min v  $\text{H}_2\text{O}$ . Následně byly řezy ponořeny v 0,06% roztoku  $\text{KMnO}_4$  po dobu 15 min a poté dvakrát propláchnuty v  $\text{H}_2\text{O}$ . Dále byly umístěny do uzavíratelného černého světlo nepropouštějícího boxu s 0,001% FJB v roztoku 0,1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  na 30 min na mírné kývání. Takto obarvené řezy byly třikrát propláchnuty v  $\text{H}_2\text{O}$  a sušeny přes noc při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro projasnění a odvodnění byly ponořeny do xylenu a poté zalepeny krycími skly. Veškeré chemikálie krom FJB byly zakoupeny u Sigma Aldrich, St. Louis, USA.

### 4.5.2 Skórování řezů s FJB

Pro určení rozsahu poškození v hipokampu po ischemii či excitotoxické lézi jsme provedli okulometrické skórování v následujících oblastech: CA1, CA3, *hilus* a granulární vrstvy *gyrus dentatus* (DG). Škála poškození byla od stupně 0 do stupně 4 podle následujících hodnot: 0 = 0–5% poškozených buněk v dané oblasti; 1 = 6–25%; 2 = 26–50%; 3 = 51–75%; 4 = >75%. Hodnoceny byly vždy postupně všechny řezy z dané obarvené série, na kterých se nalézal hipokampus (celkově tedy 1/5 hipokampu) ve všech popsanych strukturách (Kleteckova, Tsenov et al. 2014).

## 4.6 Morrisovo vodní bludiště

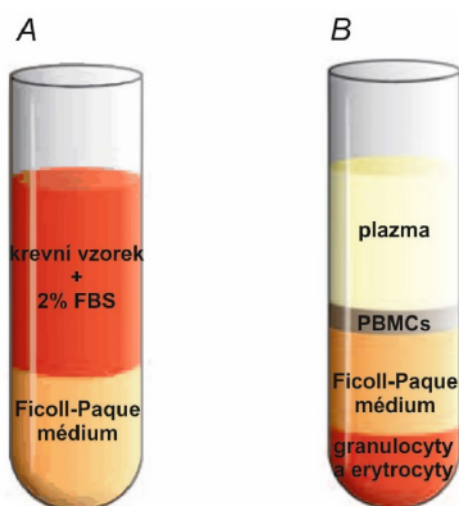
Aparatura pro MWM se skládá z černého kruhového bazénu ( $210 \times 40\text{ cm}$ ) naplněného čistou vodou o teplotě  $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Průhledná platforma o průměru  $10\text{ cm}$  byla umístěna  $1,0\text{ cm}$  pod hladinu vody v jihozápadním kvadrantu a zůstala zde po celou dobu trvání experimentu. Úkolem zvířete bylo tuto platformu najít a zapamatovat si její pozici. Zvíře bylo vypouštěno z jednoho z osmi směrů v tomto pořadí: NW, NE, SE, W, S, N, SW a E a následně byl měřen čas, za který zvíře platformu objevilo. Experiment trval po sobě jdoucí 4 dny. V případě nenalezení platformy do 60 s osoba provádějící experiment potkana na ní navedla a ponechala ho na místě 30 s. Po každé plavbě byl potkan osušen a umístěn do boxu položeného na vyhřívací

dečce. Všechny jednotlivé plavby byla nahrávána kamerou umístěnou nad středem MWM. Video byla analyzována pomocí softwaru Ethovision XT10 (Noldus, Wageningen, Nizozemsko).

## 4.7 Molekulární metody

### 4.7.1 Izolace periferních krevních mononukleárních buněk pomocí média Ficoll-Paque Plus

Periferní krevní mononukleární buňky (PBMCs) jsou jakékoli krevní buňky obsahující oválné buněčné jádro tj. lymfocyty a monocyty. Jejich izolaci jsme provedli pomocí média Ficoll-Paque Plus (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Krev byla potkanům odebrána z ocasu do zkumavek obsahujících EDTA (BD Vacutanier) a poté zředěna stejným objemem roztoku sterilního 10 mM PBS obohaceného o 2% Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma Aldrich St. Louis) o pokojové teplotě. Takto zředěná krev byla opatrně navrstvena na médium Ficoll-Paque Plus ve zkumavce a centrifugována (400 g, 20 °C, 30min, zrychlení 9, bez brzdy). Po této centrifugaci došlo k separaci mononukleárních buněk od granulocytů, erytrocytů a krevní plazmy. Rozdělení vrstev je znázorněno na obr. 4.7.1. Granulocyty a erytrocyty mají vyšší hustotu a proto sedimentují skrz médium během centrifugace. Mononukleární buňky s nižší hustotou poté zůstávají na rozhraní plazmy a separačního média. Vrchní část tvořená plasmou byla opatrně odsáta a mononukleární buňky byly odebrány. K takto připraveným PBMCs byl přidán opět roztok sterilního 10 mM PBS s 2% FBS a vzorek byl dvakrát pročištěn (centrifugace 400 g, 20 °C, 10 min). Supernatant byl odstraněn a peleta PBMCs ponechána a uložena do – 80 °C. Poté proběhla lýze PBMCs buněk.



**Obr. 4.7.1:** Schématické znázornění rozdělení vrstev krevního vzorku před první centrifugací (A) a po ní (B). Po této centrifugaci je odstraněna krevní plazma a nadále pracujeme jen s vrstvou PBMCs. Převzato a upraveno podle oficiálního návodu výrobce GE Healthcare.

#### **4.7.2 ELISA pro analýzu aktivity mTOR**

Aktivita fosforylovaného mTOR byla měřena v buněčném lyzátu PBMCs pomocí komerčně dostupného kitu K-LISA™ mTOR (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Peleta byla dvakrát promyta 50 mM Tris HCl (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Následně byl přidán pufr lýzující mTOR a vzorek byl inkubován 20 min na ledu. Buněčný lyzát byl přečištěn přidáním agarózových kuliček proteinu A (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), inkubován 15 min na ledu a centrifugován (4000 g, 4 °C, 5 min). Lyzát byl přendán do čisté epenforfky, do které jsme následně napipetovali Anti – mTOR FRAP monoklonální protilátku (součást kitu K-LISA™ mTOR). Vzorek byl inkubován 1 h na ledu na třepačce. Poté byl opět ke vzorku přidán Protein A a inkubován 75 min. Tyto kroky způsobili navázání imunoprecipitovaného mTOR na Protein A. Vzorek byl centrifugován (4000 g, 4 °C, 5 min) a supernatant byl pečlivě odstraněn, dále jsme pracovali jen s peletou. Tato peleta byla promyta pomocí 2x Kinase Assay promývacího pufru (součást kitu K-LISA™ mTOR) a supernatant pečlivě odstraněn. K peletě byly přidány následující komponenty přesně v tomto pořadí: 2x Kinase Assay promývací pufr a mTOR substrát (součást kitu K-LISA™ mTOR) a vzorek byl inkubován 30 min při 30 °C. K ukončení reakce byl poté použit Kinase Stop solution (součást kitu K-LISA™ mTOR) a vzorek byl centrifugován (4000 g, 4 °C, 5 min). Supernatant byl poté přenesen do čisté zkumavky a umístěn do – 80 °C.

Standardy i vzorky byly nanášeny na glutationem potaženou 96-jamkovou destičku a inkubovány po dobu 60 min při 30 °C. Obsah jamek byl následně odstraněn a dvakrát promyt promývacím roztokem (součást kitu K-LISA™ mTOR). Na destičku byl poté nanášen roztok Anti-p70S6K-T389 (součást kitu K-LISA™ mTOR). Vzorky byly inkubovány 1 h při pokojové teplotě. Destička byla třikrát promyta promývacím roztokem, obohacena o HRP Antibody-Conjugate (součást kitu K-LISA™ mTOR) a opět inkubována po dobu 1 h. Následovalo další promytí a přidání TMB Substrátu (součást kitu K-LISA™ mTOR), inkubace 5 min. Probíhající reakce byly zastaveny pomocí ELISA Stop Solution. Nakonec byla změřena absorbance při 450 nm s referenční vlnovou délkou 595 nm na spektrofotometru (Victor, Work Out version 2.5, Perkin Elmer, USA).

### **4.8 Analýza a statistické zpracování dat**

#### **4.8.1 Experiment 1 (Neuroprotektivní efekt PG)**

Zde jsme museli statisticky porovnat potenciálně neuroprotektivní účinek PG v modelu fokální ischemie dorzálního hipokampu u mláďat P12. Vstupní data tvořila skóre průměrného poškození pro každý mozek v celkem čtyřech strukturách CA1, CA3, hilus, DG ve stupni od 0 do 4 (1 = 6–25%; 2 = 26–50%; 3 = 51–75%; 4 = >75%). Měli jsme tedy čtyři jednotlivá skóre od (0 do 4) pro každou strukturu. Tato jednotlivá skóre jsme sečetli, abychom dostali celkové poškození pro každý hipokampus, maximální rozsah poškození byl vyjádřen hodnotou 16. Statistická analýza pro porovnání odlišných skupin zvířat byla provedena pomocí neparametrického testu Mann Whitney U test. Všechny parametry byly analyzovány pomocí

programu SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Hodnocena byla vždy 1/5 postiženého pipokampu. Míra statistické signifikance byla akceptována jako  $p < 0,05$  (obr. 5.1.2). Prezentované výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  střední chyba průměru (SEM).

#### **4.8.2 Experiment 2 (Neuroprotektivní efekt PA-hPim)**

V tomto experimentu jsme zjišťovali potenciálně neuroprotektivní efekt PA-hPim na rozsáhlé excitotoxické poškození způsobené bilaterální lézí roztokem NMDA dorzálního hipokampu u dospělého potkana. Zvířata týden po tomto zákroku podstoupila test prostorové paměti a učení MWM, kde bylo jejich úkolem najít a zapamatovat si polohu skryté platformy. Vstupními daty byla videa jednotlivých plaveb. Kontrolní zvířata, která obdržela bilaterální infuzi 10 mM PBS místo 25 mM NMDA a itaktní zvířata (bez jakékoli operační zátěže), se nijak statisticky nelišila. Proto byly tyto dvě skupiny ve statistickém porovnání sjednoceny v jednu. Pro vyhodnocení tohoto testu jsme použili dvoucestnou analýzu variance (ANOVA). Signifikance byla detekována pomocí Student-Newman-Keuls post hoc testu, efekt testujícího dne  $p < 0,001$ , efekt skupiny  $p = 0,113$ , interakce  $p < 0,004$  (obr. 5.2.2). Výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  SEM.

#### **4.8.3 Experiment 3 (Neuroprotektivní efekt THA, 7-MEOTA a memantinu)**

Stejně jako v případě Experimentu 1 vstupní data tvořila skóre z hipokampálních struktur: CA1, CA3, hilus, horní část granulární vrstvy DG (DGh) a spodní část granulární vrstvy DG (DGl). Skóre z těchto struktur byla zprůměrována a sečtena. Maximální hladina poškození byla vyjádřena hodnotou 20. Pro analýzu poškození v jednotlivých hipokampálních strukturách bylo provedeno pět separátních jednocestných ANOVA testů (tab. 5.3.2). Signifikance byla detekována pomocí Tukey's post hoc testu. Pro analýzu porovnání celkového poškození byla provedena jednocestná ANOVA s post-hoc testy (obr. 5.3.3). Byla hodnocena vždy 1/5 poškozeného hipokampu. Prezentované výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr  $\pm$  SEM. Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA).

#### **4.8.4 Experiment 4 (Aktivace signální dráhy mTOR po podání ketaminu)**

Krev pro následnou přípravu vzorků na ELISA měření jsme odebírali v před aplikací látek ( $t = 0$ ), 30 min po aplikaci ( $t = 30$  min) a 24 h po aplikaci ( $t = 24$  h). Měření absorbance při 450 nm bylo vyjádřeno v procentech výchozí hodnoty absorbance v čase 0 (definováno jako 100% absorbance). Pro vyhodnocení byla použita dvoucestná ANOVA. Byl detekován efekt použitých látek  $F(3, 72) = 4,36$ ;  $p = 0,007$  a bulbektomie  $F(1, 72) = 15,7$ ;  $p = 0,0002$  stejně jako jejich interakce  $F(3, 72) = 3,454$ ;  $p = 0,0209$ . Statistická analýza byla provedena v programu GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Neuroprotektivní efekt podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů

Tato část dizertace se věnuje nejprve vyloučení excitotoxického efektu PG u mláďete potkana a poté zkoumá jeho neuroprotektivní účinek v modelu fokální cerebrální ischemie. Uvedené výsledky jsou součástí publikace „*Neuroprotective effect of the 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate treatment in the model of the focal cerebral ischemia in immature rats*“ zveřejněné v časopise *Neuroscience Letters* (Kleteckova, Tsenov et al. 2014).

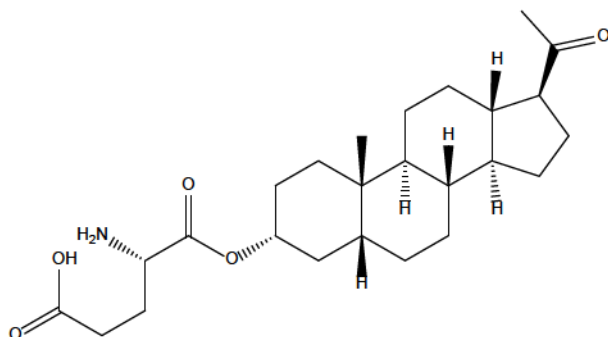
#### 5.1.1 Vyloučení možného neurotoxického vlivu PG na nedospělou mozkovou tkáň

Nejdříve musel být vyloučen neurotoxický efekt PG (struktura PG zobrazena na obr. 5.1.1) ve věku P12. Z literatury je známo, že látky ovlivňující NMDAR a GABA<sub>A</sub> receptor, způsobují u nezralého mozku rozsáhlá ložiska apoptózy. Intaktní zvířatům byl systémově podán PG v dávkách 1 a 10 mg/kg. Pro porovnání účinku se známým antagonistou NMDAR jsme zvolili aplikaci MK-801 v dávce 1 mg/kg. Kontroly obdržely stejný objem vehikula. Degenerace byla detekována pomocí barvení FJB. U zvířat s aplikovaným PG nebyla zaznamenána žádná známka neurotoxicity ani u jedné z použitých dávek bez ohledu na pozorovanou strukturu. Na druhou stranu podání MK-801 ve věku P12 vedlo k objevení neurodegenerujících buněk v anteroventrálních, anterodorzálních a mediodorzálních jádrech thalamu, dále pak v prelimbickém, infralimbickém, cingulárním a retrosplenálním kortexu a subikulu.

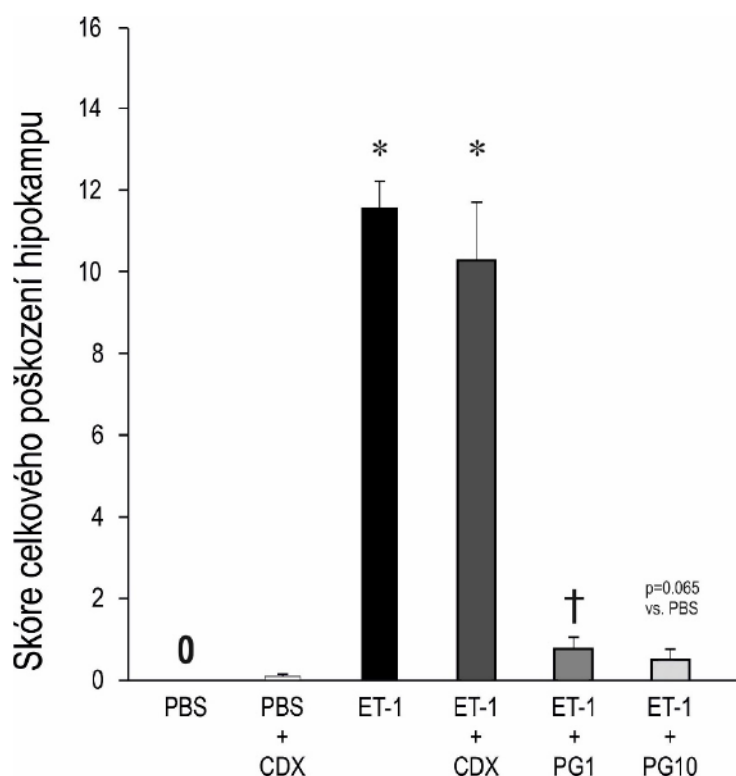
#### 5.1.2 Prokázání neuroprotektivního účinku PG v animálním modelu fokální ischemie u potkaních mláďat

Druhou část studie tvoří zjištění potenciálního neuroprotektivního efektu PG v animálním modelu ischemie u P12. Jelikož PG působí jako alosterický inhibitor NMDAR bez žádných nepříznivých účinků na nezralou mozkovou tkáň, rozhodli jsme se tuto molekulu otestovat v modelu fokální ischemie dorzálního hipokampu způsobené unilaterální infuzí 40 pmol ET-1. PG v obou dávkách (1 i 10 mg/kg) byl podán i.p. 5 min od ukončení ischemického inzultu. Tento model jsme zvolili díky dobré reprodukovatelnosti poškození, které vyvolává. Intrahipokampální infuze samotného ET-1 vedla po 24 h k rozsáhlému rozvoji ischemické léze v horizontu 24 h (skupina ET-1 průměrné skóre 11,56  $\pm$  0,66). V případě skupiny zvířat s ischemií a následnou aplikací CDX (vehikulum) bylo celkové poškození 10,25  $\pm$  1,45. Systémově podaný neuroaktivní steroid PG výrazně redukoval poškození a to v obou dávkách 1 i 10 mg/kg. Tato redukce se zvyšovala spolu se zvyšující se dávkou PG. Celkové skóre poškození u zvířat s infuzí ET-1 a následnou aplikací PG 1 mg/kg bylo 0,74  $\pm$  0,31 a u zvířat s PG 10 mg/kg 0,46  $\pm$  0,29. Graf shrnující celkové poškození hipokampu ve všech experimentálních strukturách je znázorněn na obr. 5.1.2. Distribuce FJB-positivních buněk byla signifikantně ( $p < 0,05$ ) snížena ve všech vyhodnocených hipokampálních substrukturách u zvířat s PG (reprezentativní fotografie řezů na obr. 5.1.3). Kromě hipokampu se poškození nalézalo i v dorzálních jádrech thalamu u 87,5% zvířat ve skupině ET-1 a u 80% ve skupině ET-1 + CDX. Podání PG v dávce 1mg/kg vedlo ke snížení četnosti zasažení thalamu na 50%

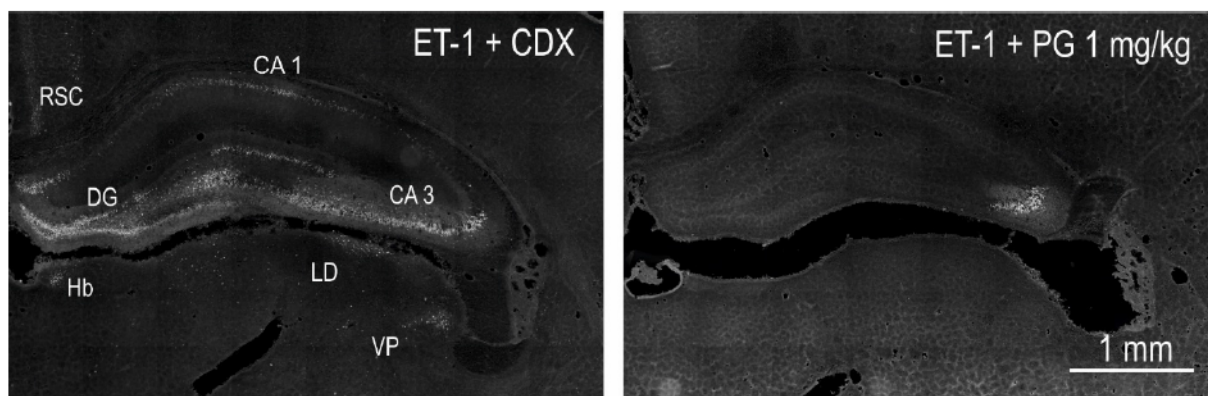
( $p = 0,044$ ) a PG 10 mg/kg redukovala tento faktor dokonce na 12,5% ( $p < 0,001$ ). U obou skupin s infundovaným PBS místo ET-1 jsme zaznamenali pouze zanedbatelné množství FJB-  
 pozitivních buněk v okolí kanyly.



**Obr. 5.1.1:** Struktura studovaného 3α5β-pregnanolon glutamátu.



**Obr. 5.1.2:** Celkové poškození v zasaženém hipokampu. Na ose Y je znázorněna výše průměrného poškození. Osa X reprezentuje sloupce odpovídající jednotlivým experimentálním skupinám: PBS ( $n = 5$ ); PBS + CDX ( $n = 6$ ); ET-1 ( $n = 11$ ); ET + CDX ( $n = 6$ ); ET-1 + PG 1 mg/kg ( $n = 12$ ); ET-1 + PG 10 mg/kg ( $n = 8$ ). \* - signifikantní rozdíl ( $p < 0,001$ ) ve srovnání s PBS, PBS + CDX, ET-1 + PG1 a ET-1 + PG10; † – signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) ve srovnání s PBS. Byla prokázána signifikantní redukce poškození po podání PG v obou použitých dávkách. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SEM.



**Obr. 5.1.3:** Fluoro Jade B – pozitivní buňky hipokampu 24 h po ischemickém infarktu způsobeném infuzí ET-1 nebo v kombinaci s i.p. podaným PG. Na levé straně řez s infuzí ET-1 následovanou i.p. podáním CDX (celkové skóre 11,42). Neurodegenerativní buňky se nalézají ve všech hodnocených oblastech. Na pravé straně je zobrazen hipokampus mláděte ET-1 + PG 1 mg/kg (celkové skóre 0,83). Rozsah poškození je zde zcela zřetelně redukován na minoritní část oblasti CA3. DG – *gyrus dentatus*, CA3 a CA1 – hipokampální substrukтуры, Hb – *habenula*, LD – laterodorzální thalamus, RSC – retrosplenální granulózní kortex, VP – ventroposterolaterální thalamická jádra.

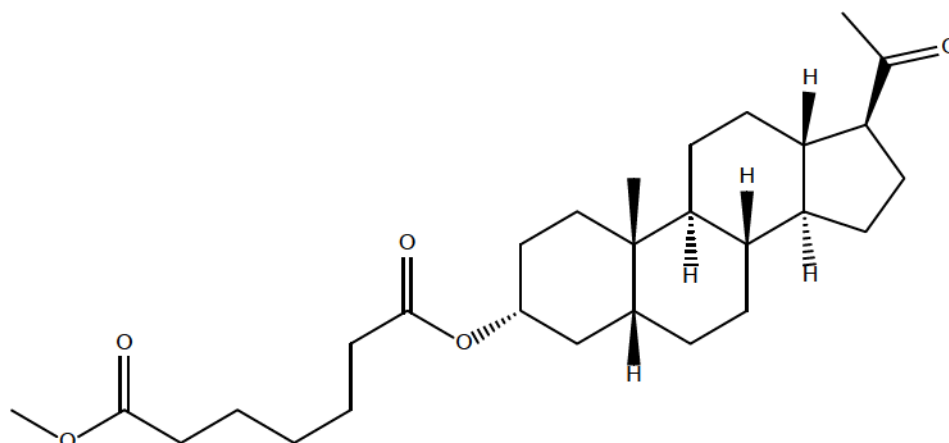
## 5.2 Neuroprotektivní vliv pregnanolon hemipimelátu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu

Cílem naší části v této studii bylo podat přesvědčivý důkaz, zda jednorázové podání PA-hPim může redukovat kognitivní defekty a poruchy učení vzniklé v důsledku bilaterální NMDA léze hipokampu u dospělých potkanů. Popsané výsledky jsou součástí článku „*Preferential inhibition of tonically over phasically activated NMDA receptors by pregnane derivatives*“ publikovaného v *The Journal of Neuroscience* (Vyklícky, Smejkalova et al. 2016).

