

Psychiatrické centrum Praha
Laboratoř biochemie a patofyziologie mozku
a
Neurocentrum Liberec,
oddělení neurochirurgie

VÝZNAM ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ
MOZKU V NEUROVÝVOJOVÉM
ANIMÁLNÍM MODELU SCHIZOFRENIE

MUDr. Miroslav Kaiser

Autoreferát doktorandské disertační práce

Praha 2007

Tato disertační práce byla vypracována v rámci postgraduálního doktorského studia biomedicíny, oborová rada Neurovědy. Experimentální část vznikla v laboratoři Biochemie a patofyziologie mozku Psychiatrického centra Praha.

Autor: **MUDr. Miroslav Kaiser**

Adresa pracoviště autora: Neurocentrum Liberec,
Neurochirurgie,
Regionální nemocnice Liberec,
Husova 10
Liberec 1, 460 63
Telefon: +420 48512707
Fax: +420 5101078
miroslav.kaiser@nemlib.cz

Školitel: Doc. MUDr. František Šťastný, CSc.
Psychiatrické centrum Praha
Ústavní 91, 181 03, Praha 8

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disertace se koná dne.....před komisí
pro obhajoby disertačních prací, oborová rada Neurovědy,
v

Děkuji tímto mému školiteli doc. MUDr. Františkovi Šťastnému, CSc. a RNDr. Haně Tejkalové, PhD. z Psychiatrického centra v Praze – Bohnicích za jejich odborné vedení, kritické poznámky a řadu cenných rad, které mi udělili po celé období mého postgraduálního studia.

Rád bych poděkoval také RNDr. Janu Klaschkovi, CSc., Ing. Jiřímu Janouškovi a MUDr. Tomáši Soukupovi za pomoc při statistickém zpracování získaných výsledků a cenné rady při práci s počítačovým softwarem. Dále děkuji kolegyni RNDr. Věře Valešové, PhD, Ing. Veronice Platilové a všem technickým asistentkám za spolupráci při laboratorních experimentech.

Závěrem vyjadřuji touto cestou i dík paní Aleně Zemanové a mé manželce Markétě Kaiserové za jazykové a grafické připomínky v průběhu přípravy této práce.

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Hypoxie lidského plodu a novorozence.....	6
1.2. Je animální model mozkové ischémie také modelem schizofrenie?.....	7
1.3. Porodní komplikace jako rizikový faktor schizofrenie	8
2. CÍLE PRÁCE	10
3. MATERIÁL A METODY	11
3.1. Laboratorní zvířata	11
3.2. Dvouvaskulární model mozkové ischémie	11
3.3. Odběr vzorků krve; stanovení hodnot napětí krevních plynů	12
3.4. Stanovení aktivity GGT v mozkové tkáni a v krevní plazmě	12
3.5. Stanovení hladin cAMP v krevní plazmě a IP ₃ v krevních destičkách ..	14
3.6. Sledování hravého chování („social play behavior“)	14
3.7. Reakce na nové prostředí („open field test“)	15
3.8. Měření akustické úlekové reakce a její prepulzní inhibice	15
3.9. Statistická analýza dat	16
4. VÝSLEDKY	17
4.1. Vliv 1-hodinové mozkové ischémie na napětí krevních plynů u 12denního potkana	17
4.2. Ischemií navozené změny aktivity GGT v mozkové tkáni a v krevní plazmě potkana	18
4.3. Hladiny cAMP a IP ₃ v krvi 50denních potkanů po krátkodobé neonatální ischémii mozku	20
4.4. Změny chování způsobené neonatální ischémii	21
4.4.1. Změny sociálního chování jako důsledek neonatální ischémie	22
4.4.2. Vliv neonatální ischémie na reakci potkana v novém prostředí 35. PND	22
4.4.3. Vliv neonatální ischémie na reakci potkana v novém prostředí 50. PND	24
4.5. Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce a její ovlivnění neonatální ischémii	25
5. DISKUSE	26
5.1. Napětí krevních plynů v modelu mozkové ischémie.....	27
5.2. Ischemické poškození mozku ve změnách aktivity GGT	27

5.3. Fosfoinositidový signální systém a systém cAMP jako možní ukazatelé neonatálního poškození mozku u schizofrenie	28
5.4. Charakteristiky chování potkana v neurovývojovém modelu schizofrenie	29
5.5. Úleková reakce a její prepulzní inhibice v animálním modelu schizofrenie	30
6. ZÁVĚR	31
7. SUMMARY	31
8. LITERATURA	33
9. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	36
9.1. Publikace in extenso s IF a bez IF.....	36
9.2. Abstrakta a prezentace.....	37

1. ÚVOD

1.1. Hypoxie lidského plodu a novorozence

Přibližně 3 - 9 novorozenců z tisíce narozených dětí postihne některá z forem perinatálního ischemicko – hypoxického poškození mozku nebo protražované anoxie. Taková situace nejčastěji nastává při komplikacích jako jsou placentární dysfunkce, protražovaný či předčasný porod nebo kardiopulmonální resuscitace (Tuor a spol., 1996). Mozková hypoxie se tak podílí na vzniku neprogresivních neurologických deficitů u dětí (mentální retardace, záchvatovité stavy, rozvoj spasticity, choreoatetóza a ataxie). Předpokládá se, že může být také rizikovým faktorem prostředí u některých neuropsychiatrických onemocnění (schizofrenie nebo poruchy kognice).

Přežití v rámci intrauterinní hypoxie ovlivňují faktory jako je množství energetických substrátů (především glukózy uvolněné z glykogenu), dále hladina hemoglobinu a aktivita retikulární formace mozkového kmene. Protražovaná hypoxie způsobuje perinatální poškození mozku, které může vykazovat řadu podobných projevů jako ložiskové ischemické poškození mozku dospělého člověka. Mezi hlavní příčiny perinatální hypoxie patří:

1. Pokles pO_2 v mateřském organismu např. z důvodu velké krevní ztráty.
2. Porucha přenosu O_2 skrze placentární bariéru z důvodu poškození fetoplacentárního oběhu při poranění pupečnickové šňůry nebo následkem spasmu pupečnickových cév.

3. Porucha přenosu O₂ u plodu a novorozence z důvodu krvácení, srdeční malformace nebo erythroblastosis fetalis.
4. Poškození dýchací soustavy novorozence (např. plicní hypoplazie, syndrom dechové tísně novorozenců nebo poškození neuronů mozkového kmene).

Perinatální hypoxie/ischémie patří mezi zevní faktory prostředí, které, podobně jako proteinová malnutrice či virová infekce, narušují normální vývoj mozku (Trojan a Šťastný, 1988) a spolu s genetickou predispozicí představují rizikový faktor pro vznik psychotického onemocnění.

1.2. Je animální model mozkové ischémie také modelem schizofrenie?

Vzhledem k nejasné etiologii schizofrenie není možné vytvořit model s úplnou konstrukční a fenomenologickou validitou. Cílem je vytvoření tzv. „heuristického“ modelu schizofrenie, který nám umožňuje ověřovat různé teorie vzniku a možné příčiny této nemoci. Mezi takové patří i modely neurovývojové, jejichž podstatou je experimentální poškození vyvíjejícího se mozku (Bubeníková a spol., 2003). V naší studii jsme pro simulaci porodní komplikace vybrali perinatální hypoxicko-ischemické poškození mozku člověka, které lze technicky dobře modelovat na zvířeti. Použitý model je založený na přechodném podvazu obou společných krkavic. (Jílek a spol., 1957; Šťastný a spol., 1971; Smith a spol., 1984).

