

**VÝZNAM ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ MOZKU
V NEUROVÝVOJOVÉM ANIMÁLNÍM MODELU
SCHIZOFRENIE**

Wypracoval: **MUDr. Miroslav K a i s e r**

Neurocentrum Liberec (odd. neurochirurgie)
Husova 10
460 63 LIBEREC

Školitel: Doc. MUDr. František Šťastný, CSc.

Psychiatrické centrum Praha
Ústavní 91, 181 03 Praha 8

Praha, Česká Republika

2007

PODĚKOVÁNÍ

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 poskytovali po celé období mého postgraduálního studia.

Rád bych poděkoval také RNDr. Janu Klaschkovi, CSc., Ing. Jiřímu Janouškovi a MUDr. Tomáši Soukupovi z lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové za pomoc při statistickém zpracování získaných výsledků a cenné rady při práci s počítačovým softwarem. Dále děkuji také kolegyni RNDr. Věře Valešové, PhD. za spolupráci při laboratorních experimentech. Současně si dovoluji poděkovat všem technickým asistentkám, jmenovitě pak paní Bohdaně Budínové, Kateřině Horníkové a Haně Švagerové, které svými cennými zkušenostmi při práci s laboratorními zvířaty přispěly ke zdárnému průběhu všech mých experimentálních pozorování. Současně bych rád poděkoval panu primáři Doc. MUDr. Petru Suchomelovi, PhD., ale i všem mým kolegům z Neurocentra v Liberci za to, že akceptovali tuto externí spolupráci s Psychiatrickým centrem v Praze.

Závěrem vyjadřuji touto cestou i dík paní Aleně Zemanové za jazykové připomínky a mé manželce Markétě Kaiserové za shovívavost, jistou dávku tolerance a podpory po celou dobu přípravy této práce.

POUŽITÉ ZKRATKY

a	arteria
ACI	kmenová linie potkana August Copenhagen Irish
AMP	adenozinmonofošfát
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazol propionová kyselina
ADM	adrenomedullin
ADP	adenozindifosfát
ASR	akustická úleková („startle“) reakce
ATP	adenozintrifosfát
bFGF	β -fibroblastový růstový faktor
BMDP	program pro zpracování biomedicínských dat
cAMP	cyklický adenzinmonofošfát
CBF	přůtok krve mozkem
CMRO ₂	mozkový metabolický obrat kyslíku
CNS	centrální nervový systém
CO ₂	oxid uhličitý
CSF	mozkomíšni mok
DA	dopamin
DG	diacylglycerol
EEG	elektroencefalografie
fMRI	funkční magnetická rezonance
GGT	gama-glutamyltranspeptidáza
HCO ³⁻	hydrogenuhličitanový aniont
HIPP	hipokampus
i.v.	intravenózně
i.c.v.	intracerebroventrikulárně
IP	fosfoinositidy
IP ₃	inositol- 1,4,5- trifosfát
LDH	laktátdehydrogenáza
MAO	monoaminoxidáza
NAAG	N-acetyl-L-asparty-L-glutamát
NADH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu

O ₂	kyslík (molekula)
OXPPOS.....	system oxidativní fosforylace v mitochondriích
³¹ P-MRS.....	magnetická rezonanční spektroskopie
PCX.....	parietální kúra
pCO ₂	parciální tlak oxidu uhličitého
PET	pozitronová emisní tomografie
pH	vodíkový exponent
PI.....	fosfatidylinositol
PIP ₂	fosfatidylinositolbisfosfát
PKA.....	cAMP-dependentní proteinkináza
PKC.....	proteinkináza C
PND	den po narození
pO ₂	parciální tlak kyslíku
PPI	prepulzní inhibice úlekové reakce
QUIN	kyselina chinolinová
RDS.....	syndrom dechové tísně novorozenců
r.....	rok
SCZ.....	schizofrenie
SDH	sukcinátdehydrogenáza
SHRSP	spontánně hypertenzní potkan
SPECT	jednofotonová emisní tomografie
SpO ₂	saturace krve kyslíkem
XOD.....	xantinoxidáza