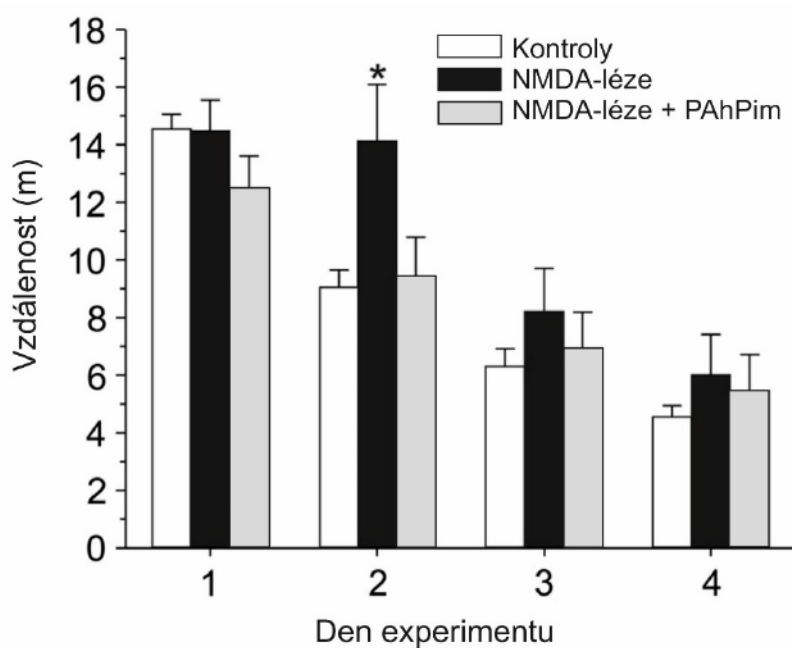
Tato studie popisuje inhibici PS a jeho derivátů na tonicky a fázičky aktivovaných NMDAr. Tonicky aktivované receptory jsou spjaty s excitotoxickým poškození během akutních i chronických patologických podmínek. Z výsledků práce je patrné, že PS a jeho syntetické deriváty s větší účinností inhibují tonicky aktivované NMDAr. Tento faktor se zvyšuje s rostoucí délkou substituentu uhlíkového řetězce na C3, testovaným analogem s nejdelším C3-substituentem byl PA-hPim. Z těchto důvodů byl PA-hPim vybrán jako kandidátní molekula pro zjištění jeho neuroprotektivního potenciálu *in vivo* v modelu bilaterální NMDA léze hipokampu. Z výsledků doplňujících studií je patrné, že podání PA-hPim je bezpečné a nezpůsobuje žádné vedlejší psychotomimetické efekty. Struktura PA-hPim je zobrazena na obr. 5.2.1.

Neuroprotektivní potenciál PA-hPim na behaviorální úrovni byl prokázán testem prostorového učení MWM. Porovnávali jsme tři experimentální skupiny: kontrolní zvířata, zvířata s NMDA-lézí a zvířata s NMDA-lézí a systémově aplikovaným PA-hPim 1 mg/kg. Naše výsledky ukázaly, že všechny skupiny jsou schopny se naučit polohu skrytého ostrůvku. Nicméně skupina zvířat s NMDA-lézí vykazovala pomalejší učení patrné zejména v druhém dnu probíhajícího experimentu MWM. Intraperitoneální podání PA-hPim 1 mg/kg 5 min po ukončené NMDA lézi eliminovalo vzniklý kognitivní deficit. Výsledky jednotlivých experimentálních skupin shrnuje obr. 5.2.2.





**Obr. 5.2.1.:** Struktura aplikovaného pregnanolon hemipimelátu.



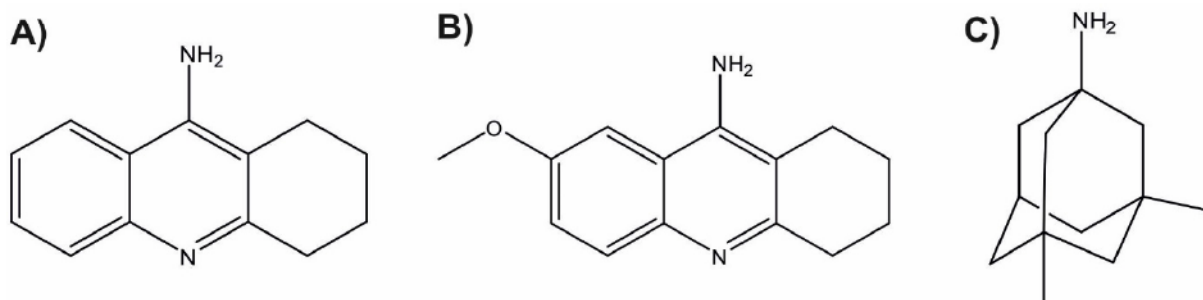
**Obr. 5.2.2:** Efekt systémového podání PA-hPim 1 mg/kg na excitotoxické poškození vyvolané NMDA-lézi v testu MWM. Osa X zobrazuje všechny experimentální skupiny v jednotlivých dnech experimentu: kontrolní zvířata (n = 24), zvířata s bilaterální NMDA lézí (n = 11), zvířata s bilaterální NMDA lézí a následně systémově podaným PA-hPim 1mg/kg (n = 8). Osa Y udává celkovou vzdálenost uplavanou potkanem k nalezení skryté platformy. Druhý den se u zvířat s NMDA-lézí vyskytuje deficit v učení, zatímco i.p. podání PA-hPim je schopno tento deficit blokovat. Signifikance byla detekována pomocí Student-Newman-Keuls post hoc testu, efekt testujícího dne  $p < 0,001$ , efekt skupiny  $p = 0,113$ , interakce  $p < 0,004$ . \* – signifikantní rozdíl zvířat s NMDA-lézí definovaný post-hoc testem. Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SEM.

### 5.3 Porovnání neuroprotektivního efektu takrinu, 7-derivátu takrinu a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu

V této nedávné studii byl zkoumán vliv inhibičního působení THA a jeho 7-methoxyderivátu 7-MEOTA na NMDAr. Součástí práce je také porovnání neuroprotektivního účinku THA a 7-MEOTA s terapeuticky využívaným memantinem (MEM) v modelu NMDA-léze. Článek „*7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo*“ byl v současné době publikován v časopise *Neuropharmacology* (Kaniakova, Kleteckova et al. 2018).

Studie popisuje inhibici THA a 7-MEOTA na NMDAr. Jejím klíčovým nálezem je, že obě látky jsou blokátory otevřeného kanálu NMDAr s typem inhibičního mechanismu tzv. „foot-in-the-door“. Dalším důležitým objevem je silnější inhibice NMDAr v případě 7-MEOTA oproti THA. Na tuto část studie navazují naše neuroprotektivní experimenty srovnávající účinek THA, 7-MEOTA a memantinu (MEM) v modelu unilaterální NMDA-léze dorzálního hipokampu. Struktury THA, 7-MEOTA a MEM jsou zobrazeny na obr. 5.3.1.

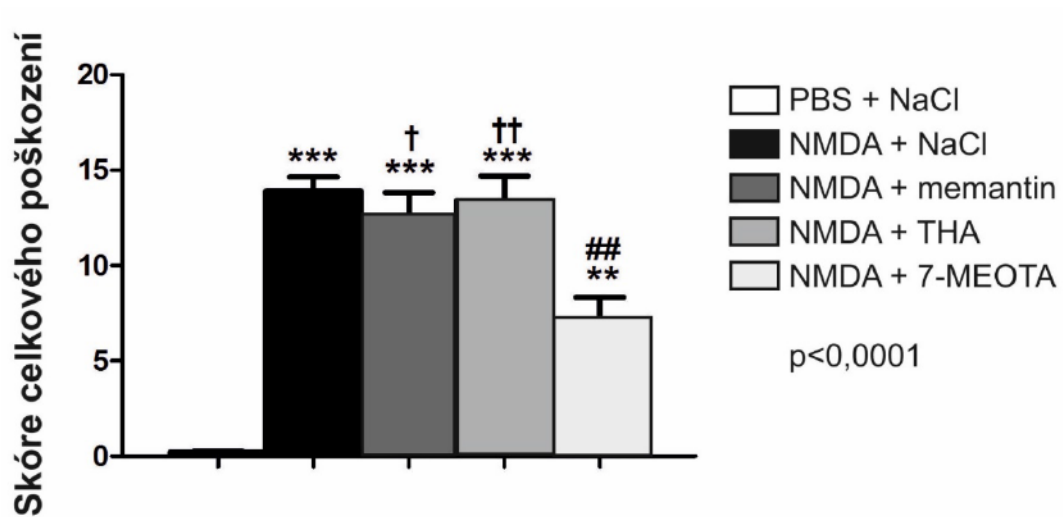
Jak již bylo řečeno, intrahipokampální infuze NMDA vede k rozsáhlému excitotoxickému poškození dané oblasti. Na základě elektrofyziologických výsledků jsme se rozhodli otestovat THA, 7-MEOTA a MEM v popsaném modelu NMDA-léze. Aplikovali jsme dohromady v směs roztoků 25 mM NMDA spolu s 30  $\mu$ M látkou (THA / 7-MEOTA / MEM). Kontrolní zvířata obdržela 10 mM PBS místo 25 mM NMDA a sterilní fyziologický roztok. Celkově bylo v experimentu pět skupin: PBS + NaCl, NMDA + NaCl, NMDA + MEM, NMDA + THA a NMDA + 7-MEOTA. Počet zvířat v každé skupině byl vyšší než 5. Zvířata byla perfundována 24 h po zákroku, řezy byly obarveny FJB a jednotlivé hipokampální substruktury (CA1, CA3, hilus, DGh, DGl) oskórovány. NMDA-léze samotná způsobila podle očekávání silné excitotoxické poškození patrné ve všech částech hodnoceného hipokampu. Podání THA a MEM nevedlo k redukci neurodegenerace, ve srovnání s tímto nálezem po aplikaci 7-MEOTA jsme zaznamenali signifikantní neuroprotektivní efekt této látky. 7-MEOTA snížila celkové poškození hipokampu, nejsilnější efekt jejího podání byl pozorován v oblastech CA3 a hilus, nicméně neurodegenerace byla též snížena v CA1 (tab. 5.3.2). Látky THA a MEM se ukázaly jako nedostatečné k eliminaci excitotoxické léze v tomto animálním modelu. Výsledky pro jednotlivé míry poškození ve všech hodnocených strukturách jsou znázorněny v tabulce 5.3.2, graf celkového poškození pak v obr. 5.3.3. Zároveň byly vyfoceny řezy ze všech experimentálních skupin (obr. 5.3.4).



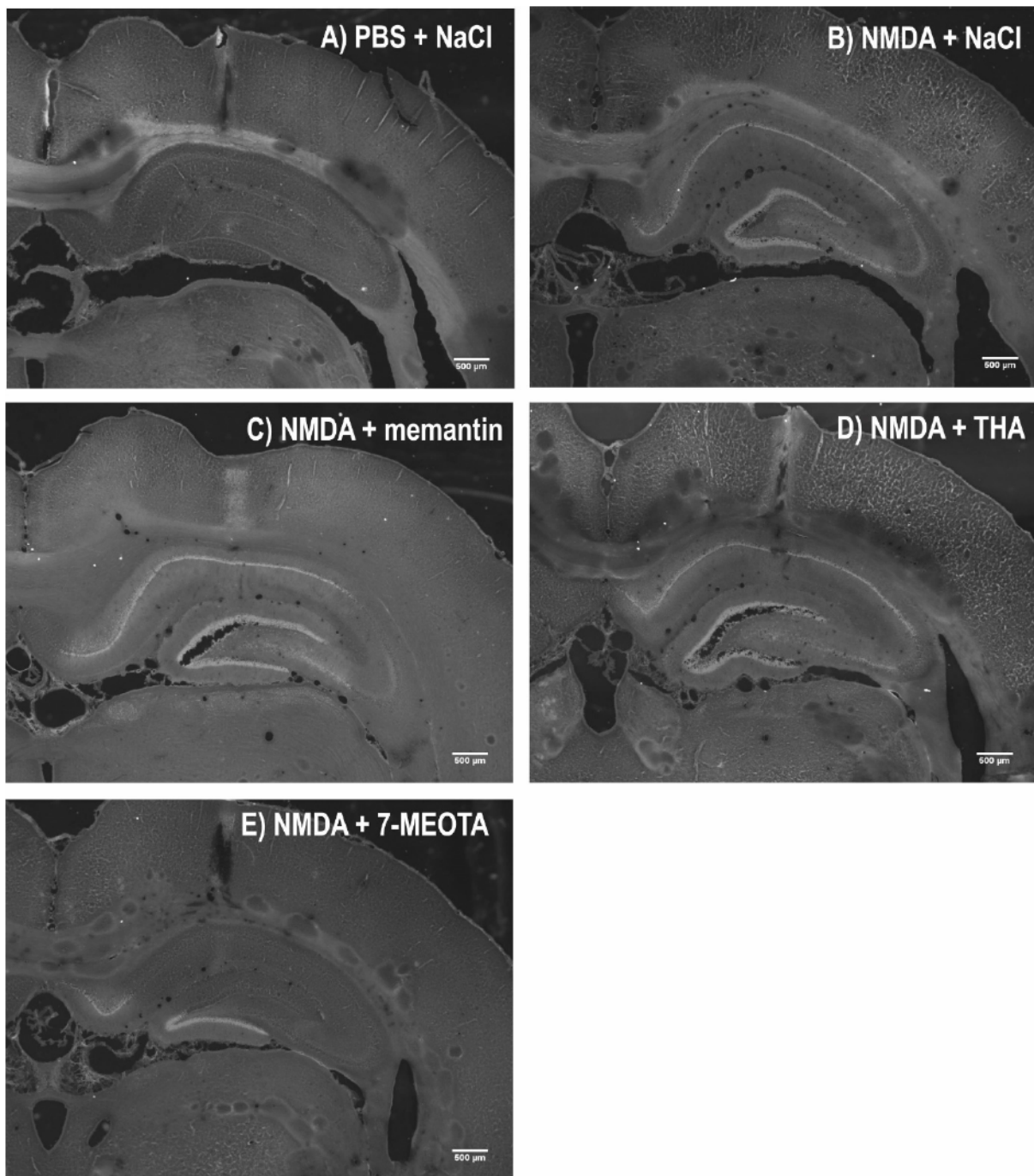
Obr. 5.3.1: Struktury studovaných látek A) THA, B) 7-MEOTA a C) memantin.

	DGl	DGh	Hilus	CA3	CA1
<b>PBS+NaCl</b>	0±0	0.04±0.03	0.13±0.04	0.02±0.02	0.04±0.02
<b>NMDA+NaCl</b>	2.97±0.17***	2.58±0.17***	3.38±0.10***	2.35±0.09***	2.62±0.27**
<b>NMDA+MEM</b>	3.27±0.16***	2.09±0.34**	3.04±0.27***†††	2.33±0.27***††	1.81±0.50*
<b>NMDA+THA</b>	3.33±0.1***	2.45±0.56***	2.97±0.15***†††	2.59±0.11***†††	2.04±0.59*
<b>NMDA+7-M</b>	3.05±0.07***	1.17±0.27	1.36±0.43*###	1.12±0.32**###	0.50±0.15#
<b>Signifikance</b>	$p < 0.0001$	$p = 0.0002$	$p < 0.0001$	$p < 0.0001$	$p = 0.0007$

Tab. 5.3.2: Průměrná skóre jednotlivých hipokampálních oblastí ve všech experimentálních skupinách. Hodnoceny byly následující hipokampální oblasti: DGl, DGh, hilus, CA3 a CA1. Bylo provedeno pět separátních jednocestných ANOVA testů následovaných Tukey's post hoc testem \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  v porovnání s PBS + NaCl; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  v porovnání s NMDA + NaCl; †† $p < 0,05$ , ††† $p < 0,001$  v porovnání NMDA + 7-MEOTA.  $\geq 5$  zvířat bylo použito pro každou experimentální skupinu. Z každého hipokampu byla hodnocena 1/5 (17-21 řezů). Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SEM.



**Obr. 5.3.3:** Celkové poškození v postiženém hipokampu. Na ose Y je znázorněna výše průměrného poškození. Osa X reprezentuje sloupce odpovídající jednotlivým experimentálním skupinám. Pro analýzu porovnání celkového poškození byla provedena jednocestná ANOVA s post-hoc testy (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$  versus skupině PBS + NaCl; †  $p < 0,01$ ; ††  $p < 0,05$  vs. NMDA + 7-MEOTA; ##  $p < 0,01$  vs. NMDA + NaCl). Počet zvířat v každé skupině byl vyšší než 5. Data jsou zobrazena jako průměr ± SEM.



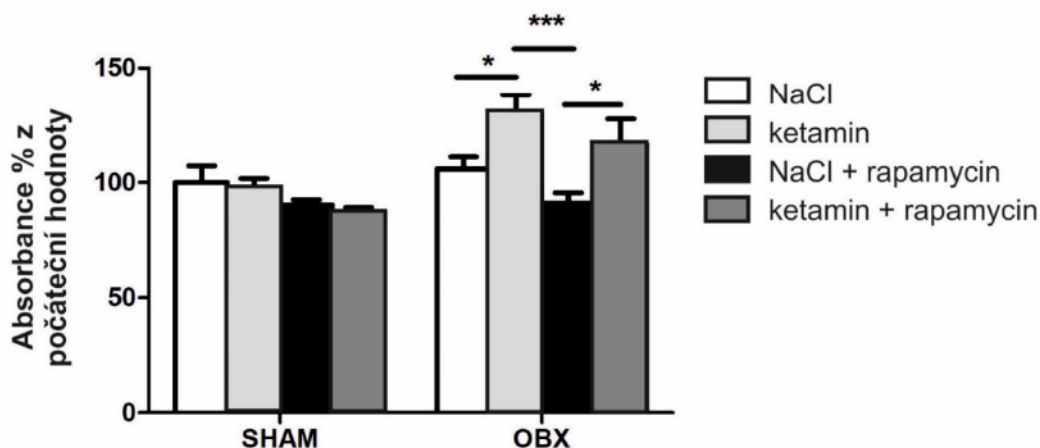
**Obr. 5.3.4:** Reprezentativní fotografie řezů poškozeného hipokampu s FJB-pozitivními neurodegenerativními buňkami 24 h po excitotoxickém inzultu způsobeném infuzí 25 mM NMDA dorzálního hipokampu. Testovaná látka v koncentraci 30  $\mu$ M (THA / 7-MEOTA / MEM) byla aplikována spolu s roztokem NMDA. Neurodegenerativní buňky u skupiny NMDA + NaCl se nalézají ve všech hodnocených oblastech. A) PBS + NaCl celkové poškození 0,20; B) NMDA + NaCl celkové poškození 13,45; C) NMDA + memantin celkové poškození 13,04; D) NMDA + THA celkové poškození 15,25; E) NMDA + 7-MEOTA celkové poškození 4,15.

## 5.4 Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR

V této práci byl zkoumán antidepresivní účinek ketaminu v animálním modelu deprese (olfaktorická bulbektomie - OBX) a propojení toho efektu se signální drahou mTOR. Výsledky byly publikovány v článku „*Rapamycin blocks the antidepressant effect of ketamine in task-dependent manner*“ v časopise *Psychopharmacology* (Holubova, Kleteckova et al. 2016).

OBX vede k rozsáhlým neurochemickým a neurodegenerativním změnám vyúsťujících v depresivní chování u potkana tři týdny od operace. V experimentu byly použity následující skupiny zvířat: OBX + NaCl (n=10), OBX + ketamin 10 mg/kg (n=10), OBX + NaCl + rapamycin 1 mg/kg (n=10), sham-operovaná zvířata + NaCl (n=12), sham-operovaná zvířata + ketamin 10 mg/kg (n=8), sham-operovaná zvířata + NaCl + rapamycin (1 mg/kg) a sham-operovaná zvířata + ketamin 10mg/kg + rapamycin 1 mg/kg (n=14) pro analýzu aktivity mTOR v čase 30 min. Pro analýzu v čase 0 bylo použito OBX n=12 a sham-operovaná n=10.

Měření absorbance probíhalo při 450 nm. Absorbance v čase 0 min (před aplikací látek) byla použita jako základ. Dvoucestná ANOVA prokázala signifikantní efekt léčby,  $F(3, 72) = 4,36$ ,  $p = 0,007$  i olfaktorické bulbektomie  $F(1, 72) = 15,7$ ,  $p = 0,0002$  stejně jako jejich interakce  $F(3, 72) = 3,454$ ,  $p = 0,0209$ . Post hoc test prokázal signifikantní rozdíl u OBX zvířat, konkrétně mezi OBX + NaCl a OBX + ketamin ( $p < 0,05$ ), mezi OBX + ketamin a OBX + NaCl + rapamycin ( $p < 0,001$ ) a mezi OBX + NaCl + rapamycin a OBX + ketamin + rapamycin ( $p < 0,05$ ). Výsledky jsou zaznamenány na obr 5.4.1.



**Obr. 5.4.1:** Rozdíly v absorbanci (osa Y) před a po aplikaci látek (ketamin 10 mg/kg, rapamycin 1 mg/kg, fyziologický roztok) u sham-operovaných zvířat a OBX (osa X). Systémové podání látek způsobilo změny v množství fosforylovaného mTOR u zvířat s OBX. Úroveň fosforylovaného mTOR byla signifikantně vyšší u OBX zvířat ve srovnání s kontrolami. Aplikace ketaminu vedla ke zvýšené aktivaci mTOR u OBX ve srovnání se zvířaty OBX + NaCl nebo OBX + NaCl + rapamycin. Nicméně ko-aplikace ketaminu + rapamycinu u OBX zvířat nezpůsobila očekávanou redukci úrovně mTOR a rapamycin tak neeliminuje účinek ketaminu. Data jsou zobrazena jako průměr ± SEM. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## 6 DISKUZE

### 6.1 Neuroprotektivní efekt podání 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů

Hledání nových potenciálně neuroprotektivních látek pro léčbu onemocnění CNS je jedním předním témat současného výzkumu. Cílem předložené studie bylo prokázat bezpečnost podání PG u nezralé mozkové tkáně a zároveň prozkoumat možnosti jeho terapeutického využití v animálním modelu fokální ischemie dorzálního hipokampu u dvanáctidenních mlád'at potkana.