Jaká je však fenomenologická validita tohoto modelu schizofrenie? Abychom mohli tuto otázku zodpovědět, museli jsme nejprve vybrat hlavní příznaky schizofrenie a porovnat je se změnami chování zvířete (potkana)

s tzv. modelovou psychózou. Mezi základní charakteristiky chování pozorované u osob trpících schizofrenií patří pozitivní a negativní příznaky, deficit kognitivních funkcí; u potkanů s modelovou psychózou je to reakce na nové prostředí, akustická úleková reakce a prostorové učení v Morrisově vodním bludišti (Lipská a Weinberger, 2000).

Srovnávací studie ukázaly, že mozek potkana dosáhne stupně zralosti donošeného novorozence teprve na konci 2. týdne života po narození (mezi 10.-14. PND). V době narození je tedy mozek novorozeného potkana méně diferencovaný než mozek lidského novorozence (Romijn a spol., 1991; Quinn, 2005). Tato skutečnost byla v našem modelu respektována.

1.3. Porodní komplikace jako rizikový faktor schizofrenie

Z obecného hlediska lze porodní komplikace rozdělit do 3 skupin: (1) komplikace postihující matku v průběhu těhotenství, (2) abnormální vývoj plodu a (3) komplikace související s vlastním porodem a obdobím těsně po porodu. Shrnutí a výčet jednotlivých typů komplikací provedl Cannon se spolupracovníky (2002) na základě meta-analýzy 8 velkých souborů osob. Uvedl 31 porodních komplikací, jejichž společným rysem bylo riziko vzniku schizofrenní psychózy v dospělosti. Přitom O'Callaghan se spolupracovníky (1992) zjistili, že u pacientů s pozitivní anamnézou porodních komplikací se první příznaky schizofrenie nejčastěji objevily mezi 20.-25. rokem života. Navíc v práci Hendersona a Smarta z roku 1981 se uvádí, že krátkodobá dechová zástava s mírnou asfyxií se vyskytne u 59 – 84 % dětí narozených před 36. týdnem těhotenství. Tyto předčasně narozené

děti pak z pohledu pozdějšího možného vzniku schizofrenie představovaly rizikovou skupinu.

Některé klinické komplikace objevující se v průběhu těhotenství lze v experimentu simulovat v animálním modelu a následně je charakterizovat jako rizikové faktory na podkladě morfologických, neurochemických a behaviorálních změn. Mezi porodní komplikace patří gestační diabetes, inkompatibilita Rh faktoru, krvácení a preeklampsie. Abnormální vývoj plodu je podmíněn poruchou nitroděložního vývoje, infekcí novorozence či matky, nebo stresem matky v době gravidity. K vlastním porodním komplikacím patří porod císařským řezem a hypoxie plodu či novorozence (Boksa, 2004).

Ze spektra uvedených komplikací byla statisticky významná pouze preeklampsie, která bývá spojována s ischemizací plodu. Jako důsledek hypoxie nebo ischémie plodu bylo zjištěno zmenšení objemu šedé hmoty mozku, zvětšení mozkových komor, které v různé míře nalézáme i u schizofreniků a zvýšení produkce mozkomíšního moku u schizofreniků i jejich sourozenců (Rapoport a spol., 2005).

Význam porodních komplikací, včetně mozkové hypoxie/ischémie je však ve svých současných závěrech nejednoznačný. Proto jsme využili možnosti, které nám dává animální model založený na vývojových důsledcích časně (neonatální) ischémie mozku pro chování dospívajícího a dospělého jedince. Případné změny by bylo možné označit za podobné psychotickému chování člověka, které přes nepochybná omezení, jichž jsme si vědomi, mohou být extrapolována i na část osob trpících schizofrenií.

2. CÍLE PRÁCE

Se záměrem přispět k odpovědi na otázku, zda hypoxicko-ischemická epizoda u lidského novorozence má etiopatogenetický význam jako rizikový faktor pro vznik schizofrenie, jsme si vytyčili cíle formulací následujících otázek:

1. Způsobí 1-h trvajícím podvaz obou společných karotid potkana 12. PND změny v napětí krevních plynů v jeho krvi?
2. Ovlivní krátkodobá mozková ischemie aktivitu GGT?
3. Je možné prokázat změny v koncentraci cAMP a IP₃ jako možné biochemické ukazatele psychotického onemocnění i v období časně dospělosti (38 dní po ischemii)?
4. Způsobí časně ischemické poškození mozku potkana změny ve vývoji jeho chování charakterizované:
 - a) projevy sociálního a hravého chování mláďat,
 - b) v reakci na nové prostředí (test „volného pole“),
 - c) v akustické úlekové reakci a v její prepulzní inhibici?
5. Extrapolovat námi vypracovaný animální model na situaci vybraného typu porodní komplikace u lidského plodu (a novorozence) jako rizikového faktoru pro pozdější vznik schizofrenie.
6. Porovnat animální model krátkodobé mozkové ischemie s modely, které byly založeny na neonatálním poškození mozku potkana 12. PND agonisty glutamátového receptoru (kyselina chinolinová (QUIN) a N-acetyl-L-aspartyl-glutamát (NAAG)).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. **Laboratorní zvířata**

V experimentální studii jsme použili laboratorní potkany kmene Wistar/Hann z chovného zařízení Bio-Test, Konárovice. S laktující matkou bylo pravidelně dodáno 10 mlád'at (8 samic a 2 samečkové) ve věku 9. postnatální den (PND). Mlád'ata byla chována v řízeném světelném režimu 12 hod světlo/12 hod tma. V chovné místnosti byla stálá vlhkost vzduchu ($50 \pm 20\%$) a teplota ($22 \pm 2^\circ\text{C}$). Všechna mlád'ata byla 28. PND odstavena od matky. Zvířata měla volný přístup k pitné vodě a k peletované potravě (dieta ST-1).

Všechna pozorování byla schválena odbornou komisí pro práci s laboratorními zvířaty při 3. LF UK a provedena v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a ve smyslu znění vyhlášky 311/197 a 207/2004 Sb s nařízeními EU.

3.2. **Dvouvaskulární model mozkové ischemie**

Samečkové byli 12. PND anestetizováni (halotan) za použití inhalačního přístroje Fluovac (USA). Mlád'ata nejdříve inhalovala směs 2,5-3 % halotanu s 95 % kyslíku a 5 % oxidu uhličitého. V anestézii jsme pokračovali stejnou směsí s 1-1,5 % koncentrací halotanu. Rektální teplota byla udržována na $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pomocí vyhřívací podložky. Mlád'ata byla upevněna k operačnímu stolku hřbetem dolů. Po dezinfekci operačního pole jsme na přední straně krku provedli vertikální řez ve střední čáře. Pod operačním mikroskopem jsme mediálně od obou kývačů pronikli ke společným krkavicím a izolovali je od okolních struktur. Oboustranného

tepenného uzávěru bylo dosaženo podvlečením a dotažením vláken orsilonu 4/0. Ránu jsme uzavřeli jedním adaptačním stehem. Doba podvazu (ischémie) trvala 60 minut. Po dobu tepenného uzávěru jsme zvíře vrátili zpět do mateřského hnízda. Potom jsme jednotlivá potkaní mláďata znovu anestezovali a obě přiložené ligatury operačně odstranili.

3.3. Odběr vzorků krve; stanovení hodnot napětí krevních plynů

Stupeň mozkové ischémie jsme posuzovali stanovením pH a napětí plynů v krevních vzorcích odebraných od náhodně vybraných kontrolních a ischemických mláďat. Pro možnost srovnání jsme vybrali 5 mláďat ze skupiny naivních (intaktních) zvířat, jichž vzorky krve jsme odebrali kardiální punkcí.

U ischemické a kontrolní skupiny mláďat jsme v lehké halotanové anestézii po 1-h ischémii přerušili za místem podvazu levou společnou krkavici. Do předem připravené heparinizované skleněné kapiláry o objemu 100 μ l jsme odebrali vzorek arteriální krve na vyšetření krevních plynů. Konce naplněné kapiláry jsme uzavřeli voskem a uložili do ledové tříště. Stanovení pH, napětí krevních plynů (O_2 , CO_2) a koncentrace HCO_3^- jsme prováděli na přístroji pH/Blood Gas Analyzer (firma Instrumentation Laboratory, typ 1620, Francie).