OBSAH

I. ÚVOD.....	8
I.1. Význam kyslíku v organizmu	8
I.1.1. Historické poznámky	8
I.1.2. Transport kyslíku a jeho spotřeba v dospělém organizmu.....	9
I.1.3. Nedostatek kyslíku v organizmu.....	10
I.1.4. Hypoxie lidského plodu a novorozence	12
I.1.5. Experimentální hypoxie	15
I.1.6. Vývojové změny CNS u člověka / zvířete a indikátory jeho poškození.....	16
I.1.7. Indikátory ischemického poškození mozku: Aktivita gama-glutamyltranspeptidázy	18
I.1.8. Indikátory ischemického poškození mozku: hladiny druhých posílů - cAMP a IP ₃	19
I.1.9. Změny chování dospívajícího potkana po neonatální ischemii mozku	21
I.2. Animální modely mozkové ischemie.....	22
I.2.1. Anatomické odlišnosti cévního zásobení mozku potkana a člověka	22
I.2.2. Animální modely mozkové ischemie: globální a fokální omezení přívodu krve do mozku	23
I.2.2.1. Modely globální ischemie.....	23
I.2.2.2. Modely fokální ischemie	25
I.2.3. Je animální model mozkové ischemie i modelem schizofrenie?.....	30
I.3. Perinatální a časné postnatální mozková ischemie jako jeden z možných příčinných faktorů schizofrenie	32
I.3.1. Definice a výskyt schizofrenie.....	32
I.3.2. Schizofrenie a mitochondriální dysfunkce	33
I.3.3. Význam mitochondriálního systému OXPHOS u schizofrenie	34
I.3.4. Dopaminová <i>versus</i> glutamátová hypotéza schizofrenie.....	35
I.3.5. Hypotéza nerovnováhy druhých posílů a metabolismus fosfatidylinositolu.....	36
I.3.6. Neurovývojová hypotéza schizofrenie	37
I.3.7. Porodní komplikace a jejich význam jako rizikového faktoru schizofrenie	40
II. CÍLE PRÁCE	42

III. MATERIÁL A METODY	43
III.1. Laboratorní zvířata	43
III.2. Dvouvaskulární model krátkodobé mozkové ischemie: operační protokol	43
III.3. Odběr vzorků krve a stanovení hodnot napětí krevních plynů.....	46
III.4. Stanovení hladin cAMP v krevní plazmě a IP₃ v krevních destičkách.....	47
III.5. Stanovení aktivity GGT v mozku a v krevní plazmě.....	48
III.6. Sledování sociálního chování mláďat a reakce potkana na nové prostředí v testu „volného pole“	49
III.6.1. Sledování hravého chování („social play behavior“).....	49
III.6.2. Studium reakce na nové prostředí (test „volného pole“).....	50
III.7. Měření akustické úlekové reakce a její prepulzní inhibice	51
III.8. Statistika	53
IV. VÝSLEDKY	53
IV.1. Napětí krevních plynů v krvi 12denních potkanů po 1 hodinové mozkové ischemii	53
IV.2. Ischemií navozené změny aktivity GGT v mozkové tkáni a v krevní plazmě potkana.....	54
IV.3. Hladiny cAMP a IP₃ v krvi 50denních potkanů po 1-hodinové neonatální ischemii mozku	56
IV.4. Změny chování způsobené neonatální ischemií.....	58
IV.4.1. Sociální chování 22. PND a důsledky neonatální ischemie.....	58
IV.4.2. Spontánní aktivita ve volném poli 35. PND a změny indukované ischemií	59
IV.4.3. Spontánní aktivita ve volném poli 50. PND a změny indukované ischemií	61
IV.5. Prepulzní inhibice akustické úlekové reakce a důsledky neonatální ischemie.....	63

V.	DISKUSE	66
V.1.	Napětí krevních plynů ve dvouvaskulárním modelu mozkové ischemie	66
V.2.	Charakteristika ischemického poškození mozku během vývoje prostřednictvím aktivity GGT	69
V.3.	Fosfoinositidový signální systém a cAMP jako ukazatelé neonatálního poškození mozku u schizofrenie	71
V.4.	Behaviorální charakteristiky neurovývojového modelu schizofrenie založeného na ischemickém poškození mozku	72
V.5.	Změny úlekové reakce a její prepulzní inhibice jako další charakteristika námi zvoleného animálního modelu schizofrenie	75
V.6.	Perinatální hypoxické poškození jako heuristický animální model schizofrenie	77
V.7.	Excitotoxické poškození vyvolané ischemií a jeho srovnání s účinkem NAAG a kyseliny chinolinové	78
VI.	ZÁVĚR	84
VII.	SEZNAM PUBLIKACÍ	84
VIII.	LITERATURA	87

I. ÚVOD

I.1. VÝZNAM KYSLÍKU V ORGANIZMU

Nepřetržitý přívod kyslíku (O_2) a odpovídající odstraňování oxidu uhličitého (CO_2) prostřednictvím krevní cirkulace má rozhodující význam pro zachování života jedince. Aerobní metabolismus je za normálních podmínek hlavním zdrojem energie pro mozek především dospělého jedince. Hodnota normálního průtoku krve mozkem („cerebral blood flow“; CBF) činí 45-60 ml/100 g tkáně/min a normální metabolický obrat kyslíku („cerebral metabolic rate of oxygen“; $CMRO_2$) odpovídá 1,3-1,8 $\mu\text{mol/g}$ tkáně/min. Přitom neurony jsou mnohem citlivější vůči nedostatečnému přívodu O_2 ve srovnání s buňkami glie, počínaje nejcitlivějšími oligodendrocyty přes astrocyty až po mikroglia. Pyramidové buňky hipokampu, Purkyňovy buňky mozečku, pyramidové neurony 3. a 5. vrstvy mozkové kůry představují na nedostatek O_2 nejcitlivěji reagující populace neuronů (Valkounová a spol., 2001).