Naším prvním nálezem byla nulová neurotoxicita u P12 po systémové aplikaci PG intaktním zvířatům a to v obou dávkách 1 i 10 mg/kg. Pozitivní kontrolou neurotoxicity bylo podání MK-801 v dávce 1 mg/kg. Jak již bylo řečeno MK-801 je nonkompetitivní antagonist NMDAr silně neurotoxický pro vyvíjející se nervovou tkáň, stejný efekt vykazují i jiné látky ovlivňující NMDAr např. ketamin a PCP a zároveň i agonisté GABA<sub>A</sub> receptoru (Ikonomidou, Bosch et al. 1999, Ikonomidou, Bittigau et al. 2000). Jejich důsledkem jsou rozsáhlá apoptotická ložiska ve vyvíjejícím se mozku, postižení konkrétních struktur závisí na postnatálním dnu aplikace. Senzitivita k MK-801 v nezralé tkáni je vysoká mezi P0 a P3, ještě více se zvyšuje v období P3 až P7 a poté klesá v postnatálních dnech P7 až P14, kdy apoptotické neurony vymizí téměř úplně. Podání MK-801 u P0 spouští apoptózu v *gyrus dentatus*, u P3 v hipokampu, subikulu a laterodorzálním thalamu, u P7 vede zvýšené degeneraci neuronů v hypothalamu, laterodorsálním thalamu, frontálním kortexu, subikulu, *nucleus caudatus*, retrosplenálním, parietálním a cingulárním kortexu (Ikonomidou, Bosch et al. 1999). Zároveň byly popsány i neurodegenerativní změny po MK-801 v dospělé tkáni mladých potkanů projevující se vakuolizací v třetí a čtvrté vrstvě retrosplenálním kortexu (RSC) čtyři hodiny po podání látky (5 a 10 mg/kg), následně morfologické změny přešly do nekrózy (Fix, Horn et al. 1993). MK-801 již v nízké v dávce 1 mg/kg vede ke zvýšené produkci HSP 70 (z angl. heat shock proteins) v posteriorním cingulárním kortexu, což značí výraznou imunoreaktivitu tkáně (Tomitaka, Tomitaka et al. 2000). Krom RSC jsou postiženy i somatosenzorický a entorinální kortex u dávky MK-801 10 mg/kg, nejrozsáhlejší neurodegenerace byla pozorována 72h od podání (de Olmos, Bender et al. 2009). Degenerativní změny jsou více patrné u samic potkanů, kde dávka MK-801 nižší než 3 mg/kg vede ke smrti neuronů v olfaktorických strukturách, hipokampu, parahipokampálním kortexu a již zmíněném RSC (Bueno, de Olmos et al. 2003). Naše výsledky naopak potvrzují, že neuroaktivní steroid PG (syntetický analog PS) negativně alostericky modulující NMDAr a současně pozitivně alostericky modulující GABA<sub>A</sub> receptory (Bukanova, Solntseva et al. 2018), je pro vyvíjející se mozek ve věku P12 bezpečný. Z nepublikovaných výsledků zároveň víme, že jeho neurotoxicita je nulová i v období P9. Nález je ve shodě se studií publikovanou týmem Lima-Ojeda et al v roce 2013. Tato práce je zaměřena na vliv podání látky Ro 25-6981, která je specifickým antagonistou GluN2B podjednotky NMDAr. Tato látka byla aplikována mlád'atům potkana ve věku P7 a následně byly vyloučeny jakékoli projevy apoptózy po jejím působení. Navíc Ro 25-6981 v případě zralého mozku působila neuroprotektivně proti degeneraci nervové tkáně RSC indukované injekcí MK-801

v dávce 2 mg/kg (Lima-Ojeda, Vogt et al. 2013). Na základě těchto faktů můžeme usoudit, že samotná informace o přímém vlivu určité látky na NMDAr nemusí bezpodmínečně znamenat neurotoxické účinky dané molekuly na vyvíjející se nervovou tkáň. Zdá se, že velmi záleží na konkrétním mechanismu s jakým látka NMDAr moduluje. Vždy je však esenciální potenciální neurotoxicitu experimentálně vyloučit stejně jako v případě námi studovaného PG.

Dalším cílem naší studie bylo prozkoumat neuroprotektivní potenciál PG v modelu fokální cerebrální ischemie u mláďat P12. V tomto věku je stádium vývoje mozku potkana podobné lidskému novorozenci. Následky perinatálního ischemického infarktu mohou být fatální v podobě smrti novorozence, či mohou velmi negativně ovlivnit jeho budoucí kvalitu života motorickým či kognitivním deficitem, epilepsií apod. (Volpe 2001). Vznik perinatálního infarktu může mít velmi heterogenní příčiny, navíc jeho farmakoterapie je problematická díky velké variabilitě pacientů. K limitaci následků perinatálního hypoxicko-ischemického poškození se v současné době používá hlavně metoda hypotermie vedoucí ke zpomalení metabolických drah spojených s buněčnou smrtí, oxidačním stresem, zánětlivými procesy a následnou neurodegenerací (Wachtel and Hendricks-Munoz 2011). Medicinální výzkum je proto zaměřen na studium potenciální farmakoterapie použitelné jako hlavní či adjuvantní léčba dopadů tohoto typu infarktů. V experimentálních a klinických studiích jsou zkoumány hlavně látky osteopontin, interferon  $\beta$ , melatonin, erythropoetin (EPO), allopurinol a topiramát.

Osteopontin je multifunkční glykoprotein regulující buněčnou proliferaci, přežívání a diferenciaci oligodendrocytů (O'Regan and Berman 2000). Zároveň byla popsána jeho zvýšená exprese v neonatálním mozku po hypoxicko-ischemickém infarktu (van Velthoven, Heijnen et al. 2011). Za fyziologického stavu je u potkana jeho endogenní koncentrace zvýšená v období kolem narození, ale následně do P21 téměř úplně vymizí (Chen, Ma et al. 2011). Bohužel experimentální studie zaměřená na ischemické poškození u neonatálních myší jeho potenciální neuroprotektivní efekt nepotvrdila (Bonestroo, Nijboer et al. 2015). Podobně tomu bylo i u interferonu  $\beta$ , který působil protektivně při jeho intrastriální infuzi, nicméně intravenózní podání se ukázalo jako neúspěšné (Veldhuis, Floris et al. 2003, Maier, Yu et al. 2006). Zjevnou příčinou tohoto neúspěchu je limitace interferonu  $\beta$  procházet hematoencefalickou bariérou. Další slibnou molekulou byl  $MgSO_4$  vázající místo Mg do iontového kanálu NMDAr (Zeevalk and Nicklas 1992).

Na druhou stranu endogenní melatonin s antioxidačním, protizánětlivým a antiapoptotickým účinkem je schopen do těla plodu projít přes placentu i jeho hematoencefalickou bariéru (Alonso-Alconada, Alvarez et al. 2013). V animálním modelu neonatálního hypoxicko-ischemického poškození byl jeho neuroprotektivní efekt téměř okamžitý a trvalý proti dlouhodobým následkům poškození (Carloni, Perrone et al. 2008). Zároveň s tím v kombinaci s hypotermií redukoval oxidační stres a vedl k lepšímu přežívání buněk (Aly, Elmahdy et al. 2015). Pilotní klinická studie zahrnující 15 pacientů s perinatální hypoxicko-ischemickou encefalopatií léčených hypotermií a 15 pacientů s totožnou diagnózou a terapií v podobě hypotermie kombinované s aplikací melatoninu, prokázala pozitivní efekt melatoninu jako adjuvantní léčby. Při monitoringu pacientů 6 měsíců po infarktu nebyly zjištěny u kombinované léčby žádné neurologické či vývojové abnormality (Aly, Elmahdy et al. 2015). Experimentálně je dále zkoumáno dále působení EPO, který má protizánětlivé,



antiexcitotoxické a antiapoptotické vlastnosti (Villa, Bigini et al. 2003, Wang, Zhang et al. 2004). EPO je exprimován v mozku během vývoje a po narození jeho koncentrace rapidně klesá, spolu s tím byla potvrzena i zvýšená produkce EPO u novorozenců hypoxicko-ischemickou encefalopatií (Juul, Yachnis et al. 1999). V experimentálních studiích *in vivo* podání EPO vedlo k histologickému i funkčnímu zlepšení tkáně u neonatálních potkanů po ischemicko-hypoxickém infultu. Tento účinek byl dávkově závislý (Wu, Bauer et al. 2012). Účinek EPO byl prokázán i u okluze *arteria cerebri media* (MCAO) neonatálních potkanů. Tři po sobě jdoucí dávky EPO 1 U/g i.p. v rozmezí 0, 24h a 7 dní po infultu vedly k zlepšení kognitivních schopností potkanů v dospělém věku 3 měsíce od operace. Tento nález byl potvrzen v testu MWM (Kumral, Uysal et al. 2004).

Mezi další nadějně molekuly patří inhibitor xantin oxidázy allopurinol, který má zároveň i chelatační efekt volné ionty železa nevázané na proteiny a redukuje množství radikálů OH. Jeho neuroprotektivní působení bylo prokázáno jak v animálních modelech, tak v klinických studiích (Peeters-Scholte, Braun et al. 2003). Allopurinol podaný matce prochází přes placentu i hemoencefalickou bariéru. Jedna klinických studií byla zaměřená na novorozence s asphyxií. Použitá dávka allopurinolu 40 mg/kg zlepšila stav a výsledky pacientů v kognitivních i neurologických vyšetřeních. Zároveň signifikantně zmírnila mortalitu (Kaandorp, van Bel et al. 2012). Navazující práce stejných autorů popsala vliv allopurinolu podaný matce během fetální hypoxie. Následně byly zkoumány biomarkery asociované s neonatálním poškozením mozku. Pozitivní účinek allopurinolu byl však patrný pouze u děvčat, kde redukoval zmíněné biomarkery, ne však u chlapců (Kaandorp, Benders et al. 2015). V současné době probíhá klinická studie ALBINO (z angl. Effect of Allopurinol in addition to hypothermia for hypoxic-ischemic brain injury on neurocognitive outcome); (Annink, Franz et al. 2017).

Zároveň probíhá i výzkum zaměřený na látku topiramát, který má především antikonvulzivní působení, ale zároveň je i inhibitorem AMPA a kainátových receptorů a blokátorem Na<sup>+</sup> kanálů (Angehagen, Ronnback et al. 2005, Sfaello, Baud et al. 2005, Guerrini and Parmeggiani 2006). Klinická studie zaměřená na topiramát skončila v červnu tohoto roku. Byly publikovány výsledky shrnující vliv topiramátu jako adjuvantní léčby k hypotermii u novorozenců s hypoxicko-ischemickou encefalopatií. Práce prokázala bezpečnost aplikace topiramátu v ranně postnatálním období, nicméně nebyl prokázán signifikantní účinek topiramátu na mortalitu či vážné neurologické poruchy oproti léčbě samotnou hypotermií. Pozitivním výstupem byl ovšem snížený výskyt epilepsie u pacientů s kombinovanou léčbou. Objasnění efektu topiramátu na hypoxicko-ischemické poškození si proto zaslouží další zkoumání (Filippi, Fiorini et al. 2018).

Na základě předchozích je zřejmý význam vhodně zvoleného animálního modelu. Některé animální modely ischemicko-hypoxického poškození jsou obtížně praktikovatelné v perinatálním období. Ačkoli v případě dospělé tkáně je široce využíván model MCAO. Nepoužili jsme ho, jelikož způsobuje variabilní rozsah a lokalizaci poškození, což ztěžuje hodnocení neuroprotektivního efektu terapeutických látek (McAuley 1995). Existuje rovněž varianta MCAO za použití přesné infuze ET-1, nicméně vzhledem k individuálním odlišnostem mezi jednotlivými mláďaty, by tato infuze mohla vést ke špatné reprodukovatelnosti modelu

(Schaller 2006). Oproti tomu lokalizovaná ischemie dorzálního hipokampu indukovaná infuzí ET-1 může být použita i pro studium dlouhodobých následků ischemického infarktu. Z výsledků předchozího výzkumu víme, že tento model vede k rozvoji epileptických záchvatů s behaviorálními projevy a způsobuje dobře ohraničené morfologické změny tkáně vyúsťující v neurodegenerativní změny v postiženém hipokampu (Mateffyova, Otahal et al. 2006, Tsenov, Mateffyova et al. 2007). Proto jsme se rozhodli prozkoumat terapeutický potenciál PG v tomto modelu.

V předešlé studii jsme popsali neuroprotektivní vliv PG v modelu excitotoxické NMDA-léze hipokampu u dospělých potkanů (Rambousek, Bubenikova-Valesova et al. 2011). V nynější studii jsme prokázali neuroprotektivní efekt PG v animálním modelu fokální ischemie indukované podáním ET-1 do dorzálního hipokampu u P12. Tento účinek se projevoval výraznou eliminací neurodegenerativních buněk v postiženém hipokampu. Naše výsledky jsou v souladu s experimentální studií z roku 2017, kdy podání steroidní molekuly vitamínu D spolu s N-acetylcysteinem vedlo k lepším výsledkům zvířat v motorických testech po neonatálním hypoxicko-ischemickém poškození způsobeném ligací pravé karotidy a jejich následným pobytem v hypoxické komůrce. Léčba měla zároveň pozitivní dopad i v paměťových testech (Lowe, Fraser et al. 2017). Také podání PROG v prenatalním hypoxicko-ischemickém infarktu mělo signifikantně pozitivní účinek. Během osmnáctého dne gravidity potkaní samice byly přechodně podvázány obě uterinní arterie po dobu 30min. Po spontánním porodu v období P1-P9 byl subkutánně mláďatům podán PROG v dávce 0,01 či 0,1 mg/kg nebo ALLO 0,1 mg/kg, každý den obdržela jednu injekci. Následně byl zjištěn pozitivní efekt PROG i ALLO v motorických testech (v období P50). Zároveň byla zaznamenána i zlepšená myelinizace v případě PROG (Kawarai, Tanaka et al. 2018). V minulosti popsán i neuroprotektivní efekt unkompetitivního antagonisty NMDAR memantinu v modelu bilaterálního podvazu karotid v kombinaci s hypoxií (8% O<sub>2</sub>). Počáteční dávka memantinu byla 20mg/kg s pokračováním v podobě udržujících dávek 1 mg/kg (Chen, Pellegrini et al. 1992).

Jak již bylo řečeno v teoretickém úvodu, neurosteroidy jsou pro fyziologický vývoj nervové tkáně esenciální. Důležitý se zdá být zejména PROG a ALLO. Hill et al. naměřili zvýšené hladiny volného PROG, jeho metabolitů a sulfatovaných derivátů v cévním oběhu matky a zároveň vysoké koncentrace 5 $\alpha$ - a 3 $\alpha$ -redukovaných metabolitů PROG během těhotenství (Hill, Cibula et al. 2007). Tyto neurosteroidy jsou zpravidla agonisté GABA<sub>A</sub> receptoru. Jejich zvýšené hladiny jsou velmi rychle redukovány po vyloučení placenty po porodu (Nappi, Petraglia et al. 2001, Gilbert Evans, Ross et al. 2005). Tento pokles může být současně spojován s výskytem poporodní deprese (Bloch, Daly et al. 2003). V modelu akutního fetálního hypoxicko-ischemického poškození u ovčí byl zaznamenán výrazný nárůst koncentrace ALLO v šedé i bílé hmotě. Tento nálezná napovídá, že organismus plodu dokáže rychle reagovat na takovýto vážný stresový stimul (Nguyen, Yan et al. 2004). V souladu s předcházejícím je i fakt, že potlačení syntézy ALLO vede k zvýšené bazální úrovni apoptózy v mozku plodu, která může být napravena podáním syntetického analogu ALLO alfaxalonu (Yawno, Hirst et al. 2009).

Na základě našeho i jiných nálezů můžeme potvrdit značný terapeutický potenciál neuroaktivních steroidů. PG představuje neuroaktivní steroid působící zároveň na

glutamátergí i gabaerní systém, jelikož je negativním alosterickým modulátorem NMDAr a pozitivním alosterickým modulátorem GABA<sub>A</sub> receptorů. S ohledem na možné riziko jsme vyloučili jeho potenciální neurotoxický účinek v perinatálním období a současně potvrdili terapeutický potenciál. Zároveň s tím je třeba zmínit nutnost hledání nových terapeutických strategií v případě perinatálního hypoxicko-ischemického infarktu. PG se v současné době jeví jako velmi nadějná látka schopná redukovat excitotoxické poškození vyvíjejícího se mozku při hypoxicko-ischemickém infarktu bez vážných vedlejších účinků.

## 6.2 Neuroprotektivní vliv PA-hPim v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu

Nadměrná stimulace NMDAr vede k excitotoxickému poškození nervové tkáně (Sattler and Tymianski 2001). Podkladem pro toto poškození je v první řadě obrovský nárůst intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  skrz iontový kanál NMDAr a následná aktivace signálních drah vedoucích k buněčné smrti. Excitotoxicita je společným rysem pro velké množství patologických stavů nervového systému, vyskytuje se u ischemicko-hypoxických inzultů, traumatického poranění, Alzheimerovy choroby, Parkinsonovy choroby, amyotrofní laterální sklerózy a jiných neurodegenerativních onemocnění. Publikovaná studie se mimo jiného zabývá potenciální redukcí kognitivních následků excitotoxického inzultu v podobě NMDA-léze pomocí systémového podání PA-hPim. Tento neuroaktivní steroid je podobně jako PG negativní alosterický modulátor NMDAr, rozdílem je jeho současné negativní působení na  $\text{GABA}_A$  receptoru (PG působí na  $\text{GABA}_A$  potenciačně); (Bukanova, Solntseva et al. 2018). Díky délce svého alifatického řetězce a karboxylové skupině na konci substituentu na C3 předpokládáme jeho úspěšnost v testech *in vivo*.

Modely lézí jsou v neurovědním výzkumu často používané. Umožňují strukturně specifické poškození a následně studium jeho dopadů. Infuze NMDA do mozkových struktur je často využívána k určení funkce určitého regionu v kognitivním procesu zejména v případě hipokampu. Tento model může být rovněž použit pro zjištění potenciálního terapeutického potenciálu studované látky (Rambousek, Bubenikova-Valesova et al. 2011). Dalším využitím NMDA-léze je práce zaměřená na rozvoj a dopad epileptických záchvatů (Mares and Velisek 1992). Aplikace roztoku NMDA do hipokampu vede k ztrátě pyramidálních buněk a granulárních buněk v oblasti *gyrus dentatus* (Jarrard 2002). Míra poškození hipokampální struktury se pohybuje od velmi lokalizovaného minimálního poškození k rozsáhlé lézi v dané oblasti, záleží na počtu injekcí a koncentraci roztoku NMDA.

Bližší popis neuropatologických následků NMDA-léze byl publikován ve studii Rambousek et al. 2016. V práci jsme zkoumali potenciální kognitivní a imunohistochemické změny hipokampu v časových intervalech 1, 3, 7, a 30 dní po unilaterální infuzi NMDA (25 mM; 1  $\mu$ l). Na základě behaviorálního testu aktivního alotetického vyhýbání se místu jsme vyhodnotili, že unilaterální infuze NMDA nemá negativní vliv na prostorové učení. Zároveň jsme však zaznamenali značné imunohistochemické změny v postiženém hipokampu ukazující na rozsáhlou neuroinflamaci v podobě výrazné aktivace mikroglií a astroglíózy přetrvávající i 30 dní po excitotoxickém inzultu. Dalším nálezem byly změny v expresi podjednotek NMDA a  $\text{GABA}_A$  receptorů, kdy GluN1 a GluN2 podjednotky NMDAr byly exprimovány nadměrně, zatímco  $\alpha_5$  podjednotka  $\text{GABA}_A$  receptoru byla exprimována méně než u sham-operovaných zvířat. Z těchto výsledků je patrné, že NMDA-léze způsobí rozsáhlé morfologické i molekulární změny v tkáni, nicméně v případě unilaterální léze není porušena kognice. Zdá se, že kolaterální hipokampus je schopen kompenzace. Z tohoto důvodu jsme v publikované studii s PAh-Pim přistoupili k bilaterální lézi stejně koncentrovaným roztokem NMDA (Rambousek, Kleteckova et al. 2016).

Mnoho antagonistů NMDAr vykazovalo neuroprotektivní účinek v modelech hypoxicko-ischemického poškození. Nicméně jejich výzkum v oblasti medicínálního využití musel být ukončen díky výrazným vedlejším efektům na chování subjektů. Tyto nežádoucí účinky se projevují sensorickými a motorickými poruchami indukující schizofrenii-podobné příznaky v podobě hyperlokomoce a kognitivního deficitu. Aplikace nonkompetitivního antagonisty NMDAr MK-801 v nízké dávce 0,2 mg/kg u laboratorního potkana vede k výše popsaným pozitivním symptomům, a proto se v současném výzkumu využívá jako animální model schizofrenie (Kubik, Buchtova et al. 2014). K podobným příznakům vede i systémové podání dalšího nonkompetitivního antagonisty NMDAr PCP (Gleason and Shannon 1997). Zajímavé je, že i po administraci memantinu klinicky používaného k léčbě Alzheimerovy choroby byla zaznamenána hyperlokomoce či kognitivní zhoršení u experimentálních zvířat (Bubser, Keseberg et al. 1992, Dix, Gilmour et al. 2010). Zároveň byly popsány i halucinace u pacientů trpících demencí (Monastero, Camarda et al. 2007). Z těchto faktů je parné, že pokud látka ovlivňuje NMDAr, je důležité nejdříve stanovit její potenciální vedlejší účinky. Z tohoto důvodu jsme vyhodnotili vliv aplikace PA-hPim na chování intaktního zvířete. Ani jedna z použitých dávek PA-hPim 1 nebo 10 mg/kg neindukovala hyperlokomoci, na rozdíl od MK-801 v dávkách 0,2 a 0,3 mg/kg. Dále podání PA-hPim nemělo u intaktních zvířat vliv na kognitivní funkce. Tyto výsledky tvořily tedy nadějně předpoklady ke zkoumání potenciálního neuroprotektivního účinku PA-hPim v animálním modelu excitotoxického poškození bilaterální NMDA-léze.

Molekuly neuroaktivních steroidů a neurosteroidů se již delší dobu objevují v experimentálních studiích farmakologického výzkumu. Z endogenních neurosteroidů jsou to zejména PREG, PROG, ALLO, DHEA a DHEAS. V minulosti bylo popsán neuroprotektivní efekt PREG proti toxicitě indukované glutamátem či amyloidem  $\beta$ . Pokusy byly provedené na buněčné kultuře myšího hipokampu (Gursoy, Cardounel et al. 2001). PREG má dále význam pro stabilizaci mikrotubulů díky existenci pregnenolon-vázacího proteinu (Murakami, Fellous et al. 2000). Zároveň aplikace PREG či DHEA v modelu systémového podání kyseliny kaitátové v dávce 7 mg/kg dospělým potkanům zmenšilo redukci počtu neuronů v *gyrus dentatus* postižených zvířat. Tento pozitivní účinek je blokován inhibitorem aromatázy fadrozolem. Aromatáza katalyzuje transformaci testosteronu na estradiol. Tento fakt naznačuje funkci PREG a DHEA jako prekurzorových molekul (Veiga, Garcia-Segura et al. 2003). V případě PROG je známé jeho působení na myelinizaci neuronů. Po kryolézi *nervus ischiadicus* u myší PROG nebo jeho prekurzor PREG do místa léze zvýšily rozsah tvorby myelinu (Koenig, Schumacher et al. 1995). Pozitivní účinek PROG byl rovněž zaznamenán v modelu poranění periferních nervů a míchy, kde kromě jeho vlivu na myelinizaci byla prokázána i zvýšení koncentrace BDNF a redukce léze samotné (Thomas, Nockels et al. 1999, De Nicola, Gonzalez et al. 2006). V modelu přechodné MCAO aplikace PROG vedla ke zmenšení poškozené oblasti (Chen, Chopp et al. 1999). Dále PROG 8 mg/kg v modelu globální ischemie redukoval úbytek buněk v CA1 a CA2 podoblastech hipokampu spolu se zabráněním dilatace postranních mozkových komor (Morali, Letechipia-Vallejo et al. 2005). V roce 2008 Cai et al. popsali dva mechanismy podílející se na neuroprotekcii PROG, antagonistické působení PROG na  $\delta_1$  receptory a následná inhibice vstupu iontů  $Ca^{2+}$  skrz NMDAr (Cai, Zhu et al. 2008). Spolu s PROG byl zaznamenán neuroprotektivní efekt ALLO v modelu

traumatického poranění mozku, kde obě látky utlumili produkci prozánětlivých cytokinů a snížili rozsah vzniklého edému (He, Evans et al. 2004). Aplikace ALLO také vedla k snížení výskytu záchvatů, mortality a úbytku neuronů v CA1 a CA3 oblastech hipokampu v modelu kainátové léze (Leskiewicz, Budziszewska et al. 1997). Sulfatované neurosteroidy jako např. DHEAS byly rovněž zkoumány v experimentálních modelech. Opakované podání DHEAS v dávce 20 mg/kg po dobu tří dnů zmírnila zhoršení LTP po ischemickém infarktu (Li, Zhou et al. 2006).