3.4. Stanovení aktivity GGT v mozkové tkáni a v krevní plazmě

V úvodní éterové anestézii jsme kardiální punkcí odebrali vzorek krve a to za pomoci jehly zavedené do levé srdeční komory. Odebrané

vzorky krve jsme centrifugovali 30 minut při 3000 x g. V takto získaných vzorcích krevní plazmy jsme stanovovali aktivitu solubilní formy γ -glutamyltranspeptidázy (GGT) za použití komerční soupravy (GGT kit, Lachema, ČR).

Následně jsme rychle vybavili celý mozek a na ledem chlazené kovové destičce jsme z obou hemisfér odebrali vzorky parieto-frontální mozkové kůry a současně jsme vyřali i oba hipokampy. Vzorky mozkové tkáně byly homogenizovány v izotonickém roztoku NaCl a centrifugovány při 1000 x g. Získané „propláchnuté“ homogenáty tkáně byly resuspendovány v 1,5-2,0 ml ledové redestilované vody a následně použity ke stanovení membránově vázané aktivity GGT a celkového proteinu (Šťastný a spol., 1985; Šťastný a spol., 1997).

Stanovení aktivity obou forem GGT jako ukazatele ischemického poškození mozku jsme provedli i u dospělých potkanů za použití dvouvaskulárního modelu mozkové ischemie. Rozdíl mezi dospělými a 12denními potkany spočíval v různé době trvání ischemie. Zatímco novorozená mláďata byla vystavena jednogodinové ischemii, u dospělých potkanů trval uzávěr 24 a 48 hodin.

Model dospělého zvířete nám posloužil k ověření doby přežití a k zavedení postupu stanovení aktivity GGT. Vzhledem k vysoké mortalitě dospělých potkanů jsme u 12denních mláďat původní dobu uzávěru společných krkavic zkrátili na 1 hodinu. U neonatálně ischemizovaných mláďat jsme sledovali možnost přetrvávání změn v aktivitě tohoto enzymu v časně dospělosti. Proto byly odběry vzorků plazmy i mozkové tkáně provedeny až za 38 dní po ischemii, tj. 50. PND.

3.5. Stanovení hladin cAMP v krevní plazmě a IP₃ v krevních destičkách.

Vzorky krve (2,5 ml) pro stanovení hladin cAMP a IP₃ byly odebrány do zkumavek z levé srdeční komory potkanů 50. PND. Krev byla 2krát centrifugována při 150 x g po dobu 15 min při 4°C. Oba objemy krevní plazmy obsahující krevní destičky byly spojeny a 0,5 ml plazmy bylo dále centrifugováno při 2000 x g po dobu 10 min při 4°C. Ve zbytku plazmy jsme stanovili počet trombocytů v Bürkrově komůrce nebo pomocí systému pro analýzu obrazu (Lucie, verze 4.6). Plazma získaná po centrifugaci byla odsáta, zmrazena a uložena při -20°C až do doby stanovení cAMP pomocí RIA Kit (Immunotech, Francie), během následujících dvou týdnů. Trombocyty byly resuspendovány v roztoku obsahujícím (v mM): HEPES 40, NaCl 113, KCl 5,6, MgCl₂ 1,0 a Na₂HPO₄ 0,2 (pH 7,2) a extrahovány do 0,2 ml vychlazené 20% kyseliny chloristé a ponechány na ledu 30 min. Protein byl sedimentován centrifugací při 2000 x g po dobu 15 min při 4 °C. Získaný supernatant byl titrován 1,5 M KOH obsahujícím 60 mM HEPES s cílem upravit pH na hodnotu 7,4 (indikátor pH: bromtymolová modř). Precipitovaný KClO₄ byl odstraněn centrifugací a vzorky byly skladovány při -20°C do doby stanovení IP₃ pomocí [³H]D-myo-inositol 1,4,5-trisfosfátového systému (Amersham, UK). Vlastní stanovení hladin [³H]cAMP a [³H]IP₃ provedla Ing. Veronika Platilová.

3.6. Sledování hravého chování („social play behavior“)

Pro test hravého chování byli vybráni potkaní samci 22. PND, kdy jsme je vložili do průhledného boxu ve zvukotěsné místnosti. V den

pozorování byla zvířata oddělena od matky a sourozenců a 3,5 hodiny před začátkem pozorování byla mláďata jednotlivě umístěna do samostatného boxu. Pro vlastní pozorování jsme použili metodu podle Vanderschurena a spol., (1995).

Videozáznam chování zvířat byl natáčen za pomoci videokamery. Pro další vyhodnocování záznamu byl použit program „AKTIVITY“ (Donát P., 1991), který umožnil pozorovateli zaznamenat jednotlivé vzorce chování z videozáznamu. Program byl vybaven generátorem časových impulsů s frekvencí 0,1 sekundy, což umožnilo přesně určit četnost, dobu trvání i dobu prvního výskytu daného vzorce chování.

3.7. Reakce na nové prostředí („open field test“)

Použitá metoda umožňuje studium orientační a adaptační reakce potkana na nové prostředí. Princip testu spočívá ve vložení zvířete do arény o velikosti (délka: 65 cm, šířka: 46 cm, výška: 35 cm) a sledování vzorců jeho chování (Tejkalová a Šťastný, 2005).

Testy byly prováděny 35. a 50. PND mezi 7.30 a 13.00 hod. Chování potkana bylo monitorováno na televizní obrazovce. Každé 5-ti minutové sezení bylo zaznamenáno na videorekordér (Panasonic VHS recorder) podobně jako při sledování „hravého“ chování. Počítačovým programem „AKTIVITY“ jsme vyhodnocovali předem definované behaviorální vzorce (Benešová a spol, 2001).

3.8. Měření akustické úlekové reakce a její prepulzní inhibice

Akustickou úlekovou reakci (ASR) a její prepulzní inhibici (PPI) jsme měřili pomocí zařízení SR-LAB (San Diego Instruments, USA), jehož

součástí je zvukotěsná komora, piezoelektrický akcelerometr, uzavíratelné válcovité pouzdro pro umístění zvířete a zvukový reproduktor.

Zvířata absolvovala testy 50. PND. Při habituačním nácviku byli potkani vystaveni „aklimatizačnímu“ šumu o intenzitě 70 dB a následně 12 zvukovým podnětům o intenzitě 120 dB (PA).

Časový sled a druhy předpodnětů (prepulsů, PP) v rámci vlastního pozorování byly uspořádány podle doporučeného postupu (Ellenbroek a spol., 2002). Vlastní intenzita předpodnětů činila 73, 75 nebo 80 dB (tj. byla 3, 5 a 10 dB nad úroveň šumu), přičemž každý z nich byl opakován během testu celkem 10krát. Variabilní intervaly mezi sekvencemi byly v rozmezí 10-20 s. Při deseti kontrolních měřeních (no stimulus) byl generován pouze „bílý“ šum, což umožnilo sledovat, zda zvíře reaguje jen na stimulační podněty (Ellenbroek a spol., 2002; Tejkalová a Šťastný, 2005).

3.9. Statistická analýza dat

Data získaná při testech chování byla statisticky hodnocena pomocí analýzy variance pro 1 parametr (ANOVA), v případě abnormální distribuce byla provedena korekce pomocí neparametrického Mann-Whitney-ova testu. Výsledky jsme uváděli jako průměrné hodnoty s četností „n“ prvků v souboru \pm S.E.M. Všechna statistická hodnocení zvířat provedl Dr. Klaschka za použití statistických programů BMDP.

Při statistickém vyhodnocení výsledků krevních plynů jsme použili Studentův nepárový t-test a pro vyhodnocení abnormální distribuce D-Agostino test.