I.1.1. Historické poznámky

Hlavní zásluhu na objevu kyslíku jako prvku mají Švéd Schiele a Angličan Priestly. Francouz Lavoisier definoval pojem „kyslík“ a stanovil jeho 20% podíl v atmosférickém vzduchu. Američan Little pak v roce 1862 objevil vztah mezi nedostatkem kyslíku a perinatálními komplikacemi jako je mozková obrna a s ní související mentální retardace (Valkounová a spol., 2001).

První námi nalezenou prací zabývající se experimentálním hypoxickým poškozením mozku potkana je práce autorů Yanta a spol. (1934), ve které popisují vliv prostředí s postupně klesajícím obsahem kyslíku na jeho chování. Všichni potkani uhynuli během 24-72 minut od začátku jeho poklesu. V oblastech mozkové kůry, hipokampu, mozkového kmene a míchy autoři prokázali chromatolýzu nervových buněk. Hicks

(1950) nechal po opakovaných apnoických pauzách potkany přežít 48 hodin a také pozoroval mikroskopická ložiska nekrózy v mozkové kůře, striátu a v substantia nigra, zatímco hipokampus zůstal nepoškozen. Naopak Levine (1960) v nově vypracovaném animálním modelu mozkové hypoxie u potkana prokázal nejen poškození mozkové kůry, talamu, striáta a čichové kůry, ale i hipokampu. V roce 1964 pak Hills popsal degenerativní změny v neuronech a edém endotelových buněk mozkových kapilár po 3-hodinové hypoxii a po 90 minutách pak edém astrocytárních výběžků za použití elektronového mikroskopu; podobné změny uvádějí i Brown a Brierley (1968).

I.1.2. Transport kyslíku a jeho spotřeba v dospělém organismu

Kyslík z vdechovaného vzduchu přestupuje z plicních alveolů do krve a z krevního řečiště difunduje do periferních tkání. V krvi se reverzibilně váže na hemoglobin, jehož afinitu vůči kyslíku vyjadřuje tzv. saturační křivka hemoglobinu. V plicním řečišti činí saturace krve kyslíkem 95-97 %, přičemž toto procento klesá úměrně s hodnotou jeho parciálního tlaku ve tkáních, takže ve smíšené venózní krvi dosahuje přibližně 46 %. Vlivem narůstající tvorby kyselých produktů látkové přeměny dochází ve funkčně aktivních orgánech k acidifikaci krve, která dále zvyšuje uvolňování O_2 z hemoglobinu mechanismem „Bohr-Haldanova efektu“. Tímto mechanismem může být v mozkové tkáni uvolněno až o 1/3 O_2 více než činí jeho klidová spotřeba (Zauner a spol., 2002).

Parciální tlak O_2 (pO_2) ve vzduchu je za normálních podmínek 21,1 kPa (158 mm Hg). Plicní ventilací dochází k výměně plynů mezi vdechovaným vzduchem a plicními sklípkami, v nichž pO_2 klesá na 14,3 kPa (107 mm Hg). Při takovém pO_2 je v plicních sklípcích zajištěna výše uvedená saturace hemoglobinu O_2 dosahující 95-97 %. K tomu je třeba, aby plicní ventilace udržela pO_2 v plicních sklípcích nad 13 kPa (100 mm Hg).

Celkový počet alveolů v plicích dospělého člověka je odhadován asi na 300 milionů o celkové vnitřní ploše 70-80 m². U novorozence je vytvořeno pouze 10 % z celkového počtu alveolů zjištěných u dospělých osob. To dokládá, že plicní „strom“ dozrává až po narození, přičemž teprve v deseti letech je dosaženo počtu a tvarové podoby plicních sklípků dospělého člověka.

Množství kyslíku, které prostupuje skrze alveolo-kapilární membránu, závisí na její tloušťce (normální průměr je 1,6 μm), na gradientu pO₂, ale také na dostatečném množství redukovaného hemoglobinu v erytrocytech. Při normální koncentraci hemoglobinu v krvi 130-150 g/l pak 1 litr krve obsahuje asi 200 ml O₂ vázaného na hemoglobin a asi 3 ml O₂ jsou rozpuštěny v krevní plazmě. Každou minutu tak krev do tkání přivádí asi 1 litr O₂ za předpokladu, že minutový srdeční výdej činí 5 litrů. Tato hodnota je 4x vyšší než objem O₂, který mozek spotřebovává za klidových podmínek. Při zvýšené aktivitě mozku se však spotřeba O₂ zvýší natolik, že napětí O₂ v nervové buňce se blíží tzv. „kritické“ hodnotě pO₂ v mitochondriích, která může být tak nízká v důsledku vysoké afinity cytochromu a-a₃ pro kyslík (asi 0,27-0,4 kPa). Ve většině tkání se však hodnoty pohybují v rozmezí 2,0-5,3 kPa (15-40 mmHg). Vzestup spotřeby O₂ vede k rychlému lokálnímu poklesu pO₂ v buňkách, což provází zvýšení gradientu pO₂ mezi kapilární krví a buňkami. Výsledkem poklesu pO₂ je zvýšená extrakce O₂ z hemoglobinu v erytrocytech.