Syntetické neurosteroidy byly rovněž v experimentálních modelech aplikovány. V roce 1997 Weaver et al. demonstrovali neuroprotektivní efekt pregnanolon hemisukcinátu (PHS) při *in vitro* expozici NMDA a zároveň i *in vivo* při ischemickém poškození v dávce 6,9 mg/kg, kde bylo zaznamenáno zmenšení infarktového ložiska 24h po infarktu. Zároveň byl popsán i sedativní, antikonvulzivní a analgetický účinek PHS (Weaver, Marek et al. 1997). Neuroaktivní steroid PHS byl rovněž zkoumán i v modelu reverzibilní ischemie míchy u králíka. PHS v dávce 25 mg/kg byl podán 5 nebo 30 min po infarktu. Signifikantní neuroprotektce byla zaznamenána u intervalu 5 min po infarktu (Lapchak 2004). Totožný autor v roce 2006 prokázal účinnost PHS i v modelu ischemického poškození mozku doprovázeného embolií (Lapchak 2006). PHS je stejně jako PG a studovaný PA-hPim negativním alosterickým modulátorem NMDAr. Ve neurovědním výzkumu byly dále studovány syntetické analogy ALLO a pregnanolonu modulující GABA<sub>A</sub> receptor. Experimenty byly provedeny na organotypických kulturách vystavených hypoxickému prostředí. Dva ze sledovaných sedmi analogů redukovaly následné rozvinutí astrogliózy a pouze jeden dokázal zmírnit úbytek neurofilament v hipokampu (Rey, Kruse et al. 2013). V modelu traumatického poškození mozku byl prokázán terapeutický potenciál fluasteronu, který je syntetickým analogem DHEA. Podání fluasteronu v dávce 25 mg/kg mělo za následek zlepšení potkanů v motorických testech i jejich neurologických reflexů. Zároveň fluasteron silně inhiboval cyklooxygenázu 2 a následnou produkci prostaglandinů v buněčné kultuře. Tento efekt však nebyl prokázán na hipokampálních řezech (Malik, Narayan et al. 2003).

V předešlém výzkumu bylo potvrzeno bezpečné podání PG a zároveň jeho neuroprotektivní efekt v modelu excitotoxické NMDA léze. Současná studie týkající se působení PA-hPim v totožném modelu potvrdila terapeutický potenciál tohoto syntetického analogu PS. PA-hPim inhibuje pouze tonicky aktivované NMDAr zodpovědné na excitotoxické poškození. Neuroaktivní steroid PA-hPim v dávce 1mg/kg dokázal eliminovat kognitivní deficit následovaný po excitotoxickém infarktu. Tento nálezn byl potvrzen pomocí behaviorálního testu zaměřeného na paměťové funkce – MWM. Výsledek je rovněž významný díky signifikantnímu účinku nízké jednorázové dávce této molekuly. Z předchozí rešerše je patrné, že statisticky významný terapeutický účinek měli především vyšší dávky jiných syntetických analogů. Na základě nedávno publikované studie Bukanova et al. 2018 bylo prokázáno, že PG, PHS i PA-hPim kromě NMDAr ovlivňují i GABA<sub>A</sub> a glycinové receptory. Molekula PG na GABA<sub>A</sub> a glycinové receptory působí potenciačně, zatímco PHS a PA-hPim je inhibují. Z dalších výsledků studie je patrné, že 17-acetylová část látky PG je zodpovědná za zmíněný potenciační efekt (Bukanova, Solntseva et al. 2018). Zároveň potvrzuje skutečnost, že molekuly syntetických neuroaktivních steroidů, stejně jako endogenní neurosteroidy, mohou ovlivňovat více neurotransmiterových systémů najednou.

Výstupy obou publikovaných článků (Kleteckova, Tsenov et al. 2014) a (Vyklícky, Smejkalova et al. 2016) demonstrují bezpečnost aplikace použitých molekul neuroaktivních steroidů. Zároveň potvrzují jejich terapeutický potenciál v oblasti patologických stavů nervového systému, které tvoří stále se zvyšující ekonomickou zátěž pro současnou společnost a představují tak jeden z hlavních medicínálních a sociálních problémů. Bezpečné látky ovlivňující glutamatergní neurotransmisi by současně mohli napomoci současné terapii neurodegenerativních a neuropsychiatrických poruch.

### 6.3 Porovnání neuroprotektivního efektu THA, 7-MEOTA a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu

Publikované výsledky jsou zaměřeny na popsání mechanismu přímého působení THA a jeho derivátu 7-MEOTA na NMDAr a zároveň prozkoumání jejich potenciálního neuroprotektivního účinku v porovnáním s klinicky používaným memantinem.

THA je bílý krystalický ve vodě rozpustný prášek syntetizovaný poprvé 40. letech minulého století. Krátce na to byly popsány jeho antagonistické účinky na sníženou respiraci a sedaci u zvířat ovlivněných morfiem bez přímého efektu na anestezii (Shaw 1955). Od 70. let je známo, že inhibitor acetylcholinesterázy fyzostigmin působí reverzibilně na vedlejší účinky látek ovlivňujících cholinergní systém (tricyklická antidepresiva, látky používané v léčbě Parkinsonovy choroby a antipsychotická léčiva); (Granacher and Baldessarini 1975). V případě THA byl zaznamenán stejný efekt jako u fysostigminu ovšem s delší dobou působení (Summers, Kaufman et al. 1980). Později byl THA popsán jako nonkompetitivní reversibilní inhibitor cholinesteráz s mírnou selektivitou pro butyrylcholinesterázu (Freeman and Dawson 1991, Davis and Powchik 1995). Kromě jiného THA působí i jako inhibitor NMDAr, což ho propojuje s předchozími v práci testovanými molekulami (PG a PAh-Pim); (Hershkowitz and Rogawski 1991). Hodnoty afinity THA k NMDAr se různých studiích lišily, proto jsme se tomuto tématu věnovali v publikaci. Látky odvozené od struktury THA by mohly být farmaceuticky využity díky limitaci vedlejších účinků.

THA, o kterém bylo uvažováno jako převážně o cholinergní látce, byl první molekulou navrženou pro léčbu Alzheimerova onemocnění. Tato choroba se kromě jiného projevuje extracelulární agregací amyloidu- $\beta$  a intracelulárními inkluzemi hyperfosforylovaného Tau-proteinu. Léčba THA vedla mimo jiné k zvýšení krevního průtoku a blokaci sekrece prekurzorového proteinu pro amyloid  $\beta$  u pacientů s Alzheimerovou chorobou, tento efekt nebyl přítomen u jiných inhibitorů cholinesteráz (Summers, Kaufman et al. 1980, Lahiri 1994, Harkins, Taylor et al. 1997). Nicméně THA musel být stažen z trhu kvůli jeho nežádoucí hepatotoxicitě (Watkins, Zimmerman et al. 1994, Pan, Yu et al. 2007). Jelikož léčba THA představovala určité kladné stránky, bylo žádoucí vyvinout jeho deriváty s příznivějšími farmakologickými vlastnostmi. Z tohoto důvodu byl syntetizován 7-metoxyderivát 7-MEOTA. Tato látka je odvozena od THA, nicméně ve srovnání s ním vykazuje signifikantně menší toxicitu u myší, potkanů, psů, králíků. Zároveň nebyly popsány žádné vedlejší účinky u zdravých lidských dobrovolníků díky odlišnému metabolickému zpracování (Soukup, Jun et al. 2013). Na základě těchto faktů jsme se rozhodli prozkoumat farmakologický potenciál látky 7-MEOTA.

Jak bylo řečeno, NMDAr jsou esenciální pro LTP, učení a paměťové procesy. Nicméně excesivní stimulace NMDAr vede k buněčné smrti a rozsáhlému poškození okolní tkáně v závislosti na koncentraci agonisty. Experimentálně byla prokázána redukce neurotoxicity na myších buňkách kortexu po aplikaci THA (Davenport, Monyer et al. 1988). Tento nálezní potvrdil, že THA působí inhibičně přímo na NMDAr. V závislosti na to bylo popsáno, že THA je schopen vytěsnit PCP a MK-801 z NMDAr (Albin, Young et al. 1988). Následné elektrofyziologické a molekulární přístupy objasnili, že THA je reversibilní blokátor iontového



kanálu NMDAr s vazebným místem blízko vstupu do kanálu (Nelson and Albuquerque 1994). Výsledky naší publikované studie dokazují, že obě látky tj. THA a 7-MEOTA jsou tzv. „foot-in-the-door“ blokátory otevřeného kanálu NMDAr. Formulace „foot-in-the-door“ označuje blokátory s větším rozměrem molekuly, díky kterému se nemohou navázat příliš hluboko do nitra kanálu. Zároveň jsme prokázali, že 7-MEOTA je silnějším blokátorem kanálu s pomalejší kinetikou než THA. Navazujícími experimenty bylo porovnání účinku THA a 7-MEOTA s terapeuticky užívaným memantinem v modelu excitotoxického poškození (unilaterální NMDA-léze).

Kontrolní zvířata s aplikovaným NMDA utrpěla rozsáhlé poškození ve všech hodnocených strukturách hipokampu. Nicméně předpokládaný pozitivní účinek memantinu potvrzen nebyl. Memantin byl použit již v několika klinických studiích týkajících se pacientů s Alzheimerovou chorobou v poměrně vysoké dávce 20 mg/kg (Orgogozo, Rigaud et al. 2002, Reisberg, Doody et al. 2003). Naše výsledky prokázaly, že 7-MEOTA, avšak ne THA či memantin, má silný neuroprotektivní účinek v tomto modelu. Neúspěch memantinu lze vysvětlit odlišným experimentálním uspořádáním, jiným způsobem podání a mezidruhovými rozdíly. Aplikace 7-MEOTA měla pozitivní dopad na téměř všechny hodnocené hipokampální podoblasti (CA1, CA3, hilus, DGh). Díky specifitě NMDA-léze můžeme vyloučit, že tento výsledek může být zprostředkován i jinými receptorovými systémy než NMDAr. Hipokampální podoblast DGl byla signifikantně narušena v případě všech použitých látek kromě PBS + NaCl. Z předešlých prací víme, že 7-MEOTA je organismem velmi dobře tolerována zdravými dobrovolníky v dávkách 2 a 7 mg/kg/den bez nežádoucích účinků na kognici. Ve srovnání s THA je 7-MEOTA bezpečnější z hlediska vlivu na kognitivní funkce, jelikož experimentálně bylo popsáno, že THA v dávkách 20 – 40  $\mu\text{mol/kg}$  způsobuje u myši narušení paměti. Nicméně v nižší dávce THA 5  $\mu\text{mol/kg}$  došlo k zlepšení paměti. 7-MEOTA v předešlých výzkumech prokázala rovněž pozitivní účinky u pacientů s tardivní diskinezí způsobenou dlouhodobým užíváním antipsychotik (Dejmek 1990, Patocka, Jun et al. 2008).

Látky ovlivňující NMDAr mohou redukovat neurodegenerativní změny po excitotoxickém poškození. Nicméně jelikož jsou NMDAr široce zapojeny do fyziologické funkce nervového systému, je nutné se selektivně zaměřit na takové typy látek, které nenarušují běžné procesy. Vedlejší účinky v podobě halucinací byly popsány zejména u MK-801, ketaminu a memantinu (Monastero, Camarda et al. 2007, Manahan-Vaughan, von Haebler et al. 2008, Powers, Gancsos et al. 2015). Z našich výsledků je patrné, že 7-MEOTA je bezpečný analog THA, bez nežádoucích vlivů na kognici a se signifikantně lepším neuroprotektivním účinkem v použitém modelu NMDA léze než medicínálně užívaný memantin. Kombinace multifaktoriálního efektu molekuly jako inhibitoru acetylcholinesterázy a zároveň antagonisty NMDAr má tedy velký terapeutický potenciál. Obě skupiny léčiv se běžně využívají při léčbě Alzheimerovy choroby.

## 6.4 Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR

Depresivní porucha představuje velkou výzvu pro současný farmakologický výzkum. Toto onemocnění je multifaktoriální, heterogenní, často chronické a značně limitující především pro osoby v produktivním věku. Jeho celková prevalence je 5 – 15% mužů a 9 – 26% žen (Bares M 2006). Tato problematika je spojena se vzrůstající ekonomickou zátěží. Deprese je dávana do souvislostí zejména s anhedonií, hypobulií, úzkostí, poruchami spánkového cyklu i jinými fyziologickými procesy a samozřejmě bývá značným omezením pro pacientův osobní život i jeho bezprostřední okolí (Belmaker and Agam 2008). Z hlediska patogeneze jejího vzniku existují různé teorie např. monoaminová či neurotrofická teorie, zároveň se diskutuje o přispění dysregulace hypothalamo-hypofyzární osy a imunitních faktorů. Léčbu tohoto onemocnění zastupují především látky ovlivňující monoaminergní systém serotoninu a noradrenalinu (SSRI, SNRI, NaSSA, SARI), inhibitory monoaminoxidázy a tricyklická antidepresiva. Hlavní negativní efekt těchto molekul spočívá v pomalém nástupu jejich účinku v řádu několika týdnů. Toto období je pak pro pacienta vysoce rizikové z hlediska případné suicidální tendence. Navíc je třeba poznamenat, že značné procento pacientů představují farmakorezistentní případy (Bares M 2006).

Neurotrofická teorie shrnuje současný pohled na vznik a důsledky depresivního onemocnění. Hlavní rizikový faktor zde představuje chronický stres působící narušení plasticity nervové tkáně, s tím související dysfunkce a atrofie limbických struktur např. hipokampu a prefrontálního kortexu a dysregulace dalších limbických oblastí. Zesílení negativních emocí je způsobenou naopak hypertofií amygdaly. Podkladem těchto neuroplastických změn je zejména úbytek trofických faktorů hlavně BDNF a snížení neurogeneze (Lee and Kim 2010).

Ketamin je disociativní anestetikum bez negativních účinků na dýchací reflexy s analgetickým účinkem. Molekulárně můžeme ketamin popsat jako nonkompetitivního či unkompetitivního antagonistu NMDAr, který funguje jako blokátor jeho iontového kanálu. Struktura ketaminu je podobná molekulám MK-801 a PCP, nicméně ketamin uvnitř receptoru setrvává kratší dobu a rychleji z něj disociuje (Muir and Lees 1995).

Limitujícím účinkem jsou halucinogenní stavy po jeho použití (Powers, Gancsos et al. 2015). Tyto komplikace se však nevyskytují u dětí (Olney and Farber 1995). Díky generování halucinací a psychotomimetických stavů u dospělých jedinců bývá ketamin upotřeben k výzkumu psychotických onemocnění. Zároveň je ketamin zneužíván jako rekreační droga (Powers, Gancsos et al. 2015).

Bylo prokázáno, že subanestetická dávka ketaminu (0,5 mg/kg) podaná jednorázovou infuzí vede k přechodným psychotickým příznakům u zdravých jedinců mizejících v řádu několika hodin. Tyto projevy byly následně popsány u depresivních pacientů společně s antidepresivním efektem totožné dávky ketaminu. Ve studii byl ukázán velice rychlý nástup antidepresivního účinku gradující v průběhu 72h (Berman, Cappiello et al. 2000). Následně byl demonstrován tento efekt i u farmakorezistentních pacientů. Pozitivní účinky u některých pacientů přetrvaly i týden po aplikaci ketaminu (Zarate, Singh et al. 2006).

Rychlý antidepressivní účinek spolu s jeho zhruba týdenním trváním představují hlavní výhody aplikace ketaminu u depresivních pacientů. Antidepressivní působení bylo popsáno i u jiných látek ovlivňujících NMDAR např. lanicemin, D-cykloS a rapastinel (Heresco-Levy, Gelfin et al. 2013, Sanacora, Smith et al. 2014, Burgdorf, Zhang et al. 2015). Zároveň je nutno poznamenat, že týdenní efekt bohužel nepokryje celé časové okno nástupu účinku běžných antidepressiv.

Antidepressivní působení ketaminu bylo pozorováno pouze u jeho subanestetické dávky, která v mozku vytváří slabou mikromolární koncentraci inhibující pravděpodobně pouze určitou část NMDAR. Ostatní NMDAR jsou poté schopné své fyziologické funkce (Hartvig, Valtysson et al. 1995). Ketamin není selektivně specifický pouze pro určitý typ NMDAR, nicméně může přednostně inhibovat NMDAR složené z určitých podjednotek. Konkrétně GluN1/GluN2C NMDAR na GABAergních interneuronech jsou ketaminem inhibovány třikrát až čtyřikrát více (Monyer, Burnashev et al. 1994, Kotermanski and Johnson 2009). Dále ketamin přednostně inhibuje NMDAR obsahující GluN2B podjednotku, její delece mimikuje antidepressivní efekt ketaminu (Miller, Yang et al. 2014). Jelikož antidepressivní efekt přetrvává přibližně 7 dní, z kinetického hlediska je nemožné ho vysvětlit pouhou vazbou ketaminu na NMDAR. Aplikace ketaminu vede ke změnám v buněčné signalizaci a synaptické plasticitě. Tyto změny zahrnují aktivaci signální dráhy mTOR, inhibici eukaryotického prodlužujícího faktoru 2 a zesílenou signalizaci neurotrofického BDNF. Porozumění mechanismu zodpovědného za antidepressivní působení ketaminu s jeho klinickými projevy je vysoce aktuální téma v oblasti současného výzkumu afektivních poruch s potenciálem vývoje nových antidepressiv (Hayley and Litteljohn 2013).

V roce 2010 Li et al. publikovali práci vysvětlující antidepressivní efekt ketaminu skrz aktivaci signální dráhy mTOR. mTOR je kináza fosforylující Ser a Thr regulující buněčný cyklus, proliferaci, transkripci a proteosyntézu. V současné době se diskutuje o její roli v neuroplastických změnách mozku a zapojení do stresové odpovědi. Díky její široké oblasti působení bylo objeveno její narušení u různých patologických procesů CNS (Lipton and Sahin 2014). Studie Li et al. popsala aktivaci signální dráhy mTOR 30 min po aplikaci ketaminu pomocí zvýšené úrovně fosforylace Akt a ERK kináz. Následně o 2 h později došlo k normalizaci hladin fosforylovaných proteinů. Tento efekt byl závislý na dávce použitého ketaminu, nižší dávky ketaminu (5 – 10 mg/kg) měli stimulační efekt, zatímco vysoké dávky s anestetickým účinkem signální dráhu mTOR neovlivňovaly. Zároveň tyto hladiny nebyly ovlivněny v případě aplikace rapamycinu, který mTOR dráhu inhibuje. Pokud byl rapamycin podán předem, došlo k eliminaci antidepressivního účinku ketaminu. Krom vlivu na signální proteiny ketamin 2 h po podání způsobil i zvýšení hladin některých synaptických proteinů např. synapsinu I a PSD 95. Tento efekt přetrvával po dobu 7 dnů. Dále bylo zaznamenáno zvýšení počtu dendritických trnů, které bývají redukovány u pacientů s depresivním onemocněním (Li, Lee et al. 2010). Jednorázová aplikace ketaminu tuto redukci napravuje i v případě chronického mírného stresu (Li, Liu et al. 2011). Ve spojitosti s chronickým mírným stresem byla zaznamenána i snížená hladina neutrofinu BDNF souvisejícího s plasticitou nervového systému (Karege, Perret et al. 2002). Naopak podání ketaminu způsobilo zvýšení translace tohoto proteinu (Yang, Hu et al. 2013).

Stále však panují dohady o tom, zda za antidepressivní působení ketaminu může jeho přímé navázání na NMDAr, nebo některý z jeho metabolitů či úplně odlišný mechanismus účinku. Například metabolity 2S, 6S a 2R, 6R-hydroxynorketamin mohou být stabilizátory nálady, přestože hydroxynorketamin nemá afinitu k NMDAr. Ve studii bylo popsáno, že 2R, 6R-hydroxynorketamin zvyšuje frekvenci a amplitudu excitačního postsynaptického potenciálu zprostředkovaného AMPA receptory v CA1 oblasti hipokampu (Zanos, Moaddel et al. 2016). Jinými studiemi byl dále popsán větší antidepressivní efekt u R-enantiomeru ketaminu než u běžně užívané racemické směsi (Zhang, Li et al. 2014, Yang, Shirayama et al. 2015). Existují studie potvrzující, že R, S-ketamin a 2S, 6S-hydroxynorketamin a R,S-norketamin metabolity mohou aktivovat signální dráhu mTOR (Paul, Singh et al. 2014). V roce 2012 byla publikována práce popisující přispění NMDAr k antidepressivnímu efektu adenosinu u myši. Adenosin ovlivňuje řadu metabotropních adenosinových receptorů ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  a  $A_3$ ). Adenosin zastává modulační roli v ovlivnění procesů spojených s náladami a pocity. Především  $A_1$  a  $A_{2A}$  receptory mohou být spojovány s monitorováním hladin různých neurotransmiterů např. serotoninu, kortizolu, kortikosteronu a Glu. Studie prokázala zesílený antidepressivní efekt po současném podání adenosinu a ketaminu. Je tedy možné, že existuje souvislost mezi inhibicí NMDAr a aktivací adenosinových receptorů (Kaster, Machado et al. 2012). Dále je diskutována i role AMPA receptorů, kdy bylo experimentálně zjištěno, že podání antagonisty AMPA receptorů NBQX zablokuje antidepressivní efekt ketaminu (Maeng, Zarate et al. 2008). Ketamin může být dále propojen s kinázou GSK3 $\beta$  (z angl. glycogen synthase kinase) zapojené v synaptické plasticitě a neurogenezi. Lithium používané jako lék na bipolární poruchu je přímým inhibitorem této kinázy. Aplikace ketaminu mimo jiné vede k inhibici GSK3 $\beta$ . Studie z roku 2011 popisuje, že inhibice GSK3 $\beta$  je zásadní pro rychlý antidepressivní efekt u myši (Beurel, Song et al. 2011).