U ostatních biochemických parametrů (aktivita GGT, koncentrace cAMP a IP₃) byly naměřené hodnoty statisticky zpracovány pomocí

ANOVA a Studentova nepárového t-testu. Za statisticky významné rozdíly jsme ve všech případech považovali hodnoty, kdy $p < 0,05$.

4. VÝSLEDKY

4.1. **Vliv 1-hodinové mozkové ischemie na napětí krevních plynů u 12denního potkana**

Jednu hodinu trvající ischemie mozku potkaních sameček 12. PND způsobila významné snížení hodnoty pH krve v porovnání s kontrolními zvířaty. Současně ischemizovaným mláďatům statisticky významně pokleslo procentuálně vyjádřené sycení krve O_2 (spO_2), přestože pokles pO_2 nedosáhl statistické významnosti. Krátkodobý podvaz obou karotid způsobil vzestup napětí CO_2 (pCO_2), avšak bez statisticky významné změny plazmatické koncentrace hydrogenuhličitanového aniontu (HCO_3^-). Přitom srovnání jednotlivých hodnot u skupiny kontrolních a naivních mláďat neodhalilo statisticky významné rozdíly, přestože vzorky krve byly odebrány buď z a. carotis communis (kontrolní skupina) nebo přímo z pravého srdce (intaktní skupina), což ukazuje tabulka č.1. Vzhledem k tomu, že u žádného ze sledovaných parametrů jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl, lze předpokládat, že ani inhalační anestézie, ani vlastní chirurgický zákrok významně neovlivnily hodnoty astrupa u žádné ze studovaných skupin potkaních sameček.

Tabulka 1. *Napětí krevních plynů v krvi naivních, kontrolních a ischemických potkaních mláďat po jednohodinovém podvazu obou společných krkavic 12. PND.*

Skupina	n	pH	pO ₂ [kPa]	pCO ₂ [kPa]	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	spO ₂ [%]
Naivní!	5	7,27±0,01	22,4±5,2	6,8±0,1	23,8±0,4	99,1±0,3
Kontrolní	10	7,28±0,01	30,4±4,3	6,1±0,5	22,4±1,6	99,4±0,2
Ischemická	10	7,22±0,01*	21,5±4,2	7,6±0,3*	23,4±1,0	96,4±0,8*

Všechna data jsou vyjádřena jako průměr získaných hodnot ± S.E.M.;

* statisticky významný rozdíl od kontrolní skupiny, $p < 0,05$. n - počet zvířat, ! - odběry provedeny kardiální punkcí

4.2. Ischemií navozené změny aktivity GGT v mozkové tkáni a v krevní plazmě potkana

Naši pozornost jsme zaměřili na aktivitu membránově vázané GGT ve frontoparietální oblasti mozkové kůry a v hipokampech mladých (12. PND) a dospělých (50. PND) potkanů. Současně jsme stanovili aktivitu solubilní formy tohoto enzymu v krevní plazmě.

Mozkovou ischemií jsme jak u mláďat tak u dospělých potkanů navodili použitím výše popsaného „dvouvaskulárního modelu“, přičemž obě skupiny se lišily délkou uzávěru obou společných krkavic (bližší viz. část III). U dospělých zvířat jsme odběr vzorků mozkové tkáně provedli 24 hodin po podvazu obou krkavic. U mláďat, která byla vystavena obdobnému zákroku po dobu jedné hodiny jsme vzorky mozkové tkáně a krve odebírali 38 dní po deligaci krkavic, tj. 50. PND, kdy mladí samci dosáhli pohlavní

dospělosti. Odběr vzorků krevní plazmy u mláďat jsme prováděli také kardiální punkcí, a to 24 nebo 48 hodin po podvazu krkavic. Aktivita obou forem GGT v mozkové tkáni, respektive v krevní plazmě, je pro jednotlivé věkové a experimentální skupiny uvedena v tabulce č. 2 a 3.

Uzávěr obou karotických tepen u dospělých potkanů trvajících 24 hodin vedl k ischemickému poškození, které provázal vzestup aktivity GGT v mozkové tkáni (v mozkové kůře i v hipokampu). Ve srovnání s kontrolní skupinou byl tento vzestup statisticky významný v obou sledovaných oblastech. Zvýšenou aktivitu GGT jsme zjistili také ve vzorcích krevní plazmy, ale tento vzestup nedosáhl statistické významnosti.

Výsledky získané 50. PND naopak ukazují, že jednohodinová mozková ischemie 12denních mláďat nezanechá v období časně dospělosti žádné změny aktivity GGT v mozku ani v krevní plazmě.

Tabulka 2. *Aktivita membránově vázané formy GGT v mozku potkana [nmol pNA /mg protein/min] po podvazu obou společných krkavic u potkanů 12. nebo 50. PND*

Oblast mozku	12. PND	50. PND
Kontrola - PCX	8,27 ± 1,06	8,47 ± 0,48
Kontrola - HIPP	6,45 ± 0,37	7,99 ± 0,21
Ischémie - PCX	7,31 ± 0,48	10,58 ± 0,65*
Ischémie - HIPP	6,37 ± 0,61	10,50 ± 0,70*

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr souboru hodnot ± S.E.M.;

* statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině; p < 0,05;

PCX - frontoparietální mozková kůra, HIPP – hipokampus,

Tabulka 3. *Aktivita solubilní formy GGT v plazmě 50denních potkaních samiců [U / litr plazmy] po podvazu obou společných krkavic.*

Skupina	n	Doba po operaci	Aktivita GGT
Intaktní 12.PND	4	0-h	0,41 ± 0,06
Kontrolní 12.PND	8	24-h	0,27 ± 0,08
Kontrolní 12.PND	5	48-h	0,36 ± 0,03
Ischemická 12.PND	7	24-h	0,39 ± 0,06
Ischemická 12.PND	7	48-h	0,62 ± 0,10*
Ischemická 12.PND	7	38-dní	0,35 ± 0,03**

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr získaných hodnot aktivity GGT ± S.E.M.; n - počet zvířat; * statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině, ** statisticky významný rozdíl skupiny 38-dní od ischemizovaných 48 hodin, $p < 0,05$

4.3. Hladiny cAMP a IP₃ v krvi 50denních potkanů po krátkodobé neonatální ischemii mozku

Pozdní důsledky jednohodinové mozkové ischemie 12. PND jsme hodnotili prostřednictvím koncentrace cAMP v krevní plazmě a hladin IP₃ v trombocytech. Při srovnání experimentálních zvířat s kontrolními nebo naivními potkany (tabulka č. 4 a 5) jsme neprokázali statisticky významný rozdíl v koncentracích obou „druhých poslů“. Z výsledků je zřejmé, že krátkodobá ischemie v časném neonatálním období vývoje mozku potkana nezpůsobuje dlouhodobé změny v plazmatických koncentracích cAMP nebo obsahu IP₃ v krevních destičkách v časně dospělosti, přestože v krvi pacientů trpících schizofrenií byly změny v obsahu IP₃ v trombocytech prokázány.

Tabulka 4. *Koncentrace cAMP v plazmě 50denního potkana*

Skupina	n	Koncentrace cAMP
Naivní	18	227 ± 11
Kontrolní	10	235 ± 15
Ischemická	15	239 ± 22

Koncentrace cAMP je vyjádřena v nanomolech/litr. Uvedené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr ± S.E.M.; statistická analýza - nepárový t-test; n - počet zvířat.

Tabulka 5. *Koncentrace IP₃ v trombocytech 50denního potkana*

Skupina	n	Koncentrace IP ₃
Naivní	17	97 ± 9
Kontrolní	10	100 ± 7
Ischemická	15	97 ± 12

Koncentrace IP₃ je vyjádřena v % hodnoty naměřené ve skupině kontrolních zvířat. Data jsou vyjádřena jako průměr ± S.E.M.; statistická analýza - nepárový t-test, n - počet zvířat.