I.1.3. Nedostatek kyslíku v organizmu

Termín *anoxie* označuje úplnou absenci kyslíku ve tkáních. Daleko častější formou nedostatku kyslíku je jeho dílčí nedostatek označovaný jako *hypoxie*. Tuto situaci je možné definovat jako snížení pO₂ ve tkáni, které neumožňuje zajistit buněčné funkce, včetně přeměny látek a udržení integrity buněčné struktury. Déle trávající, prolongovaná hypoxie vede k poklesu krevního tlaku s následným snížením CBF,

poklesem extracelulárního pH a ke zvýšení hladiny laktátu a dalších kyselých metabolitů vedoucí k intracelulární acidóze (Geddes a spol., 2001). Termín *asfyxie* označuje patologický stav, který vzniká v důsledku onemocnění respiračního systému a je provázen hypoxií, při které se současně hromadí CO₂ v krvi a ve tkáních. Změny provázející nedostatek kyslíku v mozku vykazují typický časový průběh. Již během prvních 10 - 20 sekund klesá koncentrace ATP a současně stoupají hladiny ADP a AMP a následně rychle vzrůstá spotřeba glukózy v mozkových buňkách. Přitom mezi 3 hlavní příčiny nedostatku O₂ v organismu patří:

1. Snížení pO₂ ve vdechovaném vzduchu;
2. Poškození přenašeče O₂ a
3. Porucha v uvolňování O₂.

Již v roce 1920 Barcroft rozlišoval mezi čtyřmi typy hypoxie: hypoxickou, anemickou, stagnační a histotoxickou. U hypoxické hypoxie je nedostatek kyslíku ve vdechovaném vzduchu. Příčinou anemické (transportní) hypoxie je pokles množství hemoglobinu schopného přenášet O₂. Ke stagnační hypoxii dochází v důsledku snížení krevního průtoku a konečně histotoxická hypoxie je výsledkem poklesu utilizace O₂. Důvody, které vedou k rozvoji hypoxie v organismu jsou podle Nečase (1982) následující:

1. Pokles nebo porucha alveolární ventilace;
2. Porucha difuze O₂ skrze alveolo-kapilární membránu (snížení difuzní kapacity plic nebo prodloužení trvání difuze v důsledku zesílení alveolární stěny);
3. Narušení vzájemného vztahu mezi alveolární ventilací a kapilární perfuzí;
4. Levo - pravostranný zkrat, kdy část krve neprotéká skrze plicní kapilární řečiště;
5. Malý minutový objem srdeční;
6. Nedostatečnost krevního průtoku některými oblastmi systémové cirkulace;

7. Deficit hemoglobinu;
8. Inaktivace části hemoglobinu (např. karboxyhemoglobin, methemoglobin);
9. Pokles afinity erytrocytů vůči O₂;
10. Poruchy mikrocirkulace (redukce kapilárního povrchu, zvětšení mezikapilární vzdálenosti, arteriovenózní zkraty);
11. Pokles difuze O₂ směrem do tkáně;
12. Zvýšení požadavku na dodávku O₂;
13. Porucha metabolické utilizace O₂ vlivem toxických látek.

Podle intenzity rozlišujeme 4 stupně hypoxie od mírné funkční po kompletní nedostatek kyslíku ve tkáni, tedy anoxii. (1) Funkční hypoxie představuje nejmírnější formu nedostatku O₂, při níž je organismus schopen zajistit homeostázu souborem reflexně-humorálních dějů. (2) Metabolická hypoxie je mírný stupeň kyslíkového deficitu s poklesem pO₂ a celkové dodávky O₂ do mozku. Organismus není schopen udržet homeostázu, avšak metabolické změny nejsou doprovázeny změnami strukturálními. Za těžkou formu je považována (3) destruktivní hypoxie, při níž klesá energetický metabolismus nervové buňky pod hranici nezbytnou k udržení jejího života; dochází ke strukturálním změnám. (4) Anoxie jako nejtěžší stupeň hypoxie je souborem funkčních, metabolických a strukturálních změn, které se rozvíjejí velmi rychle a vedou k zániku nervových buněk, především neuronů.

I.1.4. Hypoxie lidského plodu a novorozence

Srovnáme-li novorozeneckou mortalitu do 28 dnů v ČR v roce 1969, která činila 15,1 novorozence/1000 narozených dětí, se statistickými údaji z roku 2000, zjistíme její významný pokles na 2,5 úmrtí na stejný počet narozených dětí. V sousedním Rakousku činila v tomtéž roce tato hodnota 3,3/1000, v Německu 2,8/1000 a na Slovensku 5,4/1000.

V rámci perinatální asfyxie se mozková hypoxie významně podílí na vzniku neprogresivních neurologických deficitů u dětí včetně mentální retardace, záchvatových stavů, rozvoje spasticity, choreoatetózy a ataxie, a předpokládá se, že je také rizikovým faktorem u některých neuropsychiatrických onemocnění, např. u schizofrenie. Pro tato onemocnění může nastat primární porucha přenosu O_2 z matky na plod poklesem dodávky kyslíku do placenty nebo poškozením fetoplacentárního oběhu. Příčiny fetální hypoxie se liší podle místa poškození ve vzájemně propojeném systému plod-matka.