Námi publikovaná práce je zaměřena na zkoumání, zda aktivace (ketamin) či inhibice (rapamycin) signální dráhy mTOR má antidepressivní vlastnosti v použitém animálním modelu olfaktorické bulbektomie. Bilaterální olfaktorická bulbektomie narušující integritu libického systému způsobuje buněčné, strukturální a biochemické a behaviorální změny vyskytující se i u depresivních pacientů (Song and Leonard 2005). Krevní vzorky pro analýzu aktivace signální dráhy mTOR byly odebrány před a 30 min po aplikaci látek. Srovnávali jsme sham-operovaná zvířata se zvířaty po OBX. U obou skupin jsme podávali následující látky a jejich kombinace: ketamin, rapamycin, NaCl + rapamycin, ketamin + rapamycin. U zvířat po OBX s aplikovaným ketaminem jsme zaznamenali signifikantní nárůst fosforylovaného mTOR, což koresponduje s jinými publikovanými studiemi. Tento rozdíl mezi OBX a sham zvířaty nebyl patrný před aplikací látek v čase 0 (článek neobsahuje tato data), což poukazuje na zvýšenou citlivost OBX potkanů k aplikovaným látkám. Překvapivým nálezem byl nepotlačený nárůst aktivace mTOR v případě kombinace ketamin + rapamycin. Nicméně tato kombinace vedla ke zhoršení zvířat v behaviorálních testech, kde jsou vystavena stresu. Vzhledem k výsledkům týkajících se chování je třeba poznamenat, že samotná OBX vedla k rozvoji depresivního fenotypu projevujícího se v naší studii např. hyperaktivitou, zvýšenou úzkostí a pomalejším učením v MWM. Tyto nálezy jsou v souladu s publikovanou literaturou (van Rijzingen, Gispen et al. 1995, Ho, Chang et al. 2000, Ivanova, Belcheva et al. 2014). Pouze OBX zvířata byla responsivní k aplikovaným látkám. Aplikace ketaminu vedla k redukci hyperlokomoce a měla

anxiolitický efekt u OBX zvířat. V případě úlohy aktivního alometického vyhýbání se místu (AAPA) jsme překvapivě pozorovali signifikantní zhoršení kognice u kontrolních zvířat, které se projevovalo zhoršeným vyhýbáním se zakázanému sektoru. Zároveň zvířata postrádala únikovou reakci, což jasně ukazuje na vyvinutou naučenou bezmocnost. Naopak OBX zvířata se učila rychleji a ketamin u nich vedl k redukci obdrženého počtu šoků při vstupu do zakázaného sektoru. Podání rapamycinu OBX zvířatům tento proces zvrátilo a vedlo ke zkrácení času, po který se zvířata dokázala sektoru vyhýbat. Behaviorální data kognitivních testů poukazují na klíčovou roli stresu. Uspořádání AAPA mohlo být pro experimentální zvířata stresující, jelikož zvířata podstoupila dvě 20 min trvající sezení po dobu dvou následujících dnů. AAPA je úloha vysoce závislá na integritě hipokampu, již jeho unilaterální léze se projeví kognitivním deficitem (Cimadevilla, Wesierska et al. 2001). Pro úspěšné zvládnutí stresově podmíněného kognitivního testu je klíčová role amygdaly. Hyperaktivní amygdala v kombinaci se stresující úlohou by u OBX zvířat měla vést ke kognitivnímu deficitu v AAPA díky produkci uvolňujícího faktoru pro kortikotropin a následnému porušení rovnováhy mezi inhibičním a excitačním systémem směrem k větší excitabilitě (Shekhar, Truitt et al. 2005). Schopnost zvládnout stresový stimul by tak byla menší. Nicméně nabízí se také vysvětlení lepší habituace OBX zvířat na opakovaný stres vytvořený úlohou AAPA z hlediska redukce aktivace hypothalamo-hypofyzární osy. Dostatečně velký stres blokuje habituaci, což pozorujeme u kontrolních zvířat (Herman 2013). OBX zvířata se vyznačují zvýšenou excitabilitou amygdaly (Watanabe, Fukuda et al. 1980). Vystavení velkému stresu může u nich ztlumit efekt uvolňujícího faktoru pro kortikotropin na hyperaktivovanou amygdalu a pozměnit výsledné chování OBX zvířat. V našich výsledcích můžeme pozorovat rozdíl mezi výsledky AAPA a měření aktivity mTOR v případě OBX zvířat. Stejná dávka ketaminu kombinovaného s rapamycinem u OBX zvířat v AAPA vedla k zvýšenému počtu šoků, zvýšenému počtu vstupů do zakázaného sektoru a redukci časového intervalu vyhýbání se zakázanému sektoru. Nicméně nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v aktivitě mTOR u zvířat s OBX mezi ketaminem a kombinací ketamin + rapamycin. Koaplikace obou látek mohla zkreslit rovnováhu mTOR a výsledky v zhoršené stresové odpovědi. V literatuře je popsána snížená fosforylace mTOR v amygdale po vystavení chronického stresu, dále také redukce exprese mTOR u depresivních pacientů (Jernigan, Goswami et al. 2011, Chandran, Iyo et al. 2013). Závěrem studie je, že signální dráha mTOR v modelu depresivního onemocnění (bilaterální olfaktorická bulbektomie) velmi úzce souvisí se stresovou reakcí organismu. Nemůžeme však s určitostí říct, že je kauzálním faktorem tohoto onemocnění. Díky širokému poli působnosti signální dráhy mTOR od buněčného cyklu, přes proliferaci a plasticitu je esenciální se zaměřit na její bližší prozkoumání. Současné studie dávají do souvislosti i excitotoxické poškození zprostředkované nadměrnou aktivací NMDAr, aktivací mTOR a GSK3 $\beta$ . Bylo prokázáno, že inhibice mTOR a GSK3 $\beta$  před mírným excitotoxickým stimulem vede k lepší regeneraci poškozených buněk (Swiatkowski, Nikolaeva et al. 2017).

Depresivní choroba postihující osoby převážně v produktivním věku života tvoří významnou ekonomickou zátěž pro současnou společnost. Rychlé antidepressivní působení ketaminu představuje potenciální řešení pro farmakorezistentní pacienty se suicidálními tendencemi. Je potřeba ovšem podrobněji zkoumat mechanismus jeho účinku a zároveň možnosti jeho prodloužení.

## 7 SOUHRN

### 7.1 Neuroprotektivní efekt $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu v modelu fokální cerebrální ischemie u nedospělých potkanů

- Studovaný neuroaktivní steroid  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát nevykazuje přímý neurotoxický efekt na nezralou mozkovou tkáň.
- Včasné podání  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu významně snižuje rozsah poškození nervové tkáně v použitém animálním modelu fokální ischemie indukované lokalizovaným podáním endotelinu-1 u dvanáctidenních mláďat potkana.
- Neuroprotektivní potenciál  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamátu byl prokázán.
- $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát představuje potenciálně terapeuticky využitelný neuroaktivní steroid v perinatální periodě.

### 7.2 Neuroprotektivní vliv pregnanolon hemipimelátu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu

- Bilaterální NMDA léze dorzálního hipokampu generuje kognitivní deficit pozorovatelný v Morrisově vodním bludišti.
- Studovaný neuroaktivní steroid pregnanolon hemipimelát podaný po NMDA lézi významně eliminuje její následky na paměťové funkce.
- Pregnanolon hemipimelát představuje potenciálně terapeuticky využitelný neuroaktivní steroid.

### 7.3 Porovnání neuroprotektivního efektu takrinu, 7-metoxyderivátu takrinu a memantinu v animálním modelu silného excitotoxického poškození hipokampu

- Unilaterální NMDA léze dorzálního hipokampu způsobuje rozsáhlé neurodegenerativní změny v postižené struktuře a je tedy vhodným modelem pro testování potenciálně neuroprotektivních látek.
- Podání takrinu a klinicky používaného memantinu je nedostatečné k potlačení následků unilaterální NMDA léze.

- Na druhou stranu aplikace látky 7-MEOTA vede k výrazné redukci hipokampálního poškození.
- 7-MEOTA je atraktivní modelová molekula pro budoucí výzkum patologických stavů CNS s duálním působením na acetylcholinový i glutamátergní systém.

#### **7.4 Antidepresivní účinek ketaminu v modelu olfaktorické bulbektomie a jeho spojení se signální drahou mTOR**

- Aplikace ketaminu u zvířat po olfaktorické bulbektomii způsobuje signifikantní nárůst aktivity signální dráhy mTOR.
- Tato aktivace není potlačena ani v případě podání rapamycinu (inhibitor signální dráhy mTOR) před aplikovaným ketaminem.
- Naše výsledky nastiňují souvislost mezi stresem a regulací signální dráhy mTOR.

## **8 SUMMARY**

### **8.1 Neuroprotective effect of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats**

- Studied neuroactive steroid 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate does not exhibit direct neurotoxic effect in immature brain.
- Well-timed administration 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate significantly reduces range of neuronal damage in the used animal model of focal cerebral ischemia induced by localized infusion of endothelin-1 in twelve-days-old rats.
- Neuroprotective potential of 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate was demonstrated.
- 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate represents potentially therapeutically applicable neuroactive steroid in the perinatal period.

### **8.2 Neuroprotective effect pregnanolone hemipimelate in the animal model of extensive excitotoxic damage of hippocampus**

- Bilateral NMDA lesion of dorsal hippocampus generates cognitive deficit observed in Morris water maze.
- Application of studied neuroactive steroid pregnanolone hemipimelate after NMDA lesion significantly eliminates consequences of the lesion on memory function.
- Pregnanolone hemipimelate represents potentially therapeutically applicable neuroactive steroid.

### **8.3 Comparison of neuroprotective effect of tacrine, 7-methoxyderivative of tacrine and memantine in the animal model of extensive excitotoxic damage of hippocampus**

- Unilateral NMDA lesion of dorsal hippocampus leads to neurodegenerative changes in the afflicted structure and therefore is suitable model for a testing of potentially neuroprotective agents.
- Administration of tacrine and clinical used memantine is not sufficient for suppression of consequences of unilateral NMDA lesion.



- On the other hand application of 7-MEOTA causes significant reduction of hippocampal damage.
- 7-MEOTA is attractive molecule for future research of pathological states of CNS acting simultaneously via acetylcholinergic and glutamatergic system.

#### **8.4 Antidepressant effects of ketamine in the model of olfactory bulbectomy and its connection with mTOR signal pathway**

- Administration of ketamine in olfactory bulbectomy rats leads to significant increase of activation of mTOR signal pathway.
- This activation is not suppressed nor in case of application of rapamycin treatment (inhibitor of mTOR signal pathway) before administration of ketamine.
- Our results outline the relationship between stress and mTOR signaling pathway.

## 9 ZÁVĚR

Glutamatergní systém je esenciální pro správné fungování nervového systému. Jeho nejrozšířenější složku tvoří NMDA receptory zodpovídající za synaptickou plasticitu, procesy spojené s pamětí a učením a správný vývoj organismu. Nadměrná aktivace a poruchy funkce glutamatergního systému se vyskytují u velkého počtu onemocnění CNS od akutních patologických stavů přes neurodegenerativní a neuropsychiatrická onemocnění. Díky velkému množství vazebných míst na svém povrchu představují NMDA receptory atraktivní cíl pro farmakologický výzkum. Nicméně je nutno poznamenat, že látky ovlivňující NMDA receptory mohou mít vážné vedlejší účinky jako je tomu v případě MK-801. Tato látka je příkladem molekuly, která vykazovala slibné výsledky při testech *in vitro* i *in vivo*, později však byly zjištěny po jejím podání změněné stavy vědomí a příznaky podobné schizofrenii. Z tohoto důvodu je esenciální hledat molekuly ovlivňující NMDA receptory s příznivým poměrem risk/benefit, které jsou bezpečné pro organismus a zároveň mají adekvátní terapeutický efekt.

Zastřešující myšlenkou předložené dizertační práce je zkoumání různých skupin látek ovlivňujících NMDA receptor s potenciálním využitím pro medicínální aplikaci poruch CNS spojených s glutamatergním systémem. První skupinu látek tvoří syntetické analogy endogenních neurosteroidů, konkrétně  $3\alpha5\beta$ -pregnanolon glutamát a pregnanolon hemipimelát. U obou neuroaktivních steroidů se podařilo prokázat jejich neuroprotektivní účinek v různých animálních modelech, kde společným faktorem byla glutamátová excitotoxicita a následná redukce poškození mozkové tkáně po podání neurosteroidu. Druhou skupinu látek představují takrin a jeho analog 7-MEOTA, jejichž účinnost byla rovněž prokázána v modelu excitotoxického poškození. Tato část práce se navíc zabývala porovnáním účinností zmíněných molekul s klinicky užívaným memantinem. Signifikantní terapeutický účinek v daném modelu byl zaznamenán pouze u 7-MEOTA nikoli u memantinu či takrinu. Poslední část práce je zaměřena na antidepresivní efekt molekuly ketaminu antagonisty NMDA receptoru v modelu bilaterální olfaktorické bulbektomie, kde byl potvrzen účinek ketaminu na aktivaci signální dráhy mTOR u zvířat s experimentálně navozeným depresivním fenotypem.

Práce se zabývá významným cílem současných neurověd, shrnuje neuroprotektivní a antidepresivní účinek molekul ovlivňujících NMDA receptor a následně i glutamatergní neurotransmisi. U žádné ze studovaných látek v použitých dávkách nebyly prokázány vedlejší účinky na organismus, což může souviset s jejich specifickým mechanismem účinku. Tvoří tak podklad pro jejich budoucí studování v jiných doplňujících animálních modelech a potenciální postup do klinických zkoušek.

## 10 LITERATURA

- Albers, G. W., W. M. Clark, R. P. Atkinson, K. Madden, J. L. Data and M. J. Whitehouse (1999). "Dose escalation study of the NMDA glycine-site antagonist licostinel in acute ischemic stroke." *Stroke* **30**(3): 508-513.
- Albers, G. W., L. B. Goldstein, D. Hall and L. M. Lesko (2001). "Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial." *Jama* **286**(21): 2673-2682.
- Albin, R. L., A. B. Young and J. B. Penney (1988). "Tetrahydro-9-aminoacridine (THA) interacts with the phencyclidine (PCP) receptor site." *Neurosci Lett* **88**(3): 303-307.
- Alonso-Alconada, D., A. Alvarez, O. Arteaga, A. Martínez-Ibargüen and E. Hilario (2013). "Neuroprotective effect of melatonin: a novel therapy against perinatal hypoxia-ischemia." *International journal of molecular sciences* **14**(5): 9379-9395.
- Aly, H., H. Elmahdy, M. El-Dib, M. Rowisha, M. Awny, T. El-Gohary, M. Elbatch, M. Hamisa and A. R. El-Mashad (2015). "Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: a randomized controlled pilot study." *J Perinatol* **35**(3): 186-191.
- Andine, P., N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Olofsson, E. Martensson and M. Sandberg (1999). "Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis." *J Pharmacol Exp Ther* **290**(3): 1393-1408.
- Angehagen, M., L. Romback, E. Hansson and E. Ben-Menachem (2005). "Topiramate reduces AMPA-induced Ca(2+) transients and inhibits GluR1 subunit phosphorylation in astrocytes from primary cultures." *J Neurochem* **94**(4): 1124-1130.
- Annink, K. V., A. R. Franz, J. B. Derks, M. Rudiger, F. V. Bel and M. Benders (2017). "Allopurinol: Old Drug, New Indication in Neonates?" *Curr Pharm Des* **23**(38): 5935-5942.
- Arriza, J. L., S. Eliasof, M. P. Kavanaugh and S. G. Amara (1997). "Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 4155-4160.
- Barbaccia, M. L., G. Roscetti, M. Trabucchi, M. C. Mostallino, A. Concas, R. H. Purdy and G. Biggio (1996). "Time-dependent changes in rat brain neuroactive steroid concentrations and GABAA receptor function after acute stress." *Neuroendocrinology* **63**(2): 166-172.
- Barbaccia, M. L., G. Roscetti, M. Trabucchi, R. H. Purdy, M. C. Mostallino, A. Concas and G. Biggio (1997). "The effects of inhibitors of GABAergic transmission and stress on brain and plasma allopregnanolone concentrations." *British Journal of Pharmacology* **120**(8): 1582-1588.
- Bares M, K. M. (2006). "Úvod do biologické léčby rezistentní depresivní poruchy." *Psychiatrie pro praxi* **6**: 276-280.
- Bay-Richter, C., K. R. Linderholm, C. K. Lim, M. Samuelsson, L. Traskman-Bendz, G. J. Guillemín, S. Erhardt and L. Brundin (2015). "A role for inflammatory metabolites as modulators of the glutamate N-methyl-D-aspartate receptor in depression and suicidality." *Brain Behav Immun* **43**: 110-117.
- Beauchamp, M. H., B. K. Ormerod, K. Jhamandas, R. J. Boegman and R. J. Beninger (2000). "Neurosteroids and reward: allopregnanolone produces a conditioned place aversion in rats." *Pharmacol Biochem Behav* **67**(1): 29-35.
- Belmaker, R. H. and G. Agam (2008). "Major depressive disorder." *N Engl J Med* **358**(1): 55-68.
- Ben-Porath, D. D. and S. P. Taylor (2002). "The effects of diazepam (valium) and aggressive disposition on human aggression: an experimental investigation." *Addict Behav* **27**(2): 167-177.
- Benítez-Díaz, P., L. Miranda-Contreras, R. V. Mendoza-Briceño, Z. Peña-Contreras and E. Palacios-Prü (2003). "Prenatal and Postnatal Contents of Amino Acid Neurotransmitters in Mouse Parietal Cortex." *Developmental Neuroscience* **25**(5): 366-374.

Berdichevsky, E., N. Riveros, S. Sanchez-Armass and F. Orrego (1983). "Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells in vitro." Neurosci Lett **36**(1): 75-80.

Berger, U. V. and M. A. Hediger (2000). "Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges, and dorsal root ganglia." J Comp Neurol **421**(3): 385-399.

Berlese, D. B., P. D. Sauzem, M. C. Carati, G. P. Guerra, J. A. Stiegemeier, C. F. Mello and M. A. Rubin (2005). "Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats." Neurobiol Learn Mem **83**(1): 48-53.

Berman, R. M., A. Cappiello, A. Anand, D. A. Oren, G. R. Heninger, D. S. Charney and J. H. Krystal (2000). "Antidepressant effects of ketamine in depressed patients." Biol Psychiatry **47**(4): 351-354.

Beurel, E., L. Song and R. S. Jope (2011). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice." Mol Psychiatry **16**(11): 1068-1070.

Bloch, M., R. C. Daly and D. R. Rubinow (2003). "Endocrine factors in the etiology of postpartum depression." Compr Psychiatry **44**(3): 234-246.

Bonestroo, H. J., C. H. Nijboer, C. T. van Velthoven, F. van Bel and C. J. Heijnen (2015). "The neonatal brain is not protected by osteopontin peptide treatment after hypoxia-ischemia." Dev Neurosci **37**(2): 142-152.

Borovska, J., V. Vyklicky, E. Stastna, V. Kapras, B. Slavikova, M. Horak, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr. (2012). "Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor." Br J Pharmacol **166**(3): 1069-1083.

Brautigan, R. A. and D. A. Eagles (1998). "Activation of NMDA and non-NMDA receptors by L-aspartate in the suprachiasmatic nucleus of the rat." Cell Signal **10**(2): 85-90.

Bridges, R. J., M. S. Stanley, M. W. Anderson, C. W. Cotman and A. R. Chamberlin (1991). "Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer." J Med Chem **34**(2): 717-725.

Brigman, J. L., T. Wright, G. Talani, S. Prasad-Mulcare, S. Jinde, G. K. Seabold, P. Mathur, M. I. Davis, R. Bock, R. M. Gustin, R. J. Colbran, V. A. Alvarez, K. Nakazawa, E. Delpire, D. M. Lovinger and A. Holmes (2010). "Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning." J Neurosci **30**(13): 4590-4600.

Bubser, M., U. Keseberg, P. K. Notz and W. J. Schmidt (1992). "Differential behavioural and neurochemical effects of competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in rats." Eur J Pharmacol **229**(1): 75-82.

Bueno, A., S. de Olmos, F. Manzini, N. L. Desmond and J. de Olmos (2003). "Strain and colony differences in the neurotoxic sequelae of MK-801 visualized with the amino-cupric-silver method." Exp Toxicol Pathol **55**(4): 287-294.

Bukanova, J. V., E. I. Solntseva, S. N. Kolbaev and E. Kudova (2018). "Modulation of GABA and glycine receptors in rat pyramidal hippocampal neurones by 3alpha5beta-pregnanolone derivatives." Neurochem Int **118**: 145-151.

Burgdorf, J., X. L. Zhang, C. Weiss, A. Gross, S. R. Boikess, R. A. Kroes, M. A. Khan, R. M. Burch, C. S. Rex, J. F. Disterhoff, P. K. Stanton and J. R. Moskal (2015). "The long-lasting antidepressant effects of rapastinel (GLYX-13) are associated with a metaplasticity process in the medial prefrontal cortex and hippocampus." Neuroscience **308**: 202-211.

Cai, W., Y. Zhu, K. Furuya, Z. Li, M. Sokabe and L. Chen (2008). "Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage." Neuropharmacology **55**(2): 127-138.

- Cameron, H. A., B. S. McEwen and E. Gould (1995). "Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus." J Neurosci **15**(6): 4687-4692.
- Carloni, S., S. Perrone, G. Buonocore, M. Longini, F. Proietti and W. Balduini (2008). "Melatonin protects from the long-term consequences of a neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats." J Pineal Res **44**(2): 157-164.
- Carlsen, J., J. De Olmos and L. Heimer (1982). "Tracing of two-neuron pathways in the olfactory system by the aid of transneuronal degeneration: projections to the amygdaloid body and hippocampal formation." J Comp Neurol **208**(2): 196-208.
- Cimadevilla, J. M., M. Wesierska, A. A. Fenton and J. Bures (2001). "Inactivating one hippocampus impairs avoidance of a stable room-defined place during dissociation of arena cues from room cues by rotation of the arena." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3531-3536.
- Clements, J. D. and G. L. Westbrook (1991). "Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor." Neuron **7**(4): 605-613.
- Compagnone, N. A. and S. H. Mellon (2000). "Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators." Front Neuroendocrinol **21**(1): 1-56.
- Crawley, J. N., J. R. Glowa, M. D. Majewska and S. M. Paul (1986). "Anxiolytic activity of an endogenous adrenal steroid." Brain Research **398**(2): 382-385.
- Curtis, D. R. and J. C. Watkins (1960). "The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids." J Neurochem **6**: 117-141.
- Danbolt, N. C., J. Storm-Mathisen and B. I. Kanner (1992). "An [Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes." Neuroscience **51**(2): 295-310.
- Davenport, C. J., H. Monyer and D. W. Choi (1988). "Tetrahydroaminoacridine selectively attenuates NMDA receptor-mediated neurotoxicity." European Journal of Pharmacology **154**(1): 73-78.
- Davis, K. L. and P. Powchik (1995). "Tacrine." Lancet **345**(8950): 625-630.
- Davis, S. M., G. W. Albers, H. C. Diener, K. R. Lees and J. Norris (1997). "Termination of Acute Stroke Studies Involving Selfotel Treatment. ASSIST Steering Committed." Lancet **349**(9044): 32.
- De Nicola, A. F., S. L. Gonzalez, F. Labombarda, M. C. Gonzalez Deniselle, L. Garay, R. Guennoun and M. Schumacher (2006). "Progesterone treatment of spinal cord injury: Effects on receptors, neurotrophins, and myelination." J Mol Neurosci **28**(1): 3-15.
- de Olmos, S., C. Bender, J. S. de Olmos and A. Lorenzo (2009). "Neurodegeneration and prolonged immediate early gene expression throughout cortical areas of the rat brain following acute administration of dizocilpine." Neuroscience **164**(3): 1347-1359.
- Dehnes, Y., F. A. Chaudhry, K. Ullensvang, K. P. Lehre, J. Storm-Mathisen and N. C. Danbolt (1998). "The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia." J Neurosci **18**(10): 3606-3619.
- Dejmek, L. (1990). "7-MEOTA." Drugs Future **15**(2): 126-129.
- Dennis, T., V. Beauchemin and N. Lavoie (1993). "Differential effects of olfactory bulbectomy on GABAA and GABAB receptors in the rat brain." Pharmacol Biochem Behav **46**(1): 77-82.
- Dennis, T., V. Beauchemin and N. Lavoie (1994). "Antidepressant-induced modulation of GABAA receptors and  $\beta$ -adrenoceptors but not GABAB receptors in the frontal cortex of olfactory bulbectomised rats." European Journal of Pharmacology **262**(1): 143-148.
- Devanand, D. P., K. S. Michaels-Marston, X. Liu, G. H. Pelton, M. Padilla, K. Marder, K. Bell, Y. Stern and R. Mayeux (2000). "Olfactory deficits in patients with mild cognitive impairment predict Alzheimer's disease at follow-up." Am J Psychiatry **157**(9): 1399-1405.