4.4. Změny chování způsobené neonatální ischemií

Pro ověření fenomenologické validity použitého animálního modelu mozkové hypoxie ve vztahu k chování podobnému schizofrenii jsme hodnotili změny v sociálních (dyadických) interakcích, v lokomoční aktivitě a v prepulzní inhibici potkanů po krátkodobé (neonatální) ischemii mozku.

4.4.1. Změny sociálního chování jako důsledek neonatální ischemie

Zjistili jsme, že frekvence i trvání interakcí hrajících si dvojic potkanů byly u kontrolních a neonatálně ischemizovaných mláďat na velmi nízké úrovni. V žádném ze sledovaných vzorců chování jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými páry, což bylo podmíněno i tím, že mláďata všech skupin vykazovala jen malou interaktivní aktivitu (11-36 % z celkového počtu zvířat).

4.4.2. Vliv neonatální ischemie na reakci potkana v novém prostředí 35. PND

U potkanů v období dospívání 35. PND (puberta) jsme prostřednictvím testu otevřeného pole hodnotili pohybovou aktivitu ve všech 3 skupinách (tabulka č. 6 a 7). Frekvence horizontálního pohybu (crossing) se mezi naivními a kontrolními zvířaty výrazně nelišila. Frekvence vztyčování (rearing) byla u zvířat kontrolní skupiny při srovnání s naivními zvířaty stejná, zatímco ve frekvenci větvení kontrolní skupina dosáhla statisticky významného zvýšení oproti naivním potkanům. Zvířata kontrolní skupiny delší dobu setrvala v klidu, více věřila a kratší dobu čenichala.

Na rozdíl od kontrolní skupiny zvířata vystavená po narození krátkodobé mozkové ischemii vykazovala výrazně vyšší lokomoční aktivitu. Dokládá to statisticky významné zvýšení frekvence horizontálního pohybu doprovázené významným zkrácením klidové fáze (immobility) a jejím pozdějším nástupem při srovnání zvířat ischemické skupiny s kontrolami. Ve frekvenci vztyčování ani v aktivitě čištění (grooming) jsme statisticky významný rozdíl mezi oběma hodnocenými skupinami nezjistili. U zvířat po

podvazu karotid jsme pozorovali vyšší frekvenci aktivit typu větření a čenichání podlážky, které ve srovnání s kontrolními zvířaty dosáhlo statistického významu. Zatímco se statisticky významně lišila doba trvání větření ve skupině ischemických mláďat vůči kontrolním, nepozorovali jsme žádné rozdíly v době trvání čenichání podlážky u stejných skupin (tabulka č. 7).

Tabulka 6. *Vliv jednodinové (neonatální) ischemie (12. PND) na chování potkana (35. PND) z hlediska frekvence jednotlivých aktivit a latence klidové fáze.*

Skupina	Naivní	Kontrolní	Ischemická
n	4	10	16
Horizontální pohyb frekvence	52,0 ± 13,8	54,0 ± 6,5	74,7 ± 6,3*
Vztyčování frekvence	15,8 ± 4,6	13,8 ± 2,1	20,0 ± 2,1
Nehybnost latence [s]	204,0 ± 50,6	200,0 ± 29,2	275,1 ± 14,6*
Větření frekvence	8,5 ± 3,6*	21,2 ± 2,2*	17,1 ± 2,1
Čenichání frekvence	60,8 ± 12,4	58,8 ± 5,4	77,2 ± 4,1*

Frekvence je vyjádřena jako průměr počtu aktivit během 5 minut ± S.E.M., $p < 0,05$, ANOVA; * statisticky významný rozdíl od kontrolní skupiny, n – počet zvířat. Výsledky latence nehybnosti jsou uvedeny v sekundách.

Tabulka 7. *Vliv krátkodobé neonatální ischemie (12. PND) na chování potkana (35. PND) z hlediska trvání nehybnosti a exploračních aktivit.*

Skupina	n	Nehybnost Doba trvání [s]	Větření Doba trvání [s]	Čenichání Doba trvání [s]
Naivní	4	14,0 ± 6,8	22,0 ± 14,5	177,9 ± 32,1
Kontrolní	10	27,8 ± 10,4	67,4 ± 10,8*	136,3 ± 8,1
Ischemická	16	3,1 ± 1,7*	37,8 ± 5,7*	162,3 ± 9,9

Doba trvání větření, čenichání a klidové aktivity je vyjádřena v sekundách. Výsledné hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr trvání aktivity během 5minutového sledování ± S.E.M; ke statistické analýze použita ANOVA, $p < 0,05$. * statisticky významný rozdíl vůči kontrolní skupině, n - počet zvířat

4.4.3. Vliv neonatální ischemie na reakci potkana v novém prostředí 50. PND

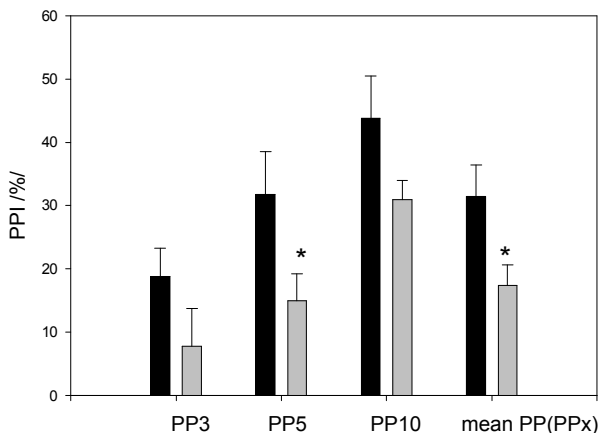
Pomocí testu otevřeného pole jsme hodnotili pohybovou aktivitu a chování ve skupině naivních, kontrolních a ischemických potkanů v období časné dospělosti (50. PND). Spontánní motorická aktivita v reakci na nové prostředí, charakterizovaná frekvencí lokomočních pohybů a vztyčováním, byla u ischemických zvířat pouze nevýznamně zvýšena ve srovnání s kontrolními potkany. Na rozdíl od zvířat ve věku 35. PND se pohybové a explorační aktivity potkanů s neonatálním ischemickým poškozením významně nelišily od kontrolních zvířat a to v žádném ze sledovaných parametrů. Také jsme nezjistili statisticky významný rozdíl mezi

jednotlivými skupinami v případě trvání nehybnosti nebo frekvence větření či čenichání.

4.5. Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce a její ovlivnění neonatální ischemií

Existuje celá řada studií, které se zabývají deficitem prepulzní inhibice úlekové reakce u osob trpících schizofrenií, ale v dostupné literatuře jsme nenalezli použití modelu perinatální ischemie jako faktoru ovlivňujícího třídění informací („senzomotorický gating“) u jedince v časně dospělosti.

Následující graf (obrázek č.1) ukazuje, že deficit prepulzní inhibice akustického úleku lze pozorovat u dospělých zvířat po krátkodobé neonatální ischemii. Statisticky významný deficit jsme zjistili po vyhodnocení rozdílů mezi kontrolní a pokusnou skupinou v případě předpokladu o intenzitě 5 dB (PP5) a u celkové hodnoty PP_x , která představuje průměr ze všech získaných hodnot naměřených při PP3, PP5 a PP10. Rozdíly naměřené s předpoklady o intenzitě 3 dB (PP3) a 10 dB (PP10) nad prahem „bílého“ šumu (intenzita 70 dB) dosáhly pouze hraniční statistické významnosti.



Obrázek 1: Vliv předpodnětu na velikost prepulzní inhibice akustické úlekové reakce po ischemii proběhlé 12. PND.