Mezi faktory, které ovlivňují přežití v rámci intrauterinní hypoxie, patří množství energetických substrátů (především glukózy uvolněné z buněčného glykogenu), adekvátní množství hemoglobinu a řídicí aktivita retikulární formace mozkového kmene jako limitujícího faktoru. Epizody prolongované asfyxie vedou k poškození mozku, které se může podobat ložiskovému ischemickému poškození mozku dospělého člověka. Přitom se za hlavní příčiny perinatální hypoxie považuje:

1. Pokles pO_2 v mateřském organismu může být:
 - a) aerogenní, díky nízkému pO_2 v prostředí, plicnímu poškození či inhalační narkóze;
 - b) anemický, z důvodu velké krevní ztráty;
 - c) v důsledku vysoké spotřeby O_2 díky intenzivní děložní aktivitě během druhé doby porodní.
2. Porucha kyslíkového přenosu skrze placentární bariéru:
 - a) poškození uteroplacentární cirkulace v důsledku kardiální insuficience matky, kolapsu, aterosklerózy či cévního spasmu;
 - b) poškození difuze v důsledku degenerace placentárních klků;
 - c) poškození fetoplacentárního oběhu z důvodu poranění pupečnickové šňůry, spasmu pupečnickových cév nebo poklesu systémového tlaku krve u plodu.

3. Poškození kyslíkového transportu u plodu a novorozence z důvodu krvácení, srdeční malformace, nebo erythroblastosis fetalis.
4. Poškození dýchací soustavy novorozence (např. plicní hypoplasie, syndrom dechové tísně novorozenců („respiratory distress syndrome“- RDS)) nebo poškození neuronů mozkového kmene.

Termínem perinatální hypoxicko-ischemická encefalopatie označujeme klinický syndrom, který se vyvine po akutním přerušení fetoplacentárního oběhu nebo je důsledkem kardiopulmonálního selhání novorozence (Vannucci, 1990; Hill, 1991; Carter a spol., 1993; Avery a spol., 1994). Vzniklá akutní novorozenecká encefalopatie musí splňovat 3 obecná kritéria stanovení diagnózy: výskyt asfyktického inzultu během porodu nebo při narození, přítomnost neurologických příznaků v časném postnatálním období a přidružená orgánová postižení (např. akutní renální tubulární nekróza, oligurie nebo anurie, kardiální dysfunkce či perzistující plicní hypertenze). Vlastní neurologické příznaky lze podle Sarnat a Sarnat (1976) rozdělit do tří kategorií:

- (1) zvýšená záchvatová pohotovost, pokles spontánní motorické aktivity a aktivace sympatiku trvající méně než 24 hodin při normálním elektroencefalogramu (EEG);
- (2) generalizovaná svalová hypotonie, víceložiskové záchvaty s patologickým EEG;
- (3) stupor s poklesem svalového napětí, snížení aktivity vitálních center v mozkovém kmene a potlačení autonomních funkcí s výrazně abnormálním EEG.

Nezralý mozek novorozence vykazuje vysokou odolnost vůči hypoxickému poškození, což je vysvětlováno řadou změn, které souhrnně označujeme jako „adaptační metabolická reakce“. Základem této adaptace jsou metabolické změny, zatímco změny funkční nebo neuroendokrinní ustupují do pozadí (Trojan a Šťastný, 1988). Tato reakce je charakterizována zvýšeným využitím glykogenu jako hlavní energetické rezervy, posunem energetického metabolismu k anaerobní glykolýze, zvýšenou aktivitou klíčových enzymů a udržením aminokyselinového a glukózového

metabolismu ve vzájemném poměru. Přitom anaerobní glykolýza představuje pro migrující neurony primární zdroj energie. Tyto neurony jsou v úzkém kontaktu s buňkami radiální glie, která obsahuje „rezervní“ granula glykogenu, jež mají zásadní význam v tzv. „energetickém koridoru“. Není však stále plně vysvětleno jakým mechanismem probíhá transport glukózy a laktátu při přestupu z gliových buněk do migrujících neuronů (Evrard, 2001).

I.1.5. Experimentální hypoxie

Mozek savců, včetně potkana, je velmi citlivý k jakékoliv formě hypoxie. Přitom odolnost vůči stagnační hypoxii je u potkana nejvyšší při narození. V prvních dvou týdnech po narození potkana tato odolnost postupně klesá a minima dosáhne v období odstavu mezi 22. – 28. PND. K malému vzestupu odolnosti dochází asi od 40. postnatálního dne, tj. po dosažení pohlavní dospělosti (Jílek, 1957). Jedním z charakteristických následků mozkové hypoxie jsou záchvaty křečí. Jejich vznik byl přisuzován zvýšené dráždivosti podkorových center v důsledku vyřazení mozkové kůry (Jílek, 1966), i když pozdější nálezy přinášejí doklady pro složitější vysvětlení.