Dillon, G. M., X. Qu, J. N. Marcus and J. C. Dodart (2008). "Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice." Neurobiol Learn Mem **90**(2): 426-433.

Dix, S., G. Gilmour, S. Potts, J. W. Smith and M. Tricklebank (2010). "A within-subject cognitive battery in the rat: differential effects of NMDA receptor antagonists." Psychopharmacology (Berl) **212**(2): 227-242.

Dobbing, J. and J. Sands (1979). "Comparative aspects of the brain growth spurt." Early Hum Dev **3**(1): 79-83.

Duke, A. A., P. R. Giancola, D. H. Morris, J. C. D. Holt and R. L. Gunn (2011). "Alcohol dose and aggression: another reason why drinking more is a bad idea." Journal of studies on alcohol and drugs **72**(1): 34-43.

Duman, R. S., G. R. Heninger and E. J. Nestler (1997). "A molecular and cellular theory of depression." Arch Gen Psychiatry **54**(7): 597-606.

Dvergsten, C. L., G. J. Fosmire, D. A. Ollerich and H. H. Sandstead (1983). "Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. I. Impaired acquisition of granule cells." Brain Res **271**(2): 217-226.

Dvergsten, C. L., G. J. Fosmire, D. A. Ollerich and H. H. Sandstead (1984). "Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. II. Impaired maturation of Purkinje cells." Brain Res **318**(1): 11-20.

Dvergsten, C. L., L. A. Johnson and H. H. Sandstead (1984). "Alterations in the postnatal development of the cerebellar cortex due to zinc deficiency. III. Impaired dendritic differentiation of basket and stellate cells." Developmental Brain Research **16**(1): 21-26.

Dyker, A. G. and K. R. Lees (1999). "Remacemide hydrochloride: a double-blind, placebo-controlled, safety and tolerability study in patients with acute ischemic stroke." Stroke **30**(9): 1796-1801.

Erecinska, M. and I. A. Silver (1990). "Metabolism and role of glutamate in mammalian brain." Prog Neurobiol **35**(4): 245-296.

Eriksson, P. S., E. Perfilieva, T. Bjork-Eriksson, A. M. Alborn, C. Nordborg, D. A. Peterson and F. H. Gage (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.

Errico, F., R. Nistico, G. Palma, M. Federici, A. Affuso, E. Brillì, E. Topo, D. Centonze, G. Bernardi, Y. Bozzi, A. D'Aniello, R. Di Lauro, N. B. Mercuri and A. Usiello (2008). "Increased levels of d-aspartate in the hippocampus enhance LTP but do not facilitate cognitive flexibility." Mol Cell Neurosci **37**(2): 236-246.

Eser, D., C. Schule, T. C. Baghai, E. Romeo and R. Rupprecht (2006). "Neuroactive steroids in depression and anxiety disorders: clinical studies." Neuroendocrinology **84**(4): 244-254.

Fava, M. and K. S. Kendler (2000). "Major depressive disorder." Neuron **28**(2): 335-341.

Ferbinteanu, J. and R. J. McDonald (2001). "Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference." Hippocampus **11**(2): 187-200.

Filippi, L., P. Fiorini, S. Catarzi, E. Berti, L. Padrini, E. Landucci, G. Donzelli, L. Bartalena, E. Fiorentini, A. Boldrini, M. Giampietri, R. T. Scaramuzzo, G. la Marca, M. L. Della Bona, S. Fiori, F. Tinelli, A. Bancalè, A. Guzzetta, G. Cioni, T. Pisano, M. Falchi and R. Guerrini (2018). "Safety and efficacy of topiramate in neonates with hypoxic ischemic encephalopathy treated with hypothermia (NeoNATI): a feasibility study." J Matern Fetal Neonatal Med **31**(8): 973-980.

Fix, A. S., J. W. Horn, K. A. Wightman, C. A. Johnson, G. G. Long, R. W. Storts, N. Farber, D. F. Wozniak and J. W. Olney (1993). "Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex." Exp Neurol **123**(2): 204-215.

Flood, J. F., J. E. Morley and E. Roberts (1995). "Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(23): 10806-10810.

Forrest, D., M. Yuzaki, H. D. Soares, L. Ng, D. C. Luk, M. Sheng, C. L. Stewart, J. I. Morgan, J. A. Connor and T. Curran (1994). "Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death." Neuron **13**(2): 325-338.

Freeman, S. E. and R. M. Dawson (1991). "Tacrine: A pharmacological review." Progress in Neurobiology **36**(4): 257-277.

Gage, G. J., D. R. Kipke and W. Shain (2012). "Whole animal perfusion fixation for rodents." Journal of visualized experiments : JoVE(65): 3564.

Gauthier, S., H. Loft and J. Cummings (2008). "Improvement in behavioural symptoms in patients with moderate to severe Alzheimer's disease by memantine: a pooled data analysis." Int J Geriatr Psychiatry **23**(5): 537-545.

Gilbert Evans, S. E., L. E. Ross, E. M. Sellers, R. H. Purdy and M. K. Romach (2005). "3alpha-reduced neuroactive steroids and their precursors during pregnancy and the postpartum period." Gynecol Endocrinol **21**(5): 268-279.

Gill, R., A. C. Foster and G. N. Woodruff (1987). "Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil." J Neurosci **7**(10): 3343-3349.

Gleason, S. D. and H. E. Shannon (1997). "Blockade of phencyclidine-induced hyperlocomotion by olanzapine, clozapine and serotonin receptor subtype selective antagonists in mice." Psychopharmacology (Berl) **129**(1): 79-84.

Goff, D. C. (2017). "D-cycloserine in Schizophrenia: New Strategies for Improving Clinical Outcomes by Enhancing Plasticity." Curr Neuropharmacol **15**(1): 21-34.

Gould, E., P. Tanapat, B. S. McEwen, G. Flugge and E. Fuchs (1998). "Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 3168-3171.

Grabrucker, A. M., M. Rowan and C. C. Garner (2011). "Brain-Delivery of Zinc-Ions as Potential Treatment for Neurological Diseases: Mini Review." Drug Deliv Lett **1**(1): 13-23.

Granacher, R. P. and R. J. Baldessarini (1975). "Physostigmine. Its use in acute anticholinergic syndrome with antidepressant and antiparkinson drugs." Arch Gen Psychiatry **32**(3): 375-380.

Grotta, J., W. Clark, B. Coull, L. C. Pettigrew, B. Mackay, L. B. Goldstein, I. Meissner, D. Murphy and L. LaRue (1995). "Safety and tolerability of the glutamate antagonist CGS 19755 (Selfotel) in patients with acute ischemic stroke. Results of a phase IIa randomized trial." Stroke **26**(4): 602-605.

Guerrini, R. and L. Parmeggiani (2006). "Topiramate and its clinical applications in epilepsy." Expert Opin Pharmacother **7**(6): 811-823.

Guillemin, G. J., B. J. Brew, C. E. Noonan, O. Takikawa and K. M. Cullen (2005). "Indoleamine 2,3 dioxxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus." Neuropathol Appl Neurobiol **31**(4): 395-404.

Gundersen, V., F. A. Chaudhry, J. G. Bjaalie, F. Fonnum, O. P. Ottersen and J. Storm-Mathisen (1998). "Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus." J Neurosci **18**(16): 6059-6070.

Gursoy, E., A. Cardounel and M. Kalimi (2001). "Pregnenolone protects mouse hippocampal (HT-22) cells against glutamate and amyloid beta protein toxicity." Neurochem Res **26**(1): 15-21.

Hall, R. D. and F. Macrides (1983). "Olfactory bulbectomy impairs the rat's radial-maze behavior." Physiol Behav **30**(5): 797-803.

Hansen, H. H., T. Briem, M. Dziejko, M. Sifringer, A. Voss, W. Rzeski, B. Zdzisinska, F. Thor, R. Heumann, A. Stepulak, P. Bittigau and C. Ikonomidou (2004). "Mechanisms leading to disseminated apoptosis following NMDA receptor blockade in the developing rat brain." Neurobiol Dis **16**(2): 440-453.

Harata, N., J. Katayama and N. Akaike (1999). "Excitatory amino acid responses in relay neurons of the rat lateral geniculate nucleus." Neuroscience **89**(1): 109-125.

Harkins, S. W., J. R. Taylor, V. Mattay and W. Regelson (1997). "Tacrine treatment in Alzheimer's disease enhances cerebral blood flow and mental status and decreases caregiver suffering." Ann N Y Acad Sci **826**: 472-474.

Harris, A. Z. and D. L. Pettit (2007). "Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices." J Physiol **584**(Pt 2): 509-519.

Harrison, N. L. and M. A. Simmonds (1984). "Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic." Brain Res **323**(2): 287-292.

Hartvig, P., J. Valtysson, K. J. Lindner, J. Kristensen, R. Karlsten, L. L. Gustafsson, J. Persson, J. O. Svensson, I. Oye, G. Antoni and et al. (1995). "Central nervous system effects of subdissociative doses of (S)-ketamine are related to plasma and brain concentrations measured with positron emission tomography in healthy volunteers." Clin Pharmacol Ther **58**(2): 165-173.

Hashimoto, A., S. Kumashiro, T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi, T. Mito, S. Takashima, N. Doi, Y. Mizutani, T. Yamazaki and et al. (1993). "Embryonic development and postnatal changes in free D-aspartate and D-serine in the human prefrontal cortex." J Neurochem **61**(1): 348-351.

Hashimoto, A., T. Nishikawa, T. Hayashi, N. Fujii, K. Harada, T. Oka and K. Takahashi (1992). "The presence of free D-serine in rat brain." FEBS Lett **296**(1): 33-36.

Hashimoto, A., T. Nishikawa, T. Oka, K. Takahashi and T. Hayashi (1992). "Determination of free amino acid enantiomers in rat brain and serum by high-performance liquid chromatography after derivatization with N-tert.-butyloxycarbonyl-L-cysteine and o-phthalaldehyde." J Chromatogr **582**(1-2): 41-48.

Hashimoto, A., T. Oka and T. Nishikawa (1995). "Anatomical distribution and postnatal changes in endogenous free D-aspartate and D-serine in rat brain and periphery." Eur J Neurosci **7**(8): 1657-1663.

Haugeto, O., K. Ullensvang, L. M. Levy, F. A. Chaudhry, T. Honore, M. Nielsen, K. P. Lehre and N. C. Danbolt (1996). "Brain glutamate transporter proteins form homomultimers." J Biol Chem **271**(44): 27715-27722.

Hayley, S. and D. Litteljohn (2013). "Neuroplasticity and the next wave of antidepressant strategies." Frontiers in cellular neuroscience **7**: 218-218.

He, J., C. O. Evans, S. W. Hoffman, N. M. Oyesiku and D. G. Stein (2004). "Progesterone and allopregnanolone reduce inflammatory cytokines after traumatic brain injury." Exp Neurol **189**(2): 404-412.

Heresco-Levy, U., G. Gelfin, B. Bloch, R. Levin, S. Edelman, D. C. Javitt and I. Kremer (2013). "A randomized add-on trial of high-dose D-cycloserine for treatment-resistant depression." Int J Neuropsychopharmacol **16**(3): 501-506.

Herlenius, E. and H. Lagercrantz (2004). "Development of neurotransmitter systems during critical periods." Exp Neurol **190 Suppl 1**: S8-21.

Herman, J. P. (2013). "Neural control of chronic stress adaptation." Front Behav Neurosci **7**: 61.

Hershkowitz, N. and M. A. Rogawski (1991). "Tetrahydroaminoacridine block of N-methyl-D-aspartate-activated cation channels in cultured hippocampal neurons." Mol Pharmacol **39**(5): 592-598.



Higuchi, M., F. N. Single, M. Kohler, B. Sommer, R. Sprengel and P. H. Seeburg (1993). "RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency." *Cell* **75**(7): 1361-1370.

Hill, M., D. Cibula, H. Havlikova, L. Kancheva, T. Fait, R. Kancheva, A. Parizek and L. Starka (2007). "Circulating levels of pregnanolone isomers during the third trimester of human pregnancy." *J Steroid Biochem Mol Biol* **105**(1-5): 166-175.

Ho, Y. J., Y. C. Chang, T. M. Liu, M. Y. Tai, C. S. Wong and Y. F. Tsai (2000). "Striatal glutamate release during novelty exposure-induced hyperactivity in olfactory bulbectomized rats." *Neurosci Lett* **287**(2): 117-120.

Hollmann, M., M. Hartley and S. Heinemann (1991). "Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition." *Science* **252**(5007): 851-853.

Holmseth, S., Y. Zhou, V. V. Follin-Arbelet, K. P. Lehre, D. E. Bergles and N. C. Danbolt (2012). "Specificity controls for immunocytochemistry: the antigen preadsorption test can lead to inaccurate assessment of antibody specificity." *J Histochem Cytochem* **60**(3): 174-187.

Holubova, K., L. Kleteckova, M. Skurlova, J. Ricny, A. Stuchlik and K. Vales (2016). "Rapamycin blocks the antidepressant effect of ketamine in task-dependent manner." *Psychopharmacology (Berl)* **233**(11): 2077-2097.

Horak, M., K. Holubova, E. Nepovimova, J. Krusek, M. Kaniakova, J. Korabecny, L. Vyklicky, K. Kuca, A. Stuchlik, J. Ricny, K. Vales and O. Soukup (2017). "The pharmacology of tacrine at N-methyl-D-aspartate receptors." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **75**: 54-62.

Horak, M., K. Vlcek, M. Petrovic, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr. (2004). "Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors." *J Neurosci* **24**(46): 10318-10325.

Hosie, A. M., M. E. Wilkins, H. M. da Silva and T. G. Smart (2006). "Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites." *Nature* **444**(7118): 486-489.

Hu, J., X. Wang, D. Liu, Q. Wang and L. Q. Zhu (2012). "Olfactory deficits induce neurofilament hyperphosphorylation." *Neurosci Lett* **506**(2): 180-183.

Hu, M. C., N. C. Hsu, N. B. El Hadj, C. I. Pai, H. P. Chu, C. K. Wang and B. C. Chung (2002). "Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1." *Mol Endocrinol* **16**(8): 1943-1950.

Chandran, A., A. H. Iyo, C. S. Jernigan, B. Legutko, M. C. Austin and B. Karolewicz (2013). "Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **40**: 240-245.

Chen, H. S., J. W. Pellegrini, S. K. Aggarwal, S. Z. Lei, S. Warach, F. E. Jensen and S. A. Lipton (1992). "Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity." *J Neurosci* **12**(11): 4427-4436.

Chen, J., M. Chopp and Y. Li (1999). "Neuroprotective effects of progesterone after transient middle cerebral artery occlusion in rat." *J Neurol Sci* **171**(1): 24-30.

Chen, W., Q. Ma, H. Suzuki, R. Hartman, J. Tang and J. H. Zhang (2011). "Osteopontin reduced hypoxia-ischemia neonatal brain injury by suppression of apoptosis in a rat pup model." *Stroke* **42**(3): 764-769.

Chi, O. Z., M. Anwar, A. K. Sinha and H. R. Weiss (1991). "Effects of MK-801 on cerebral regional oxygen consumption in focal cerebral ischemia in rats." *Circ Res* **69**(2): 414-420.

Chiarugi, A., E. Meli and F. Moroni (2001). "Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid." *J Neurochem* **77**(5): 1310-1318.

Christine, C. W. and D. W. Choi (1990). "Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons." *J Neurosci* **10**(1): 108-116.

Ikonomidou, C., P. Bittigau, M. J. Ishimaru, D. F. Wozniak, C. Koch, K. Genz, M. T. Price, V. Stefovská, F. Horster, T. Tenkova, K. Dikranian and J. W. Olney (2000). "Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome." *Science* **287**(5455): 1056-1060.

Ikonomidou, C., P. Bittigau, C. Koch, K. Genz, F. Hoerster, U. Felderhoff-Mueser, T. Tenkova, K. Dikranian and J. W. Olney (2001). "Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain." *Biochem Pharmacol* **62**(4): 401-405.

Ikonomidou, C., F. Bosch, M. Miksa, P. Bittigau, J. Vockler, K. Dikranian, T. I. Tenkova, V. Stefovská, L. Turski and J. W. Olney (1999). "Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain." *Science* **283**(5398): 70-74.

Inoue, K., D. Branigan and Z. G. Xiong (2010). "Zinc-induced neurotoxicity mediated by transient receptor potential melastatin 7 channels." *J Biol Chem* **285**(10): 7430-7439.

Ivanova, M., S. Belcheva, I. Belcheva, Z. Stoyanov and R. Tashev (2014). "Modulatory effect of VIP injected into hippocampal CA1 area on anxiety in olfactory bulbectomized rats." *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **74**(3): 317-327.

Jarrard, L. E. (2002). "Use of excitotoxins to lesion the hippocampus: update." *Hippocampus* **12**(3): 405-414.

Jernigan, C. S., D. B. Goswami, M. C. Austin, A. H. Iyo, A. Chandran, C. A. Stockmeier and B. Karolewicz (2011). "The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **35**(7): 1774-1779.

Johnson, J. W. and P. Ascher (1992). "Equilibrium and kinetic study of glycine action on the N-methyl-D-aspartate receptor in cultured mouse brain neurons." *J Physiol* **455**: 339-365.

Juul, S. E., A. T. Yachnis, A. M. Rojiani and R. D. Christensen (1999). "Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain." *Pediatr Dev Pathol* **2**(2): 148-158.

Kaandorp, J. J., M. J. N. L. Benders, E. Schuit, C. M. A. Rademaker, M. A. Oudijk, M. M. Porath, S. B. Oetomo, M. G. A. J. Wouters, R. M. van Elburg, M. T. M. Franssen, A. F. Bos, T. R. de Haan, J. Boon, I. P. de Boer, R. J. P. Rijnders, C. J. W. F. M. Jacobs, L. H. C. J. Scheepers, D. A. W. Gavilanes, K. W. M. Bloemenkamp, M. Rijken, C. A. van Meir, J. S. von Lindern, A. J. M. Huisjes, S. C. M. J. E. R. Bakker, B. W. J. Mol, G. H. A. Visser, F. Van Bel and J. B. Derks (2015). "Maternal allopurinol administration during suspected fetal hypoxia: a novel neuroprotective intervention? A multicentre randomised placebo controlled trial." *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* **100**(3): F216.

Kaandorp, J. J., F. van Bel, S. Veen, J. B. Derks, F. Groenendaal, M. Rijken, E. Roze, M. M. Venema, C. M. Rademaker, A. F. Bos and M. J. Benders (2012). "Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: follow-up of two randomised controlled trials." *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **97**(3): F162-166.

Kaniakova, M., L. Kleteckova, K. Lichnerova, K. Holubova, K. Skrenkova, M. Korinek, J. Krusek, T. Smejkalova, J. Korabecny, K. Vales, O. Soukup and M. Horak (2018). "7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo." *Neuropharmacology* **140**: 217-232.

Kapras, V., A. Slavickova, E. Stastna, L. Vyklicky, Jr., K. Vales and H. Chodounska (2012). "Synthesis of deuterium labeled NMDA receptor inhibitor - 20-Oxo-5beta-[9,12,12-(2)H(3)]pregnan-3alpha-yl-L-glutamyl 1-ester." *Steroids* **77**(3): 282-287.

Karege, F., G. Perret, G. Bondolfi, M. Schwald, G. Bertschy and J. M. Aubry (2002). "Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients." *Psychiatry Res* **109**(2): 143-148.

Karishma, K. K. and J. Herbert (2002). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) stimulates neurogenesis in the hippocampus of the rat, promotes survival of newly formed neurons and prevents corticosterone-induced suppression." *Eur J Neurosci* **16**(3): 445-453.

Kaster, M. P., D. G. Machado, A. R. S. Santos and A. L. S. Rodrigues (2012). "Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine." Pharmacological Reports **64**(3): 706-713.

Kawarai, Y., H. Tanaka, T. Kobayashi and M. Shozu (2018). "Progesterone as a Postnatal Prophylactic Agent for Encephalopathy Caused by Prenatal Hypoxic Ischemic Insult." Endocrinology **159**(6): 2264-2274.

Kessler, M., T. Terramani, G. Lynch and M. Baudry (1989). "A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists." J Neurochem **52**(4): 1319-1328.

Kim, P. M., X. Duan, A. S. Huang, C. Y. Liu, G. L. Ming, H. Song and S. H. Snyder (2010). "Aspartate racemase, generating neuronal D-aspartate, regulates adult neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(7): 3175-3179.

Kleckner, N. W. and R. Dingledine (1988). "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." Science **241**(4867): 835-837.

Kleteckova, L., G. Tsenov, H. Kubova, A. Stuchlik and K. Vales (2014). "Neuroprotective effect of the 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats." Neurosci Lett **564**: 11-15.

Knytl P, M. P. (2016). "Neuroaktivní steroidy, neurosteroidy a jejich úloha ve schizofrenii. ." Psychiatrie **3**(20): 132-138.

Koenig, H. L., M. Schumacher, B. Ferzaz, A. N. Thi, A. Ressouches, R. Guennoun, I. Jung-Testas, P. Robel, Y. Akwa and E. E. Baulieu (1995). "Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells." Science **268**(5216): 1500-1503.

Kokate, T. G., B. E. Svensson and M. A. Rogawski (1994). "Anticonvulsant activity of neurosteroids: correlation with gamma-aminobutyric acid-evoked chloride current potentiation." J Pharmacol Exp Ther **270**(3): 1223-1229.

Komuro, H. and P. Rakic (1993). "Modulation of neuronal migration by NMDA receptors." Science **260**(5104): 95-97.

Korinek, M., V. Kapras, V. Vyklicky, E. Adamusova, J. Borovska, K. Vales, A. Stuchlik, M. Horak, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr. (2011). "Neurosteroid modulation of N-methyl-D-aspartate receptors: molecular mechanism and behavioral effects." Steroids **76**(13): 1409-1418.