Intenzita akustického podnětu 120 dB a zvolených předpodnětů (PP) 3, 5 a 10 dB nad úroveň „bílého“ šumu. PPx je průměrná hodnota z PP3+PP5+PP10. PPI je velikost prepulsu. Kontrolní zvířata – černé sloupce (n = 7), neonatálně ischemizovaná zvířata - šedé sloupce (n = 11). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SEM, * statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině; $p < 0,05$.

5. DISKUSE

Cílem disertační práce bylo zjistit do jaké míry námi ověřovaný model mozkové ischemie (a) vykazuje konstrukční a fenomenologickou validitu s psychotickým chováním člověka, pro které může být rizikovým faktorem zevního prostředí porodní nebo poporodní hypoxické poškození mozku a (b) zda charakteristiky tohoto modelu mají predikční validitu vedoucí k lepšímu pochopení etiopatogeneze schizofrenie.

5.1. Napětí krevních plynů v modelu mozkové ischemie

Stupeň stagnační hypoxické zátěže jsme charakterizovali stanovením pH krve, napětím krevních plynů a kyslíkovou saturací ve vzorcích arterializované krve, které byly odebrány bezprostředně po ischemické příhodě. Eklöf a Siesjö, (1972) použili obdobný model u dospělého zvířete a zjistili, že samotný uzávěr trvající 5 nebo 30 minut neovlivnil napětí krevních plynů v arteriální krvi, avšak v žilní krvi získané z horního šípového splavu zaznamenali vzestup $p\text{CO}_2$ a pokles $p\text{O}_2$. Ve srovnání s kontrolami byly tyto změny statisticky významné teprve při kombinaci tepenného uzávěru s uměle navozenou hypotenzí na 100 anebo 70 mm Hg. Nižší hodnota $p\text{O}_2$ souvisela s poklesem průtoku krve mozkem na 50 % normální hodnoty. Jestliže však byla udržována stálá hodnota středního arteriálního tlaku (kolem 100 mm Hg), změny v napětí O_2 a CO_2 nebyly provázeny významnými změnami v energetickém metabolismu mozku. Výrazné snížení normálního průtoku krve mozkem (pod 50 % kontrolní hodnoty) potvrdil ve dvouvaskulárním modelu u potkanů kmene Wistar Smith a spol. (1984). Tento model patnáctiminutové mozkové ischemie byl však zatížen velmi velkou mortalitou.

5.2. Ischemické poškození mozku ve změnách aktivity GGT

Membránově vázaná GGT patří mezi indikátory poškození mozku spojených se změnou v prostupnosti mozkové kapilární bariéry (Lisý a spol., 1979; Šťastný a spol., 1997). Její aktivita vlivem akutního hypoxicko-ischemického poškození mozku významně stoupá v některých oblastech mozkové kůry a hipokampu, avšak tato změna u mláďat nemá trvalý

charakter, neboť potkani vystavení po narození opakované výskové hypoxii měli v dospělosti aktivitu této formy GGT sníženou (Šťastný a spol., 1985). Změny aktivity GGT můžeme pozorovat i jako důsledek zánětlivých změn, které hypoxicko-ischemické poškození provázejí (Šťastný a spol., 1997). V této souvislosti jsme zjistili, že v závislosti na aplikační cestě (i.v. nebo i.c.v.) infuze IL-1 β způsobuje v hipokampech dospělého potkana bifazické změny v aktivitě GGT charakterizované poklesem aktivity enzymu v prvních hodinách a jejím vzestupem za 24 hodin (Kaiser a spol., 2006).

5.3. Fosfoinositidový signální systém a systém cAMP jako možní ukazatelé neonatálního poškození mozku u schizofrenie

IP₃ a cAMP patří mezi „druhé posly“, jejichž hladiny se mění u nemocných se schizofrenií. V krevních destičkách těchto nemocných nalezneme snížené množství cAMP (Garver a spol., 1982) a také změněné koncentrace vybraných fosfoinositidů (Kaiya H., 1992; Essali a spol., 1990).

Řířpová se spolupracovníky (1997) zjistila, že koncentrace IP₃ je statisticky významně vyšší u nemocných se schizofrenií ve srovnání se zdravými jedinci. Zvýšené hladiny tohoto „druhého posla“ přetrvávaly i u nemocných dlouhodobě léčených neuroleptiky. Vzhledem k tomu, že změny v hladinách cAMP a fosfoinositidů jsou považovány za možný biologický „marker“ schizofrenie, použili jsme koncentraci cAMP a hladiny IP₃ jako jednu z charakteristik validity našeho modelu psychózy, ale neprokázali jsme žádné významné změny v jejich koncentracích u dospělých potkanů vystavených neonatální ischemii mozku.

5.4. Charakteristiky chování potkana v neurovývojovém modelu schizofrenie

Projevy pohybové hyperaktivity, ale i hypoaktivity navozené hypoxicko-ischemickým poškozením mozku potkana publikovala řada autorů (Dell'Anna a spol., 1991; Rogalska a spol., 2004; Decker a spol. 2003). Zjištěné rozdíly mezi jednotlivými studiemi byly pravděpodobně dány rozdílnou volbou animálního modelu a výběrem zvířecího druhu nebo kmene. Rogalska a spol., (2004) označili chování vyvíjejícího se potkana po neonatální hypoxii, vyvolané pobytem v prostředí s vyšší koncentrací dusíku, jako bifázický proces. Tito autoři pozorovali hyperaktivitu potkana v reakci na nové prostředí (test otevřeného pole) v období mezi 5. a 30. PND. Druhou fází provázal pokles lokomoční aktivity po 45. PND. Decker a spol., (2003) pozorovali posthypoxickou lokomoční hyperaktivitu u 35denních potkanů bez ohledu na fázi cirkadiálního cyklu. Přitom krátkodobá opakovaná hypoxie vyvolala změny prokazatelné v dospělosti jedince, zatímco jednorázová hypoxická příhoda byla z hlediska dlouhodobých následků méně významná.

Změny chování v důsledku hypoxicko–ischemického poškození v rané fázi jeho vývoje byly charakterizovány hyperlokomocí, stereotypií, deficitem paměti nebo narušením sociálního kontaktu, tedy projevy které je možné pozorovat u psychózy podobné schizofrenii (Dell'Anna a spol., 1991). Některé z těchto charakteristik jsme zjistili i v popisovaném modelu založeném na 1-h trvajícím podvazu obou karotid.

5.5. Úleková reakce a její prepulzní inhibice v animálním modelu schizofrenie

Prepulzní inhibici úlekové reakce většina autorů definuje jako schopnost slabého zvukového předpodnětu inhibovat motorickou odpověď na intenzivní úlekový podnět (Graham, 1975; Koch, 1999; Bubeníková a spol., 2002). Metoda prepulzní inhibice akustické úlekové reakce je jedním z ukazatelů změn ve zpracování informací („sensorimotor gating“) u člověka i zvířete. Její deficit byl popsán u nemocných se schizofrenií, s obsedantně-kompulzní poruchou, Tourettovým syndromem, blefarospasmem, temporální epilepsií nebo u póurazové stresové poruchy (Braff a spol., 2001). U nemocných se schizofrenií a jejich příbuzných je snížení PPI často zjištěnou změnou chování a považuje se za neurobiologický ukazatel tohoto onemocnění (Bubeníková a spol., 2002).

Vzhledem k našim výsledkům se proto domníváme, že ischemické poškození mozku potkana v časně postnatálním období vede k latentním změnám ve vývoji CNS, které se projeví změnami v PPI až v časně dospělosti. Obdobné změny PPI popsal ve své přehledné práci Van den Buuse a spol., (2003). Braff a spol., (2001) ve své práci citují řadu studií, které popisují deficit PPI u nemocných se schizofrenií. Z tohoto pohledu se validita našeho animálního modelu shoduje s uvedenými klinickými údaji, nelze však vyloučit ani jistou míru úzkostné reakce těchto zvířat.