K objasnění základních buněčných a molekulárních mechanismů zodpovědných za perinatální hypoxicko-ischemické poškození mozku přispívají také animální modely (Evrard, 2001). Práce Rice a spol. (1981) ukázala, že jednostranný podvaz společné krkavice, provázený 3,5-hodinovou inhalací směsi kyslíku s dusíkem v poměru 8 : 92, přežilo 79 % 7denních potkaních mláďat. Ischémií navozené morfologické změny byly prokázány ve stejnostranné mozkové kůře, striátu a hipokampu u 90 % mláďat, která tuto hypoxicko-ischemickou epizodu přežila. Významné zvýšení obsahu vody v ischemických oblastech svědčilo pro vznik edému mozku. Práce současně prokázala překvapivě vysokou citlivost bílé hmoty mozku potkana vůči hypoxii.

Fischer a spol. (1974) ukázali, že intermitentní prolongovaná hypoxie v časném

postnatálním období potkana ovlivňuje vývoj mozkové kůry, přičemž jednotlivé vrstvy jsou postiženy rozdílně. U 25denních mláďat hypoxie způsobila snížení tloušťky mozkové kůry, ale zvětšila denzitu neuronů na objemovou jednotku v I., II., V. a VI. vrstvě mozkové kůry. Současně byl však pozorován úbytek neuronů v oblasti hilu gyrus dentatus (Langmeier a spol., 1998). V hipokampu vyvolalo hypoxické poškození úbytek dendritické arborizace neuronů (Pokorný a Trojan, 1986). Fischer a spol. (1980) popsali významné zpomalení vývoje synapsí ve vybraných oblastech mozkové kůry u mláďat vystavených hypoxii. Současně Langmeier a spol. (1987) prokázali zpoždění procesu myelinizace v oblasti mozolnatého tělesa (corpus callosum).

Při srovnání 12denních potkanů s dospělými jedinci byla prokázána také řada biochemických změn. Nezralá mozková tkáň u ischemizovaných 12denních mláďat byla schopna zvýšit intenzitu anaerobní glykolýzy s využitím glykogenu jako hlavního energetického zdroje. Současně se u těchto mláďat zvýšila hladina laktátu o 140 % (Krulich a spol., 1962). Tomu odpovídalo zvýšení aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) a změnila se i aktivita sukcinátdehydrogenázy (SDH). V porovnání s dospělými jedinci nebyly proto u těchto mláďat po 4-hodinovém oboustranném karotickém uzávěru pozorovány významné změny v hladinách ATP ani ADP. Z neuromediátorů se u mláďat snížila koncentrace aspartátu, ale významně se zvýšila hladina GABA v některých oblastech jejich mozku. Obsah nukleových kyselin a bílkovin však vlivem hypoxie zůstal u těchto mláďat nezměněn (Jílek a spol., 1967).

I.1.6. Vývojové změny CNS u člověka / zvířete a indikátory jeho poškození

Savčí mláďata jsou buď bezprostředně závislá na mateřské péči zahrnující výživu, termoregulaci a vylučování (např. potkan) nebo se po porodu dokáží vyrovnat s vlivy prostředí samostatně (např. morče). Vše závisí na stupni vývoje organismu a jeho CNS v okamžiku porodu.

Změny, které provázejí první etapu vývoje savců, zejména pak vyšší podíl anaerobního metabolismu u nejmladších jedinců, vysvětlují jejich vyšší odolnost proti ischemii, hypoxii nebo i anoxii. Charakteristickým rysem etapy samostatné existence je přechod mláďat od výživy mateřským mlékem k samostatnému vyhledávání a příjmu potravy (Křeček, 1962), který může trvat několik týdnů (potkan), ba i několik měsíců (člověk). Toto období se vyznačuje vysokým stupněm vulnerability mozku v důsledku intenzivní přeměny látek v něm probíhající. Proto je mozek zvýšeně citlivý na změny prostředí, včetně nedostatku O₂.

Následující tabulka srovnává časové intervaly v jednotlivých vývojových etapách potkana a člověka.

Tabulka 1. *Vývojové etapy CNS laboratorního potkana a člověka*

I. Období závislosti na matce	
a) období buněčného dělení	potkan: intrauterinní vývoj – 21 dnů hmotnost mozku 0,25 g
	člověk: intrauterinní vývoj – do 210 dnů hmotnost mozku 120 g
b) růst buněk, axonů, dendritů (etapa dozrávání nižších oblastí CNS)	potkan: od narození do 10. dne života hmotnost mozku 0,86 g
	člověk: od 210. dne do porodu hmotnost mozku 250 g
c) růst buněk – myelinizace (etapa dozrávání vyšších oblastí CNS)	potkan: 10. – 20. den hmotnost mozku 1,28 g
	člověk: od narození do 120. dne života hmotnost mozku 550 g
II. Období samostatného života	
dokončení myelinizace, pomalý růst	potkan: od 20. dne do dospělosti hmotnost mozku 1,67 g
	člověk: od 5 měsíců až do dospělosti hmotnost mozku 1400 g

(upraveno podle McIlwaina, 1959)

Z výše uvedené tabulky, stejně jako z dalších prací (Dobbing a Sands, 1973; Romijn a spol, 1991) je patrné, že mozek lidského novorozence je možné přirovnat k mozku jedenácti až dvanáctidenního potkana. Tohoto poznatku jsme využili při volbě

věku mláďat potkana v animálním modelování psychóze podobných změn.