Korinek, M., V. Vyklicky, J. Borovska, K. Lichnerova, M. Kaniakova, B. Krausova, J. Krusek, A. Balik, T. Smejkalova, M. Horak and L. Vyklicky (2015). "Cholesterol modulates open probability and desensitization of NMDA receptors." J Physiol **593**(10): 2279-2293.

Kotermanski, S. E. and J. W. Johnson (2009). "Mg<sup>2+</sup> imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine." J Neurosci **29**(9): 2774-2779.

Krausova, B., B. Slavikova, M. Nekardova, P. Hubalkova, V. Vyklicky, H. Chodounska, L. Vyklicky and E. Kudova (2018). "Positive Modulators of the N-Methyl-d-aspartate Receptor: Structure-Activity Relationship Study of Steroidal 3-Hemiesters." **61**(10): 4505-4516.

Krystal, J. H., L. P. Karper, J. P. Seibyl, G. K. Freeman, R. Delaney, J. D. Bremner, G. R. Heninger, M. B. Bowers, Jr. and D. S. Charney (1994). "Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses." Arch Gen Psychiatry **51**(3): 199-214.

Kubik, S., H. Buchtova, K. Vales and A. Stuchlik (2014). "MK-801 Impairs Cognitive Coordination on a Rotating Arena (Carousel) and Contextual Specificity of Hippocampal Immediate-Early Gene Expression in a Rat Model of Psychosis." Front Behav Neurosci **8**: 75.

Kuhn, P. H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J. W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner and S. F. Lichtenthaler (2010). "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." Embo j **29**(17): 3020-3032.

- Kumar, U. (2004). "Characterization of striatal cultures with the effect of QUIN and NMDA." Neurosci Res **49**(1): 29-38.
- Kumral, A., N. Uysal, K. Tugyan, A. Sonmez, O. Yilmaz, N. Gokmen, M. Kiray, S. Genc, N. Duman, T. F. Koroglu, H. Ozkan and K. Genc (2004). "Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats." Behav Brain Res **153**(1): 77-86.
- Kutsuwada, T., K. Sakimura, T. Manabe, C. Takayama, N. Katakura, E. Kushiya, R. Natsume, M. Watanabe, Y. Inoue, T. Yagi, S. Aizawa, M. Arakawa, T. Takahashi, Y. Nakamura, H. Mori and M. Mishina (1996). "Impairment of suckling response, trigeminal neuronal pattern formation, and hippocampal LTD in NMDA receptor epsilon 2 subunit mutant mice." Neuron **16**(2): 333-344.
- Labrie, V., A. H. Wong and J. C. Roder (2012). "Contributions of the D-serine pathway to schizophrenia." Neuropharmacology **62**(3): 1484-1503.
- Ladurelle, N., B. Eychemme, D. Denton, J. Blair-West, M. Schumacher, P. Robel and E. Baulieu (2000). "Prolonged intracerebroventricular infusion of neurosteroids affects cognitive performances in the mouse." Brain Res **858**(2): 371-379.
- Lahiri, D. K. (1994). "Reversibility of the effect of tacrine on the secretion of the beta-amyloid precursor protein in cultured cells." Neurosci Lett **181**(1-2): 149-152.
- Lapchak, P. A. (2004). "The neuroactive steroid 3-alpha-ol-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a selective NMDA receptor antagonist improves behavioral performance following spinal cord ischemia." Brain Res **997**(2): 152-158.
- Lapchak, P. A. (2006). "3alpha-OL-5-beta-pregnan-20-one hemisuccinate, a steroidal low-affinity NMDA receptor antagonist improves clinical rating scores in a rabbit multiple infarct ischemia model: synergism with tissue plasminogen activator." Exp Neurol **197**(2): 531-537.
- Lee, B.-H. and Y.-K. Kim (2010). "The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment." Psychiatry investigation **7**(4): 231-235.
- Lee, H. K., K. Takamiya, J. S. Han, H. Man, C. H. Kim, G. Rumbaugh, S. Yu, L. Ding, C. He, R. S. Petralia, R. J. Wenthold, M. Gallagher and R. L. Huganir (2003). "Phosphorylation of the AMPA receptor GluR1 subunit is required for synaptic plasticity and retention of spatial memory." Cell **112**(5): 631-643.
- Lees, K. R. (1997). "Cerestat and other NMDA antagonists in ischemic stroke." Neurology **49**(5 Suppl 4): S66-69.
- Lehre, K. P. and N. C. Danbolt (1998). "The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain." J Neurosci **18**(21): 8751-8757.
- Lehre, K. P., S. Davanger and N. C. Danbolt (1997). "Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina." Brain Res **744**(1): 129-137.
- Leonard, B. E. and M. Tuite (1981). Anatomical, Physiological, and Behavioral Aspects of Olfactory Bulbectomy in The Rat. International Review of Neurobiology. J. R. Smythies and R. J. Bradley, Academic Press. **22**: 251-286.
- Lesage, A. and T. Steckler (2010). "Metabotropic glutamate mGlu1 receptor stimulation and blockade: therapeutic opportunities in psychiatric illness." Eur J Pharmacol **639**(1-3): 2-16.
- Leskiewicz, M., B. Budziszewska, L. Jaworska-Feil and W. Lason (1997). "Effects of neurosteroids on kainate-induced seizures, neurotoxicity and lethality in mice." Pol J Pharmacol **49**(6): 411-417.
- Li, H., G. Klein, P. Sun and A. M. Buchan (2001). "Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces neuronal injury in a rat model of global cerebral ischemia." Brain Res **888**(2): 263-266.
- Li, N., B. Lee, R. J. Liu, M. Banasr, J. M. Dwyer, M. Iwata, X. Y. Li, G. Aghajanian and R. S. Duman (2010). "mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists." Science **329**(5994): 959-964.

Li, N., R. J. Liu, J. M. Dwyer, M. Banasr, B. Lee, H. Son, X. Y. Li, G. Aghajanian and R. S. Duman (2011). "Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure." *Biol Psychiatry* **69**(8): 754-761.

Li, Z., R. Zhou, S. Cui, G. Xie, W. Cai, M. Sokabe and L. Chen (2006). "Dehydroepiandrosterone sulfate prevents ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 by up-regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor." *Neuropharmacology* **51**(5): 958-966.

Lichnerova, K., M. Kaniakova, S. P. Park, K. Skrenkova, Y. X. Wang, R. S. Petralia, Y. H. Suh and M. Horak (2015). "Two N-glycosylation Sites in the GluN1 Subunit Are Essential for Releasing N-methyl-d-aspartate (NMDA) Receptors from the Endoplasmic Reticulum." *J Biol Chem* **290**(30): 18379-18390.

Lima-Ojeda, J. M., M. A. Vogt, N. Pfeiffer, C. Dormann, G. Kohr, R. Sprengel, P. Gass and D. Inta (2013). "Pharmacological blockade of GluN2B-containing NMDA receptors induces antidepressant-like effects lacking psychotomimetic action and neurotoxicity in the perinatal and adult rodent brain." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **45**: 28-33.

Lipton, J. O. and M. Sahin (2014). "The neurology of mTOR." *Neuron* **84**(2): 275-291.

Lowe, D. W., J. L. Fraser, L. G. Rollins, J. Bentzley, X. Nie, R. Martin, I. Singh and D. Jenkins (2017). "Vitamin D improves functional outcomes in neonatal hypoxic ischemic male rats treated with N-acetylcysteine and hypothermia." *Neuropharmacology* **123**: 186-200.

Lumia, A. R., M. H. Teicher, F. Salchli, E. Ayers and B. Possidente (1992). "Olfactory bulbectomy as a model for agitated hyposerotonergic depression." *Brain Research* **587**(2): 181-185.

Macrae, I. M., M. J. Robinson, D. I. Graham, J. L. Reid and J. McCulloch (1993). "Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences." *J Cereb Blood Flow Metab* **13**(2): 276-284.

Madeira, C., M. V. Lourenco, C. Vargas-Lopes, C. K. Suemoto, C. O. Brandao and T. Reis (2015). "d-serine levels in Alzheimer's disease: implications for novel biomarker development." **5**: e561.

Maeng, S., C. A. Zarate, Jr., J. Du, R. J. Schloesser, J. McCammon, G. Chen and H. K. Manji (2008). "Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors." *Biol Psychiatry* **63**(4): 349-352.

Maguire, J. L., B. M. Stell, M. Rafizadeh and I. Mody (2005). "Ovarian cycle-linked changes in GABA(A) receptors mediating tonic inhibition alter seizure susceptibility and anxiety." *Nat Neurosci* **8**(6): 797-804.

Maier, C. M., F. Yu, T. Nishi, S. J. Lathrop and P. H. Chan (2006). "Interferon-beta fails to protect in a model of transient focal stroke." *Stroke* **37**(4): 1116-1119.

Malik, A. S., R. K. Narayan, W. W. Wendling, R. W. Cole, L. L. Pashko, A. G. Schwartz and K. I. Strauss (2003). "A novel dehydroepiandrosterone analog improves functional recovery in a rat traumatic brain injury model." *Journal of neurotrauma* **20**(5): 463-476.

Manahan-Vaughan, D., D. von Haebler, C. Winter, G. Juckel and U. Heinemann (2008). "A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats." *Hippocampus* **18**(2): 125-134.

Mares, P. and L. Velisek (1992). "N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced seizures in developing rats." *Brain Res Dev Brain Res* **65**(2): 185-189.

Martel, M. A., T. J. Ryan, K. F. Bell, J. H. Fowler, A. McMahan, B. Al-Mubarak, N. H. Komiyama, K. Horsburgh, P. C. Kind, S. G. Grant, D. J. Wyllie and G. E. Hardingham (2012). "The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults." *Neuron* **74**(3): 543-556.

Mateffyova, A., J. Otahal, G. Tsenov, P. Mares and H. Kubova (2006). "Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death, development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life." Eur J Neurosci **24**(2): 351-360.

Mathys, M. L., J. McCarrell, R. B. Sleeper and A. T. Blaszczyk (2013). "Visual hallucinations treated with the reinitiation of memantine in a patient with Lewy body dementia." Ann Pharmacother **47**(2): e10.

Mayo, W., V. Lemaire, J. Malaterre, J. J. Rodriguez, M. Cayre, M. G. Stewart, M. Kharouby, G. Rougon, M. Le Moal, P. V. Piazza and D. N. Abrous (2005). "Pregnenolone sulfate enhances neurogenesis and PSA-NCAM in young and aged hippocampus." Neurobiology of Aging **26**(1): 103-114.

McAuley, M. A. (1995). "Rodent models of focal ischemia." Cerebrovasc Brain Metab Rev **7**(2): 153-180.

Mellon, S. H. and C. F. Deschepper (1993). "Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain." Brain Res **629**(2): 283-292.

Mellon, S. H. and H. Vaudry (2001). Biosynthesis of neurosteroids and regulation of their synthesis. International Review of Neurobiology, Academic Press. **46**: 33-78.

Merchant, R. E., M. R. Bullock, C. A. Carmack, A. K. Shah, K. D. Wilner, G. Ko and S. A. Williams (1999). "A double-blind, placebo-controlled study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of CP-101,606 in patients with a mild or moderate traumatic brain injury." Ann N Y Acad Sci **890**: 42-50.

Miczek, K. A., E. W. Fish and J. F. De Bold (2003). "Neurosteroids, GABAA receptors, and escalated aggressive behavior." Horm Behav **44**(3): 242-257.

Miller, C. L., I. C. Llenos, J. R. Dulay and S. Weis (2006). "Upregulation of the initiating step of the kynurenine pathway in postmortem anterior cingulate cortex from individuals with schizophrenia and bipolar disorder." Brain Res **1073-1074**: 25-37.

Miller, O. H., L. Yang, C. C. Wang, E. A. Hargroder, Y. Zhang, E. Delpire and B. J. Hall (2014). "GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine." Elife **3**: e03581.

Monastero, R., C. Camarda, C. Pipia and R. Camarda (2007). "Visual hallucinations and agitation in Alzheimer's disease due to memantine: report of three cases." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **78**(5): 546-546.

Monyer, H., N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann and P. H. Seeburg (1994). "Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors." Neuron **12**(3): 529-540.

Monyer, H., R. Sprengel, R. Schoepfer, A. Herb, M. Higuchi, H. Lomeli, N. Burnashev, B. Sakmann and P. H. Seeburg (1992). "Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes." Science **256**(5060): 1217-1221.

Morales-Medina, J. C., I. Juarez, E. Venancio-Garcia, S. N. Cabrera, C. Menard, W. Yu, G. Flores, N. Mechawar and R. Quirion (2013). "Impaired structural hippocampal plasticity is associated with emotional and memory deficits in the olfactory bulbectomized rat." Neuroscience **236**: 233-243.

Morali, G., G. Letechipia-Vallejo, E. Lopez-Loeza, P. Montes, L. Hernandez-Morales and M. Cervantes (2005). "Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus." Neurosci Lett **382**(3): 286-290.

Mucignat-Caretta, C., M. Bondi and A. Caretta (2006). "Time course of alterations after olfactory bulbectomy in mice." Physiol Behav **89**(5): 637-643.

Muir, K. W. and K. R. Lees (1995). "Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs." Stroke **26**(3): 503-513.

Murakami, K., A. Fellous, E. E. Baulieu and P. Robel (2000). "Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3579-3584.

Nakajima, A., T. Yamakuni, M. Haraguchi, N. Omae, S. Y. Song, C. Kato, O. Nakagawasai, T. Tadano, A. Yokosuka, Y. Mimaki, Y. Sashida and Y. Ohizumi (2007). "Nobiletin, a citrus flavonoid that improves memory impairment, rescues bulbectomy-induced cholinergic neurodegeneration in mice." J Pharmacol Sci **105**(1): 122-126.

Nappi, R. E., F. Petraglia, S. Luisi, F. Polatti, C. Farina and A. R. Genazzani (2001). "Serum allopregnanolone in women with postpartum "blues"." Obstet Gynecol **97**(1): 77-80.

Naylor, J. C., J. D. Kilts, C. M. Hulette, D. C. Steffens, D. G. Blazer, J. F. Ervin, J. L. Strauss, T. B. Allen, M. W. Massing, V. M. Payne, N. A. Youssef, L. J. Shampine and C. E. Marx (2010). "Allopregnanolone levels are reduced in temporal cortex in patients with Alzheimer's disease compared to cognitively intact control subjects." Biochimica et biophysica acta **1801**(8): 951-959.

Nelson, M. E. and E. X. Albuquerque (1994). "9-Aminoacridines act at a site different from that for Mg<sup>2+</sup> in blockade of the N-methyl-D-aspartate receptor channel." Mol Pharmacol **46**(1): 151-160.

Nesterova, I. V., E. V. Gurevich, V. I. Nesterov, N. A. Otmakhova and N. V. Bobkova (1997). "Bulbectomy-induced loss of raphe neurons is counteracted by antidepressant treatment." Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry **21**(1): 127-140.

Nguyen, P. N., E. B. Yan, M. Castillo-Melendez, D. W. Walker and J. J. Hirst (2004). "Increased allopregnanolone levels in the fetal sheep brain following umbilical cord occlusion." J Physiol **560**(Pt 2): 593-602.

Norholm, S. D. and C. C. Ouimet (2001). "Altered dendritic spine density in animal models of depression and in response to antidepressant treatment." Synapse **42**(3): 151-163.

Nowak, G., M. Siwek, D. Dudek, A. Zieba and A. Pilc (2003). "Effect of zinc supplementation on antidepressant therapy in unipolar depression: a preliminary placebo-controlled study." Pol J Pharmacol **55**(6): 1143-1147.

O'Regan, A. and J. S. Berman (2000). "Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation." Int J Exp Pathol **81**(6): 373-390.

Olney, J. W. (1971). "Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study." J Neuropathol Exp Neurol **30**(1): 75-90.

Olney, J. W. and N. B. Farber (1995). "Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia." Arch Gen Psychiatry **52**(12): 998-1007.

Olney, J. W., M. J. Ishimaru, P. Bittigau and C. Ikonomidou (2000). "Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain." Apoptosis **5**(6): 515-521.

Orentreich, N., J. L. Brind, R. L. Rizer and J. H. Vogelman (1984). "Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood." J Clin Endocrinol Metab **59**(3): 551-555.

Orgogozo, J. M., A. S. Rigaud, A. Stoffler, H. J. Mobius and F. Forette (2002). "Efficacy and safety of memantine in patients with mild to moderate vascular dementia: a randomized, placebo-controlled trial (MMM 300)." Stroke **33**(7): 1834-1839.

Orlando, L. R., S. A. Alsdorf, J. B. Penney, Jr. and A. B. Young (2001). "The role of group I and group II metabotropic glutamate receptors in modulation of striatal NMDA and quinolinic acid toxicity." Exp Neurol **167**(1): 196-204.

Owens, D. F. and A. R. Kriegstein (2002). "Developmental neurotransmitters?" Neuron **36**(6): 989-991.

Pan, S. Y., Z. L. Yu, H. Dong, N. T. Lee, H. Wang, W. F. Fong, Y. F. Han and K. M. Ko (2007). "Evaluation of acute bis(7)-tacrine treatment on behavioral functions in 17-day-old and 30-day-old mice, with attention to drug toxicity." Pharmacol Biochem Behav **86**(4): 778-783.

Panatier, A., D. T. Theodosis, J. P. Mothet, B. Touquet, L. Pollegioni, D. A. Poulain and S. H. Oliet (2006). "Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory." Cell **125**(4): 775-784.

Paoletti, P. and J. Neyton (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." Curr Opin Pharmacol **7**(1): 39-47.

Park-Chung, M., F.-S. Wu, R. H. Purdy, A. A. Malayev, T. T. Gibbs and D. H. Farb (1997). "Distinct Sites for Inverse Modulation of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Sulfated Steroids." Molecular Pharmacology **52**(6): 1113-1123.

Patocka, J., D. Jun and K. Kuca (2008). "Possible role of hydroxylated metabolites of tacrine in drug toxicity and therapy of Alzheimer's disease." Curr Drug Metab **9**(4): 332-335.

Paul, R. K., N. S. Singh, M. Khadeer, R. Moaddel, M. Sanghvi, C. E. Green, K. O'Loughlin, M. C. Torjman, M. Bernier and I. W. Wainer (2014). "(R,S)-Ketamine metabolites (R,S)-norketamine and (2S,6S)-hydroxynorketamine increase the mammalian target of rapamycin function." Anesthesiology **121**(1): 149-159.

Paxinos, G., C. Watson, M. Pennisi and A. Topple (1985). "Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight." J Neurosci Methods **13**(2): 139-143.

Paxinos G., W. C. (2004). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - The New Coronal Set., Elsevier Academic Press.

Peeters-Scholte, C., K. Braun, J. Koster, N. Kops, K. Blomgren, G. Buonocore, S. van Buul-Offers, H. Hagberg, K. Nicolay, F. van Bel and F. Groenendaal (2003). "Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia." Pediatr Res **54**(4): 516-522.

Pemberton, L. A., S. J. Kerr, G. Smythe and B. J. Brew (1997). "Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN-gamma, TNF-alpha, and IFN-alpha." J Interferon Cytokine Res **17**(10): 589-595.

Peters, S., J. Koh and D. W. Choi (1987). "Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons." Science **236**(4801): 589-593.

Petrovic, M., M. Sedlacek, M. Horak, H. Chodounska and L. Vyklický (2005). "20-Oxo-5β-Pregnan-3α-yl Sulfate Is a Use-Dependent NMDA Receptor Inhibitor." The Journal of Neuroscience **25**(37): 8439-8450.

Pittaluga, A., R. Pattarini, M. Feligioni and M. Raiteri (2001). "N-methyl-D-aspartate receptors mediating hippocampal noradrenaline and striatal dopamine release display differential sensitivity to quinolinic acid, the HIV-1 envelope protein gp120, external pH and protein kinase C inhibition." J Neurochem **76**(1): 139-148.

Poleszak, E., W. Stasiuk, A. Szopa, E. Wyska, A. Serefko, A. Oniszczyk, S. Wosko, K. Swiader and P. Wlaz (2016). "Traxoprodil, a selective antagonist of the NR2B subunit of the NMDA receptor, potentiates the antidepressant-like effects of certain antidepressant drugs in the forced swim test in mice." Metab Brain Dis **31**(4): 803-814.

Powers, A. R., 3rd, M. G. Gancsos, E. S. Finn, P. T. Morgan and P. R. Corlett (2015). "Ketamine-Induced Hallucinations." Psychopathology **48**(6): 376-385.

Purdy, R. H., A. L. Morrow, P. H. Moore, Jr. and S. M. Paul (1991). "Stress-induced elevations of gamma-aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(10): 4553-4557.

Raghava, N., B. C. Das and S. K. Ray (2017). "Neuroprotective effects of estrogen in CNS injuries: insights from animal models." Neurosci Neuroecon **6**: 15-29.

Rahman, A., K. Ting, K. M. Cullen, N. Braidy, B. J. Brew and G. J. Guillemain (2009). "The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons." PLoS One **4**(7): e6344.



Rambousek, L., V. Bubenikova-Valesova, P. Kacer, K. Syslova, J. Kenney, K. Holubova, V. Najmanova, P. Zach, J. Svoboda, A. Stuchlik, H. Chodounska, V. Kapras, E. Adamusova, J. Borovska, L. Vyklicky and K. Vales (2011). "Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3alpha5beta-pregnanolone glutamate." Neuropharmacology **61**(1-2): 61-68.

Rambousek, L., L. Kleteckova, A. Kubsova, D. Jirak, K. Vales and J. M. Fritschy (2016). "Rat intra-hippocampal NMDA infusion induces cell-specific damage and changes in expression of NMDA and GABAA receptor subunits." Neuropharmacology **105**: 594-606.

Ravikumar, A., K. V. Deepadevi, P. Arun, V. Manojkumar and P. A. Kurup (2000). "Tryptophan and tyrosine catabolic pattern in neuropsychiatric disorders." Neurol India **48**(3): 231-238.

Reddy, D. S. and M. A. Rogawski (2002). "Stress-induced deoxycorticosterone-derived neurosteroids modulate GABA(A) receptor function and seizure susceptibility." J Neurosci **22**(9): 3795-3805.

Redmond, A. M., J. P. Kelly and B. E. Leonard (1995). "Effects of olfactory bulbectomy and chronic amitriptyline treatment on phencyclidine(PCP)-induced hyperactivity." Medical science research **23**(5): 351-352.

Redmond, A. M., J. P. Kelly and B. E. Leonard (1997). "Behavioural and Neurochemical Effects of Dizocilpine in the Olfactory Bulbectomized Rat Model of Depression." Pharmacology Biochemistry and Behavior **58**(2): 355-359.

Reisberg, B., R. Doody, A. Stoffler, F. Schmitt, S. Ferris and H. J. Mobius (2003). "Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease." N Engl J Med **348**(14): 1333-1341.

Rey, M., M. S. Kruse, L. D. Alvarez, A. A. Ghini, A. S. Veleiro, G. Burton and H. Coirini (2013). "Neuroprotective action of synthetic steroids with oxygen bridge. Activity on GABAA receptor." Exp Neurol **249**: 49-58.

Reynolds, I. J. (1990). "Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor." Eur J Pharmacol **177**(3): 215-216.