6. ZÁVĚR

Výsledky charakterizují vypracovaný animální model psychózy založený na krátkodobé neonatální ischemii mozku a dokládají jistou míru jak konstrukční, fenomenologické tak i predikční validity. Vzniklé ischemicko-hypoxické poškození, které jsme navodili dočasným uzávěrem obou společných krkavic potkana 12. PND, lze s přihlédnutím k rozdílnému stupni zralosti funkcí přirovnat k situaci způsobené perinatální hypoxií lidského plodu a novorozence. Přes dílčí rozdíly ve vybraných biochemických ukazatelích (napětí krevních plynů, aktivita GGT, hladiny druhých poslů), jsme pozorovali změny v chování potkana v období jeho pohlavního dospívání, které podporují původní předpoklad, že perinatální hypoxie lidského plodu a novorozence je etiopatogenetickým faktorem pro vznik schizofrenie, a to především u jedinců s genetickým rizikem jaké představují jednonukleotidové polymorfizmy kandidátních genů (Šťastný a spol., 2005)

7. SUMMARY

Although the cause of schizophrenia is not fully elucidated, there is increasing evidence that this severe psychiatric illness may result from a disturbance early in development. Evidence for this so called „neurodevelopmental hypothesis“ comes from a variety of sources, including epidemiological, gynecological, psychological and pathological data.

Fetal and perinatal hypoxia-ischemia belongs to obstetric complications which can increase the risk of schizophrenia. These complications such as premature rupture of fetal membranes, low birth weight, newborn immaturity, forceps delivery and resuscitation at birth are

frequently accompanied by hypoxic-ischemic brain damage during delivery. We assume that perinatal hypoxia together with genetic factors influence a susceptibility to schizophrenia and represent significant risk factors of this disease.

We used a heuristic model in our study to determine if brain hypoxic-ischemic episode can actually cause not only changes of biochemical markers but also behavioral changes resembling those seen in schizophrenia.

Neurodevelopmental processes in neonatal rats continue during the first three weeks of postnatal life and reach the level of those observed in human newborns at the end of the second postnatal week. Therefore, rat pups at postnatal day 12 (PND12) were used and subjected to one hour of continuous occlusion of both common carotid arteries. Under these conditions the neonatal brain suffered from oligemic hypoperfusion (stagnant hypoxia).

Hypoxic lesions were characterized biochemically using blood gas parameters (arterial pH, arterial partial pressures of CO₂ and O₂), activity membrane-bound gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) in the brain and also activity soluble GGT in the blood. Expected hypofunction of the glutamatergic transmission observed in schizophrenics was the reason why we determined levels of second messengers in plasma and blood platelets. To determine whether the behavioural changes in the post-ischemic animals were already present early in life or emerged during the life we used battery of tests – social (play) behaviour (PND 22), reactivity in open field paradigm (PND 35 and 50) and the acoustic startle response and prepulse inhibition (PND 50).

Our results support this assumption and show that 1-h lasting continuous hypoperfusion of neonatal rat brains can induce biochemical and behavioural changes apparent in young adulthood that are in relation to schizophrenia. The present study supports the model of schizophrenia as a neurodevelopmental disorder. We believe that an early cerebral hypoxic/ischemic lesion is a risk factor of later neurodevelopment and consequently having a potency to alter CNS function. Thus, even though genetic vulnerability plays an important role in the development of schizophrenia, our findings suggest that obstetric complications also contribute as epigenetic factors-to the aetiology of schizophrenia.

8. LITERATURA

1. Benešová O., Tejkalová H., Křištofiková Z., Hušek P., Nedvídková J., Yamamotová A.: *Brain maldevelopment and neurobehavioural deviations in adult rats treated neonatally with indomethacin. Eur Neuropsychopharmacol* 11(5); (2001): 367-373
2. Boksa P.: *Animal model of obstetric complications in relation to schizophrenia. Brain Res Rev* 45; (2004): 1-17
3. Braff D., Geyer M.A., Swerdlow N.R.: *Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. Psychopharmacology* 156; (2001): 234-258
4. Bubeníková V., Horáček J., Benešová O., Šťastný Fr.: *Animální modely schizofrenie. Psychiatrie* 7; (2003): 26-30
5. Bubeníková V., Horáček J., Šťastný F.: *Prepulzní inhibice úlekové reakce jako ukazatel deficitu zpracování informací. Psychiatrie* 6 (1); (2002): 29-32
6. Cannon M., Jones P.B., Murray R.M.: *Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. Am J Psychiatry* 159; (2002): 1080– 1092
7. Decker M.J., Hue G.E., Caudle W.M., Miller G.W., Keating G.L and Rye D.B.: *Episodic neonatal hypoxia evokes executive dysfunction and*

- regionally specific alterations in markers of dopamine signaling. *Neuroscience* 117; (2003): 417-425
8. Dell'Anna M.E., Calzolari S., Molinari M., Iuvone L., Calimici R.: Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav Brain Res* 45; (1991): 125-134
 9. Donát P.: Measuring behavioral: The tools and the strategies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 15; (1991): 447-454
 10. Eklöf B., Siesjö B.K.: The effect of bilateral carotid ligation upon the blood flow and the energy state of the rat brain. *Acta Physiol Scand* 86; (1972): 155-165
 11. Ellenbroek B.A., Cools A.R.: Early maternal deprivations and prepulse inhibition: the role of postdeprivation environment. *Pharmacol Biochem Behav* 73; (2002): 177-184
 12. Essali M.A., Das I., Belleruche J.: The platelet polyphosphoinositide system in schizophrenia: The effects of neuroleptic treatment. *Biol Psychiatry* 28; (1990): 475-487
 13. Garver D.L., Johnson C., Kanter D.R.: Schizophrenia and reduced cyclic AMP production: evidence for the role of receptor – linked events. *Life Sci* 31; (1982): 1987-1992
 14. Graham F.K.: The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 32; (1975): 238-248
 15. Henderson-Smart D.J.: The effect of gestational age on the incidence and duration of recurrent apnea in newborn babies. *Aust Pediatr J* 125; (1981): 273-276
 16. Jilek L.: Reaction of the organism to cerebral ischemia in the course of ontogenesis I. The development of resistance to cerebral ischemia in the rat. *Sborník* 59; (1957): 188-195
 17. Kaiser M., Mareš V., Šťastný F., Bubeniková-Valešová V., Lisá V., Suchomel P., Balcar V.J.: The influence of interleukin-1 β on γ -glutamyl transpeptidase activity in rat hippocampus. *Physiol Res* 55; (2006): 461-465
 18. Kaiya H.: Second messenger imbalance hypothesis of schizophrenia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 46; (1992): 33-38
 19. Koch M.: The neurobiology of startle. *Progress in Neurobiology* 59; (1999): 107-128
 20. Lipská B.K., Weinberger D.R.: To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23; (2000): 223-239