I.1.7. Indikátory ischemického poškození mozku: Aktivita gamaglutamyltranspeptidázy

Ischemicko-hypoxická epizoda, jednorázová nebo opakovaná, způsobuje dlouhodobé změny nejen v hladinách cholesterolu a dalších ukazatelů lipidového metabolismu (Tomášová a spol., 1987), ale také v aktivitách některých enzymů, např. gama-glutamyltranspeptidázy (GGT) nebo xantinoxidázy (XOD), jak to dokládají práce Šťastný a spol. (1985) a Štípek a spol. (1989). Stanovení aktivity uvedených enzymů může mít nejen diagnostický, ale i prognostický význam. V případě aktivity GGT je rozlišována její solubilní, v plazmě přítomná forma, a forma membránově-vázaná. Zatímco akutní hypoxie způsobila významné zvýšení aktivity membránově vázané GGT v některých podkorových oblastech vyvíjejícího se potkana, aktivita solubilní formy zůstala nezměněna jak v krevní plazmě, tak i v mozkomíšním moku (CSF). Naproti tomu opakovaná hypoxie aktivitu membránové formy významně snížila pouze v mozkové kůře a aktivita solubilní GGT byla významně vyšší než u kontrolních potkaních mláďat 18. PND (Šťastný a spol., 1985). Autoři zjistili, že současně se tímto vzestupem GGT v plazmě významně poklesla aktivita membránově vázané GGT v jaterní tkáni po opakované hypobarické hypoxii. To vedlo k závěru, že za zvýšení solubilní formy GGT v krevní plazmě může odpovídat především jaterní tkáň, zatímco za zvýšení této formy enzymu v CSF tkáň mozková. Dospělá zvířata však změny v aktivitě solubilní formy GGT již nevykazovala a to ani ve skupině samců, ani samic za 3 měsíce po neonatální (opakované) hypobarické hypoxii, ale u samic byla aktivita její membránově vázané formy významně nižší, a to ve všech sledovaných oblastech mozku, v porovnání se stejně starými dospělými samci (Šťastný a spol., 1985). Změny aktivity GGT, především její membránově vázané formy, by proto mohly být použity

jako „marker“ mozkového poškození, a to jak nervových buněk, tak především mozkových kapilár (Šťastný a spol., 1997). Tento předpoklad vychází ze skutečnosti, že aktivita membránově vázané GGT v endotelových buňkách mozkových kapilár je o jeden řád vyšší než aktivita v tělech neuronů nebo ve frakci gliových buněk (Lisý a spol., 1983; Šťastný a spol., 1997; Šťastný a spol., 2004).

I.1.8. Indikátory ischemického poškození mozku: hladiny druhých poslů - cAMP a IP₃

Mozkovou ischémii, ale také infekční a neurodegenerativní procesy v mozku provázejí změny aktivity některých enzymů odpovědných za hladiny druhých poslů, cAMP a IP₃, v intersticiální či nitrobuněčné tekutině mozku nebo i v plazmatickém subkompartmentu tělních tekutin. Přitom cAMP se považuje nejen za druhého nitrobuněčného posla, ale také za prvního posla s funkcí hormonu, humorálního faktoru či neuropřenašeče, koordinujícího mozkové funkce (Bankir a spol., 2002).

Navázání signální molekuly s funkcí prvního posla na příslušný receptor aktivuje signální kaskádu, která v případě adenylátcyklázy vede ke tvorbě cAMP z ATP. Někteří autoři uvádějí, že mozková ischémie zvyšuje hladiny cAMP v intersticiální tekutině bazálních ganglií mechanismem, který vykazuje dopaminovou (DA) – dependenci (Prado a spol., 1992). Další studie ukázaly, že vazebná schopnost cAMP k příslušné proteinkináze se vlivem krátkodobé mozkové ischémie významně sníží a to jak v oblasti bazálních ganglií, tak v mozkové kůře. Blomqvist a spol. (1985) pozorovali výrazný pokles koncentrace cAMP v mozkové kůře v důsledku ischémie trvající 15 minut. Během obnovování průtoku krve mozkem se koncentrace cAMP zvýšila jak v mozkové kůře, tak v hipokampální oblasti, ale po 60 minutách se její hodnota nelišila od kontrolních zvířat. Mozková ischémie tedy na jedné straně výrazně zasáhne transdukcii zprostředkovanou signální molekulou cAMP, na druhé straně

v oblastech nepoškozených ischemií obnoví CBF významně zvyšuje vazebnou kapacitu cAMP-dependentní proteinkinázy (PKA). To by mohl být mechanismus, který by umožnil vysvětlit neuroprotektivní účinky cAMP (Tanaka a spol., 1999).