Rivera, C., J. Voipio, J. A. Payne, E. Ruusuvuori, H. Lahtinen, K. Lamsa, U. Pirvola, M. Saarma and K. Kaila (1999). "The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation." Nature **397**(6716): 251-255.

Roof, R. L., G. P. Schielke, X. Ren and E. D. Hall (2001). "A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats." Stroke **32**(11): 2648-2657.

Rossi, D. J. and N. T. Slater (1993). "The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration." Neuropharmacology **32**(11): 1239-1248.

Rubin, M. A., R. L. Boemo, A. Jurach, D. B. Rojas, G. R. Zanolta, A. D. Obregon, D. O. Souza and C. F. Mello (2000). "Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats." Behav Pharmacol **11**(1): 57-61.

Rubio, M. D., J. B. Drummond and J. H. Meador-Woodruff (2012). "Glutamate receptor abnormalities in schizophrenia: implications for innovative treatments." Biomol Ther (Seoul) **20**(1): 1-18.

Ruppersberg, J. P., E. v. Kitzing and R. Schoepfer (1994). "The mechanism of magnesium block of NMDA receptors." Seminars in Neuroscience **6**(2): 87-96.

Rupprecht, R. (2003). "Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties." Psychoneuroendocrinology **28**(2): 139-168.

Sakamoto, H., K. Ukena and K. Tsutsui (2001). "Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis." J Neurosci **21**(16): 6221-6232.

Sakamoto, H., K. Ukena and K. Tsutsui (2002). "Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats." Neurosci Lett **322**(2): 111-115.

Sakimura, K., T. Kutsuwada, I. Ito, T. Manabe, C. Takayama, E. Kushiya, T. Yagi, S. Aizawa, Y. Inoue, H. Sugiyama and et al. (1995). "Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit." Nature **373**(6510): 151-155.

Sanacora, G., M. A. Smith, S. Pathak, H. L. Su, P. H. Boeijinga, D. J. McCarthy and M. C. Quirk (2014). "Lanicemine: a low-trapping NMDA channel blocker produces sustained antidepressant efficacy with minimal psychotomimetic adverse effects." Mol Psychiatry **19**(9): 978-985.

Sattler, R. and M. Tymianski (2001). "Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death." Mol Neurobiol **24**(1-3): 107-129.

Sattler, R., Z. Xiong, W. Y. Lu, J. F. MacDonald and M. Tymianski (2000). "Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity." J Neurosci **20**(1): 22-33.

Savitz, J., W. C. Drevets, B. E. Wurfel, B. N. Ford, P. S. Bellgowan, T. A. Victor, J. Bodurka, T. K. Teague and R. Dantzer (2015). "Reduction of kynurenic acid to quinolinic acid ratio in both the depressed and remitted phases of major depressive disorder." Brain Behav Immun **46**: 55-59.

Selye, H. (1941). "Anesthetic Effect of Steroid Hormones." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **46**(1): 116-121.

Sfaello, I., O. Baud, A. Arzimanoglou and P. Gressens (2005). "Topiramate prevents excitotoxic damage in the newborn rodent brain." Neurobiol Dis **20**(3): 837-848.

Shaw, F. H. (1955). "MORPHINE ANTAGONISTS." The Lancet **266**(6893): 774.

Shekhar, A., W. Truitt, D. Rainnie and T. Sajdyk (2005). "Role of stress, corticotrophin releasing factor (CRF) and amygdala plasticity in chronic anxiety." Stress **8**(4): 209-219.

Shleper, M., E. Kartvelishvily and H. Wolosker (2005). "D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices." J Neurosci **25**(41): 9413-9417.

Schaller, B. J. (2006). "Review paper<Br>The role of endothelin in stroke: Experimental data and underlying pathophysiology." Archives of Medical Science **2**(3): 146-158.

Schmued, L. C. and K. J. Hopkins (2000). "Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration." Brain Res **874**(2): 123-130.

Schulzke, S., P. Weber, J. Luetsch and H. Fahnenstich (2005). "Incidence and diagnosis of unilateral arterial cerebral infarction in newborn infants." J Perinat Med **33**(2): 170-175.

Schwarcz, R., A. Rassoulpour, H. Q. Wu, D. Medoff, C. A. Tamminga and R. C. Roberts (2001). "Increased cortical kynurenate content in schizophrenia." Biol Psychiatry **50**(7): 521-530.

Sieghart, W. and G. Sperk (2002). "Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes." Curr Top Med Chem **2**(8): 795-816.

Siwek, M., D. Dudek, I. A. Paul, M. Sowa-Kucma, A. Zieba, P. Popik, A. Pilc and G. Nowak (2009). "Zinc supplementation augments efficacy of imipramine in treatment resistant patients: a double blind, placebo-controlled study." J Affect Disord **118**(1-3): 187-195.

Skrenkova, K., S. Lee, K. Lichnerova, M. Kaniakova, H. Hansikova, M. Zapotocky, Y. H. Suh and M. Horak (2018). "N-Glycosylation Regulates the Trafficking and Surface Mobility of GluN3A-Containing NMDA Receptors." Front Mol Neurosci **11**: 188.

Sliwinski, A., F. P. Mommet, M. Schumacher and M. P. Morin-Surun (2004). "Pregnenolone sulfate enhances long-term potentiation in CA1 in rat hippocampus slices through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptors." J Neurosci Res **78**(5): 691-701.

Somogyi, P., G. Tamas, R. Lujan and E. H. Buhl (1998). "Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex." Brain Res Brain Res Rev **26**(2-3): 113-135.

Song, C. and B. E. Leonard (1994). "Serotonin reuptake inhibitors reverse the impairments in behaviour, neurotransmitter and immune functions in the olfactory bulbectomized rat." Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental **9**(2): 135-146.

Song, C. and B. E. Leonard (1995). "The effect of olfactory bulbectomy in the rat, alone or in combination with antidepressants and endogenous factors, on immune function." Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental **10**(1): 7-18.

Song, C. and B. E. Leonard (2005). "The olfactory bulbectomized rat as a model of depression." Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 627-647.

Soukup, O., D. Jun, J. Zdarova-Karasova, J. Patocka, K. Musilek, J. Korabecny, J. Krusek, M. Kaniakova, V. Sepsova, J. Mandikova, F. Trejtnar, M. Pohanka, L. Drtinova, M. Pavlik, G. Tobin and K. Kuca (2013). "A resurrection of 7-MEOTA: a comparison with tacrine." Curr Alzheimer Res **10**(8): 893-906.

Strohle, A., A. Pasini, E. Romeo, B. Hermann, G. Spalletta, F. di Michele, F. Holsboer and R. Rupprecht (2000). "Fluoxetine decreases concentrations of 3 alpha, 5 alpha-tetrahydrocorticosterone (THDOC) in major depression." J Psychiatr Res **34**(3): 183-186.

Summers, W. K., K. R. Kaufman, F. Altman, Jr. and J. M. Fischer (1980). "THA--a review of the literature and its use in treatment of five overdose patients." Clin Toxicol **16**(3): 269-281.

Suzuki, M., L. S. Wright, P. Marwah, H. A. Lardy and C. N. Svendsen (2004). "Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(9): 3202-3207.

Swardfager, W., N. Herrmann, G. Mazereeuw, K. Goldberger, T. Harimoto and K. L. Lanctot (2013). "Zinc in depression: a meta-analysis." Biol Psychiatry **74**(12): 872-878.

Swiatkowski, P., I. Nikolaeva, G. Kumar, A. Zucco, B. F. Akum, M. V. Patel, G. D'Arcangelo and B. L. Firestein (2017). "Role of Akt-independent mTORC1 and GSK3 $\beta$  signaling in sublethal NMDA-induced injury and the recovery of neuronal electrophysiology and survival." Scientific Reports **7**(1): 1539.

Takagaki, G. (1996). "The dawn of excitatory amino acid research in Japan. The pioneering work by Professor Takashi Hayashi." Neurochem Int **29**(3): 225-229.

Takai, H., K. Katayama, K. Uetsuka, H. Nakayama and K. Doi (2003). "Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain." Exp Mol Pathol **75**(1): 89-94.

Tang, Y. P., E. Shimizu, G. R. Dube, C. Rampon, G. A. Kerchner, M. Zhuo, G. Liu and J. Z. Tsien (1999). "Genetic enhancement of learning and memory in mice." Nature **401**(6748): 63-69.

Tavares, R. G., C. I. Tasca, C. E. Santos, L. B. Alves, L. O. Porciuncula, T. Emanuelli and D. O. Souza (2002). "Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes." Neurochem Int **40**(7): 621-627.

Tavares, R. G., C. I. Tasca, C. E. Santos, M. Wajner, D. O. Souza and C. S. Dutra-Filho (2000). "Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain." Neuroreport **11**(2): 249-253.

Thomas, A. J., R. P. Nockels, H. Q. Pan, C. I. Shaffrey and M. Chopp (1999). "Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats." Spine (Phila Pa 1976) **24**(20): 2134-2138.

Thomas, C. G., A. J. Miller and G. L. Westbrook (2006). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons." J Neurophysiol **95**(3): 1727-1734.

Thomas, J. W., W. F. Hood, J. B. Monahan, P. C. Contreras and T. L. O'Donohue (1988). "Glycine modulation of the phencyclidine binding site in mammalian brain." Brain Research **442**(2): 396-398.

Thompson, G. A. and I. C. Kilpatrick (1996). "The neurotransmitter candidature of sulphur-containing excitatory amino acids in the mammalian central nervous system." Pharmacol Ther **72**(1): 25-36.

Timby, E., M. Balgard, S. Nyberg, O. Spigset, A. Andersson, J. Porankiewicz-Asplund, R. H. Purdy, D. Zhu, T. Backstrom and I. S. Poromaa (2006). "Pharmacokinetic and behavioral effects of allopregnanolone in healthy women." Psychopharmacology (Berl) **186**(3): 414-424.

Tomitaka, M., S. Tomitaka, S. Rajdev and F. R. Sharp (2000). "Fluoxetine prevents PCP- and MK801-induced HSP70 expression in injured limbic cortical neurons of rats." Biol Psychiatry **47**(9): 836-841.

Tovar, K. R. and G. L. Westbrook (1999). "The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro." J Neurosci **19**(10): 4180-4188.

Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers and R. Dingledine (2010). "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function." Pharmacol Rev **62**(3): 405-496.

Tsenov, G., A. Mateffyova, P. Mares, J. Otahal and H. Kubova (2007). "Intrahippocampal injection of endothelin-1: a new model of ischemia-induced seizures in immature rats." Epilepsia **48 Suppl 5**: 7-13.

Uzunov, D. P., T. B. Cooper, E. Costa and A. Guidotti (1996). "Fluoxetine-elicited changes in brain neurosteroid content measured by negative ion mass fragmentography." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12599-12604.

van der Staay, F. J., K. Rutten, C. Erb and A. Blokland (2011). "Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats." Behav Brain Res **220**(1): 215-229.

van Riezen, H. and B. E. Leonard (1990). "Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats." Pharmacol Ther **47**(1): 21-34.

van Rijzingen, I. M., W. H. Gispen and B. M. Spruijt (1995). "Olfactory bulbectomy temporarily impairs Morris maze performance: an ACTH(4-9) analog accelerates return of function." Physiol Behav **58**(1): 147-152.

van Velthoven, C. T., C. J. Heijnen, F. van Bel and A. Kavelaars (2011). "Osteopontin enhances endogenous repair after neonatal hypoxic-ischemic brain injury." Stroke **42**(8): 2294-2301.

VanLandingham, J. W., M. Cekic, S. Cutler, S. W. Hoffman and D. G. Stein (2007). "Neurosteroids reduce inflammation after TBI through CD55 induction." Neuroscience letters **425**(2): 94-98.

Veiga, S., L. M. Garcia-Segura and I. Azcoitia (2003). "Neuroprotection by the steroids pregnenolone and dehydroepiandrosterone is mediated by the enzyme aromatase." J Neurobiol **56**(4): 398-406.

Veldhuis, W. B., S. Floris, P. H. van der Meide, I. M. Vos, H. E. de Vries, C. D. Dijkstra, P. R. Bar and K. Nicolay (2003). "Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain barrier disruption." J Cereb Blood Flow Metab **23**(9): 1060-1069.

Villa, P., P. Bigini, T. Mennini, D. Agnello, T. Laragione, A. Cagnotto, B. Viviani, M. Marinovich, A. Cerami, T. R. Coleman, M. Brines and P. Ghezzi (2003). "Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis." J Exp Med **198**(6): 971-975.

Volpe, J. J. (2001). "Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **7**(1): 56-64.

Vyklicky, V., T. Smejkalova, B. Krausova, A. Balik, M. Korinek, J. Borovska, M. Horak, M. Chvojikova, L. Kleteckova, K. Vales and J. Cerny (2016). "Preferential Inhibition of Tonicity over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives." **36**(7): 2161-2175.

Wagstaff, A. J. and D. McTavish (1994). "Tacrine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in Alzheimer's disease." Drugs Aging **4**(6): 510-540.

Wachtel, E. V. and K. D. Hendricks-Munoz (2011). "Current management of the infant who presents with neonatal encephalopathy." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **41**(5): 132-153.

Wang, D., Y. Noda, H. Tsunekawa, Y. Zhou, M. Miyazaki, K. Senzaki and T. Nabeshima (2007). "Behavioural and neurochemical features of olfactory bulbectomized rats resembling depression with comorbid anxiety." Behav Brain Res **178**(2): 262-273.

Wang, L., Z. Zhang, Y. Wang, R. Zhang and M. Chopp (2004). "Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats." Stroke **35**(7): 1732-1737.

Wang, M. (2011). "Neurosteroids and GABA-A Receptor Function." Frontiers in endocrinology **2**: 44-44.

Wang, M., Y. He, L. N. Eisenman, C. Fields, C. M. Zeng, J. Mathews, A. Benz, T. Fu, E. Zorumski, J. H. Steinbach, D. F. Covey, C. F. Zorumski and S. Mennerick (2002). "3beta - hydroxypregnane steroids are pregnenolone sulfate-like GABA(A) receptor antagonists." J Neurosci **22**(9): 3366-3375.

Warach, S., D. Kaufman, D. Chiu, T. Devlin, M. Luby, A. Rashid, L. Clayton, M. Kaste, K. R. Lees, R. Sacco and M. Fisher (2006). "Effect of the Glycine Antagonist Gavestinel on cerebral infarcts in acute stroke patients, a randomized placebo-controlled trial: The GAIN MRI Substudy." Cerebrovasc Dis **21**(1-2): 106-111.

Watanabe, S., T. Fukuda and S. Ueko (1980). "Changes in electroencephalogram of the rat following olfactory bulbectomy." Tohoku J Exp Med **130**(1): 41-48.

Watkins, P. B., H. J. Zimmerman, M. J. Knapp, S. I. Gracon and K. W. Lewis (1994). "Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease." Jama **271**(13): 992-998.

Weaver, C. E., Jr., P. Marek, M. Park-Chung, S. W. Tam and D. H. Farb (1997). "Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10450-10454.

Weaver, C. E., M. B. Land, R. H. Purdy, K. G. Richards, T. T. Gibbs and D. H. Farb (2000). "Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca(2+) accumulation and cell death." J Pharmacol Exp Ther **293**(3): 747-754.

Weill-Engerer, S., J. P. David, V. Szdovitch, P. Liere, B. Eychenne, A. Pianos, M. Schumacher, A. Delacourte, E. E. Baulieu and Y. Akwa (2002). "Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients." J Clin Endocrinol Metab **87**(11): 5138-5143.

Wieland, S., N. C. Lan, S. Mirasedeghi and K. W. Gee (1991). "Anxiolytic activity of the progesterone metabolite 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-one." Brain Research **565**(2): 263-268.

Williams, K., S. L. Russell, Y. M. Shen and P. B. Molinoff (1993). "Developmental switch in the expression of NMDA receptors occurs in vivo and in vitro." Neuron **10**(2): 267-278.

Wynn, A. S., C. P. Mac Sweeney, F. Franconi, L. Lemaire, D. Pouliquen, S. Herlidou, B. E. Leonard, J. Gandon and J. D. de Certaines (2000). "An in-vivo magnetic resonance imaging study of the olfactory bulbectomized rat model of depression." Brain Res **879**(1-2): 193-199.

Wu, F. S., T. T. Gibbs and D. H. Farb (1991). "Pregnenolone sulfate: a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor." Mol Pharmacol **40**(3): 333-336.

Wu, Y. W., L. A. Bauer, R. A. Ballard, D. M. Ferriero, D. V. Glidden, D. E. Mayock, T. Chang, D. J. Durand, D. Song, S. L. Bonifacio, F. F. Gonzalez, H. C. Glass and S. E. Juul (2012). "Erythropoietin for neuroprotection in neonatal encephalopathy: safety and pharmacokinetics." Pediatrics **130**(4): 683-691.

Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." *Nature* **332**(6163): 411-415.

Yang, C., Y. M. Hu, Z. Q. Zhou, G. F. Zhang and J. J. Yang (2013). "Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test." *Ups J Med Sci* **118**(1): 3-8.

Yang, C., Y. Shirayama, J. C. Zhang and Q. Ren (2015). "R-ketamine: a rapid-onset and sustained antidepressant without psychotomimetic side effects." **5**: e632.

Yawno, T., J. J. Hirst, M. Castillo-Melendez and D. W. Walker (2009). "Role of neurosteroids in regulating cell death and proliferation in the late gestation fetal brain." *Neuroscience* **163**(3): 838-847.

Yawno, T., S. L. Miller, L. Bennet, F. Wong, J. J. Hirst, M. Fahey and D. W. Walker (2017). "Ganaxolone: A New Treatment for Neonatal Seizures." *Frontiers in cellular neuroscience* **11**: 246-246.

Yawno, T., E. B. Yan, D. W. Walker and J. J. Hirst (2007). "Inhibition of neurosteroid synthesis increases asphyxia-induced brain injury in the late gestation fetal sheep." *Neuroscience* **146**(4): 1726-1733.

Zaczek, R. and J. T. Coyle (1982). "Excitatory amino acid analogues: neurotoxicity and seizures." *Neuropharmacology* **21**(1): 15-26.

Zanos, P., R. Moaddel, P. J. Morris, P. Georgiou, J. Fischell, G. I. Elmer, M. Alkondon, P. Yuan, H. J. Pribut, N. S. Singh, K. S. Dossou, Y. Fang, X. P. Huang, C. L. Mayo, I. W. Wainer, E. X. Albuquerque, S. M. Thompson, C. J. Thomas, C. A. Zarate, Jr. and T. D. Gould (2016). "NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites." *Nature* **533**(7604): 481-486.

Zarate, C. A., Jr., J. B. Singh, P. J. Carlson, N. E. Brutsche, R. Ameli, D. A. Luckenbaugh, D. S. Charney and H. K. Manji (2006). "A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression." *Arch Gen Psychiatry* **63**(8): 856-864.

Zeevalk, G. D. and W. J. Nicklas (1992). "Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg<sup>2+</sup> block at the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism." *J Neurochem* **59**(4): 1211-1220.

Zhang, J. C., S. X. Li and K. Hashimoto (2014). "R (-)-ketamine shows greater potency and longer lasting antidepressant effects than S (+)-ketamine." *Pharmacol Biochem Behav* **116**: 137-141.

# 11 SEZNAM PUBLIKACÍ

**Tato dizertační práce je založena na výsledcích uveřejněných v následujících impaktovaných publikacích:**

**Kleteckova L**, Tsenov G, Kubova H, Stuchlik A, Vales K. Neuroprotective effect of the 3 $\alpha$ 5 $\beta$ -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. (2014) *Neuroscience Letters*. 564:11-5. (IF = 2.03; rok 2014)

[KL – provádění stereotaktických operací, histologické zpracování vzorků, vyhodnocování, psaní manuskriptu]

Kaniakova M, **Kleteckova L**, Lichnerova K, Holubova K, Skrenkova K, Korinek M, Krusek J, Smejkalova T, Korabecny J, Vales K, Soukup O, Horak M. (2018) 7-Methoxyderivative of tacrine is a 'foot-in-the-door' open-channel blocker of GluN1/GluN2 and GluN1/GluN3 NMDA receptors with neuroprotective activity in vivo. *Neuropharmacology*. 140:217-232. (IF = 4.249; rok 2017)

[KL – návrh experimentů zaměřených na neuroprotektivitu, provádění stereotaktických operací, vyhodnocení histologických vzorků, pořizování fotografií histologického materiálu, psaní manuskriptu]

Holubova K, **Kleteckova L**, Skurlova M, Ricny J, Stuchlik A, Vales K. (2016) Rapamycin blocks the antidepressant effect of ketamine in task-dependent manner. *Psychopharmacology (Berl)*. 233:2077-2097. (IF = 3.308; rok 2016)

[KL – provedení olfaktorické bulbektomie, zpracování krevních vzorků, příprava vzorků pro metodu ELISA, zavedení a provedení metody ELISA]

Vyklicky V, Smejkalova T, Krausova B, Balik A, Korinek M, Borovska J, Horak M, Chvojikova M, **Kleteckova L**, Vales K, Cerny J, Nekardova M, Chodounska H, Kudova E, Vyklicky L. (2016) Preferential Inhibition of Tonically over Phasically Activated NMDA Receptors by Pregnane Derivatives. *Journal of Neuroscience*. 36:2161-75. (IF = 5.988; rok 2016)

[KL – návrh experimentů, provedení stereotaktických operací, psaní manuskriptu]

Uvedené publikace jsou součástí příloh.

**Ostatní autorčiny impaktované publikace:**

Kaniakova M, Nepovimova E, **Kleteckova L**, Skrenkova K, Holubova K, Chrienova Z, Hepnarova V, Kucera T, Vales K, Soukup O, Korabecny J, Horak M. Combination of Memantine and 6-Chlorotacrine as Novel Multi-Target Compound against Alzheimer's Disease. **Accepted** in *Current Alzheimer Research* (IF = 3.289; rok 2017)

[**KL** – návrh experimentů zaměřených na neuroprotektivitu, provádění stereotaktických operací, vyhodnocení histologických vzorků, pořizování fotografií histologického materiálu, psaní manuskriptu]

Chalupova K, Korabecny J, Bartolini M, Monti B, Lamba D, Caliandro R, Pesaresi A, Brazzolotto X, Gastellier AJ, Nachon F, Pejchal J, Jarosova M, Hepnarova V, Jun D, Hrabinoval M, Dolezal R, Zdarova Karasova J, Mzik M, Kristofikova Z, Misik J, Muckova L, Jost P, Soukup O, Benkova M, Setnicka V, Habartova L, Chvojkova M, **Kleteckova L**, Vales K, Mezeiova E, Uliassi E, Nepovimova E, Bolognesi ML. Novel tacrine-tryptophan hybrids as multi-target directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease. **Submitted** in *European Journal of Medicinal Chemistry* (IF = 4.816; rok 2017)

[**KL** – spolupodílení na návrhu experimentů zaměřených na neuroprotektivitu, provádění stereotaktických operací, intraventrikulární aplikace látek]

Rambousek L, **Kleteckova L**, Kubesova A, Jirak D, Vales K, Fritschy JM. (2016) Rat intra-hippocampal NMDA infusion induces cell-specific damage and changes in expression of NMDA and GABAA receptor subunits. *Neuropharmacology*. 105:594-606. (IF = 5.012; rok 2016)

[**KL** – spolupodílení na návrhu experimentů, provádění stereotaktických operací, histologické zpracování tkáně]



## **12 PŘÍLOHY**