21. Lisý V., Šťastný F., Lodin Z.: Regional distribution of membrane-bound gamma-glutamyl transpeptidase activity in mouse brain. Comparison with rabbit brain. *Neurochem Res.* 4(6); (1979):747-53
22. O'Callaghan E., Gibson T., Colohan H.A., Buckley P., Walse D.G., Larkin C., Waddington J.L.: Risk of schizophrenia in adults born after obstetric complications and their association with early onset of illness: A controlled study. *Br Med J* 305; (1992): 1256-1259
23. Quinn R.: Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition* 21; (2005): 775-77
24. Rapoport J.L., Addington A.M., Frantou S.: The neurodevelopmental model of schizophrenia (review). *Molec Psychiatry* 10; (2005): 134-449
25. Řířpová D., Strunecká A., Farská I., Němcová V.: Calcium induced alterations in phospholipids in platelets of schizophrenic patients. *Physiol Res* 46; (1997): 59-68
26. Rogalska J., Caputa M., Wentowska K., Nowakowska A.: Stress-induced behaviour in juvenile rats: effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron. *Behav Brain Res* 154; (2004): 321-329
27. Romijn H.J., Hofman M.A., Gramsbergen A.: At what age is developing rat cortex comparable to the full term human baby? *Early Hum Dev* 26; (1991): 61-67
28. Smith M.L., Bendek G., Dahlgren N., Rosen I., Wieloch T. and Siesjö B.K.: Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69; (1984): 385-401
29. Šťastný F., Antořová E., Kostir J., Jilek L.: Effect of stagnant hypoxia on ATP, Na + -K + -ATPase, and electrolyte content in the developing rat brain. *Brain Res.* 33(2); (1971): 597-600
30. Šťastný F., Dvořáková L., Lisý V.: Biochemical characteristics of γ -glutamyl transpeptidase in capillaries from entorhinohippocampal complex of quinolinate-lesioned rat brain. *Mol and Chem Neuropatol* 32; (1997): 143-161
31. Šťastný F., Lisý V., Tomášová H., Trojan S.: Effects of short-term and prolonged aerogenic hypoxia on gamma-glutamyl transpeptidase activity in the brain, liver and biological fluids of young rats. *Neurochem Res* 10; (1985): 819-828
32. Šťastný F., Tejkalová H., Skuba I., Balcar V.J., Kaiser M., Yoneda Y.: Quinolinic acid, N-methyl-D-aspartate receptor and schizophrenia: testing an integrative theory. *Amino Acid Signaling* 4; (2005): 67-83

33. Tejkalová H., Kaiser M., Klaschka J., Šťastný F.: Does neonatal brain ischemia induces schizophrenia-like behaviour in young adult rats. *Physiol Res*; (2006):
34. Tejkalová H., Šťastný F.: Neurovývojová a neuroinfekční hypotéza schizofrenie v animálném modelu. *Psychiatrie 9 (Suppl.3)*; (2005): 21-24
35. Trojan S., Šťastný F.: Perinatální hypoxie a vývoj mozku. *Čas Lék čes 127*; (1988): 33-38
36. Tuor U.I., Bigio M.R., Chud'as P.D.: Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification. *Cerebrovasc Brain Rev 8*; (1996): 159-193
37. Vanderschuren L.J., Niesink R.J., Van Ree J.M.: Influence of environmental factors on social play behaviour of juvenile rats. *Physiol Behav 58*; (1995): 119-123
38. Van den Buuse M., Garner B., Koch M.: Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: Effects on prepulse inhibition. *Current Molecular Medicine 3*; (2003): 459-471

9. SEZNAM PUBLIKACÍ

9.1. **Publikace in extenzo s IF a bez IF**

1. Pliss L., Bubeníková V., Balcar V.j., Šťastný F and Kaiser M.: High intracerebral level of N-acetyl-aspartyl-glutamate induces non-apoptotic neuronal death in rat hippocampal formation in vivo. *J Neurochem 77 (Suppl.1)*; (2001): 43S
2. Tejkalová H., Bubeníková V., Kaiser M., Šťastný F.: Changes in prepulse inhibition of acoustic startle in selected animal models of schizophrenia. *Psychiatrie 8 (Suppl. 1)*; (2004): 41
3. Šťastný F., Tejkalová H., Skuba I., Páleníček T., Pliss L., Mareš V., Křištofiková Z., Kaiser M., Höschl C., Bubeníková V., Balcar J.V.: Interakce dopaminového D1/D2 receptoru s glutamátovým receptorem NMDA typu: od molekul k animálním modelům schizofrenie. *Psychiatrie 8 (Suppl.3)*; (2004): 32-41
4. Šťastný F., Tejkalová H., Skuba I., Balcar V.J., Kaiser M., Yukio Y.: Quinolinic acid, N-methyl-D-aspartate receptor and schizophrenia: Testing an integrative theory. In: *Amino Acid Signaling 04* (Yukio Yoneda, ed), Research Singpost, Fort P.O., Trivandrum, pp. 67-83.
(Review)

5. Kaiser M., Mareš V., Šťastný F., Bubeníková-Valešová V., Lisá V., Suchomel P., Balcar V.J.: The influence of interleukin-1 β on γ -glutamyl transpeptidase activity in rat hippocampus. *Physiol Res* 55; (2006): 461-465 (**IF = 1,609**)
6. Tejkalová H., Kaiser M., Klaschka J., Šťastný F.: Does neonatal brain ischemia induces schizophrenia – like behaviour in young adult rats? *Physiol Res* 56 ; (2007) (v tisku) (**IF = 2,093**)
7. Platilová V., Kaiser M., Šťastný F.: Dopaminergic neurotransmission and levels of cAMP in blood plasma of adult rats. *Physiol Res* 53; (2003)
8. Šťastný F., Bubeníková V., Roman O., Kaiser M., Mareš V., Balcar V.J.: Raised levels of plasma and cerebrospinal fluid interleukin - 1 β and γ -glutamyl transpeptidase activity in adult rat brain. *Physiol Res* 53; (2003): 41P
9. Buchvald P., Suchomel P., Kaiser M.: Chirurgická léčba ependymomů krční a horní hrudní míchy. *Cesk Slov Neurol N* 70/103(2); (2007): 196-201 (**IF = 0,045**)
10. Beneš V., Buchvald P., Kaiser M., Mikuláščík J., Suchomel P.: Centrální neurocytom: kasuistika a přehled literatury. *Cesk Slov Neurol* (přijato do tisku)

9.2. Abstrakta a prezentace

1. Kaiser M., Bubeníková V., Platilová V., Šťastný F.: Does neonatal brain ischemia lead to neurochemical and behavioral changes in young adult rats? Abstracts of the Xth Congress „Neuroscience in the Third Millenium“; (2002): 27
2. Platilová V., Kaiser M., Šťastný F.: Dopaminergic neurotransmission and levels of cAMP in blood plasma of young adult rats (79. Fyziologické dny, Plzeň, 2003 – poster)
3. Šťastný F., Bubeníková V., Roman O., Kaiser M., Mareš V., Balcar V.J.: Raised levels of plasma and cerebrospinal fluid interleukin-1 β and γ -glutamyltranspeptidase activity in adult rat brain. (79. Fyziologické dny, Plzeň, 2003 – poster)
4. Kaiser M., Buchvald P., Suchomel P.: Chirurgická léčba extramedulárních tumorů míchy. (pracovní dny České neurochirurgické společnosti, České Budějovice, 2001)
5. Kaiser M., : Naše zkušenosti s měřením fiberoptickými čidly Camino , vědecká konference, (1996)

6. Kaiser M., Tejkalová H., Klaschka J., Šťastný F.: Neonatální ischemie mozku jako rizikový faktor pro vznik schizofrenie v animálním modelu, XI. Neuroontogenetický den, (2006)
7. Buchvald P., Suchomel P., Švancar P., Kaiser M.: Ependymomy krční a horní hrudní míchy (pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Praha, 2005)
8. Kaiser M., Buchvald P., Barsa P., Suchomel P.: Atypické expanze v oblasti koutu mostomozečkového (naše zkušenosti), sjezd České a Slovenské neurochirurgické společnosti, (1997)
9. Kaiser M., Macháňová M., Hrušková L., Holíková M., Buchvald P., Suchomel P.: Komplexní léčba primárního mozkového lymfomu – naše zkušenosti (pracovní dny České neurochirurgické společnosti, Praha, 2005)
10. Kaiser M.: Oligodendrogliomy – kazuistiky (postgraduální kurs v neurochirurgii, Hradec Králové, 2006)
11. Kaiser M., Macháňová M., Hrušková L.: Problematika léčby primárních míšních tumorů (XI. dny profesora Vladimíra Staška, Praha, 2005)
12. Macháňová M., Kaiser M., Hrušková L.: Dispenzarizační péče u nemocných po léčbě primárních mozkových nádorů (XI. dny profesora Vladimíra Staška, Praha, 2005)