Krátkodobá mozková ischemie vede k neuronálnímu poškození a zániku neuronů, a to především v CA1 podoblasti hipokampu, jehož charakter se mění v průběhu postnatálního vývoje mozku. Kromě změn v mozkové koncentraci cAMP byly pozorovány i změny v hladinách inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP₃), které vykazují závislost jak na době trvání ischemie, tak i oblasti, která byla postižena (Araki a spol., 1993).

Druhý z uvedených „poslů“, IP₃, společně s tvořícím se diacylglycerolem (DG) patří k hlavním produktům fosfatidylinositolové hydrolýzy, která je první událostí, jež nastane po aktivaci příslušného receptoru v buňce. Zatímco IP₃ má důležitou funkci jako 2. posel při mobilizaci Ca²⁺ z nitrobuněčných zásob, DG aktivuje proteinkinázu C (PKC). IP₃ je v konečné fázi metabolizován na inositol a ten může být znovu použit pro syntézu fosfatidylinositolu (PI). DG je fosforylován na kyselinu fosfatidovou, která vykazuje jistou míru toxicity, a proto je rychle přeměněna opět na fosfatidylinositol za vzniku meziprojektu cystin-difosfo-diacylglycerolu (Kaiya, 1992).

Změny v hladinách cAMP a IP₃ jsou považovány za biologický ukazatel schizofrenie a ischemicko-hypoxické poškození je z hlediska neurovývojové hypotézy předpokládaným vnějším rizikovým faktorem tohoto onemocnění. Rozhodli jsme proto studovat změny koncentrace obou těchto druhých poslů v našem heuristickém modelu s cílem ověřit, zda krátkodobé omezení přívodu krve do mozku neonatálního potkana 12. PND může zanechat dlouhodobé změny v koncentraci cAMP v krevní plazmě a IP₃ v trombocytech, které by bylo možné prokázat u dospělých potkanů 50. PND.

I.1.9. Změny chování dospívajícího potkana po neonatální ischemii mozku

Změny chování, které vznikají v důsledku mozkové ischemie v průběhu časného ontogenetického vývoje potkana, je možné pozorovat jak u mláďat, tak u dospělých jedinců. S přibývajícím věkem klesá plasticita mozku, mění se senzitivita receptorů a hladiny jednotlivých neuropřenašečů. Změny chování proto provází často zhoršení prostorové paměti. Současně jsou dospělí potkani méně aktivní a ve srovnání s mláďaty nenavazují tak časté kontakty s ostatními jedinci. Společenské interakce 3,5 týdne po uzávěru a. cerebri media se v souvislosti s věkem mění ve většině sledovaných parametrech. Obzvláště u dospívajících potkanů jsou tyto změny statisticky významné (Andersen a spol., 1998).

Pro hodnocení stupně neurologického postižení u potkana je možné použít škály podle Tupper a Wallace (1980). Jedná se o standardní protokol hodnotící rovnováhu, úchopový a vzpřimovací reflex, místní reakce, pohyblivost zvířete, flexi předních končetin a rotaci hrudníku. Wahl a spol. (1992) prokázali nižší celkové skóre u dospělých samců s ischemickým poškozením oproti kontrolním zvířatům, což svědčí pro vznik neurologického deficitu, který byl nejzřetelnější 1. den po ischemické epizodě. Latence odpovědi v retenčním testu byla po uzávěru střední mozkové tepny zkrácena, zatímco nebyly pozorovány významné změny v chování potkana v Y bludišti, ani v testu „volného pole“ („open field test“). Typickým projevem byly „barelové rotace“ či „válení se“ (tzv. rolling behavior), které bylo pozorováno 3-4 hodiny po uzávěru a. cerebri media. Tato skutečnost s velkou pravděpodobností souvisí s poškozením striáta (podobné projevy byly totiž pozorovány i po intrastriatální injekci kyseliny chinolinové nebo při zvýšené stimulaci DA receptorů nebo výdeji dopaminu). Explorační aktivita ani pozornost se u ischemizovaných potkanů nezměnila. Balduini a spol. (2000) prokázali, že důsledkem mozkové ischemie novorozeného potkana jsou nejen změny pohybové koordinace a spontánní aktivity v dospělosti, nýbrž také

narušení procesu učení a poruchy paměti.

Při systémovém podání glutamátu mláďatům hlodavců a primátů vznikají excitotoxické léze v těch oblastech mozku, kde není přítomna hematoencefalická bariéra (např. area postrema nebo jádra hypothalamu). Edematózní změny nebo nekrózy neuronů lze nalézt již 4 hodiny po jeho nitrožilní aplikaci (Bittigau a Ikonomidou, 1997). Podobné změny byly prokázány u přechodného hypoxicko-ischemického nebo traumatického poškození mozku potkana v 1.-2. týdnu po narození (McDonald, 1989). Fenomén tzv. NMDA receptorové hypersenzitivity ve vyvíjejícím se mozku současně vysvětluje vysokou účinnost podaných antagonistů NMDA receptorů jako neuroprotektivních látek u úrazového či hypoxicko-ischemického poškození mozku dětí (Olney, 1991).

I.2. ANIMÁLNÍ MODELY MOZKOVÉ ISCHÉMIE

I.2.1. Anatomické odlišnosti cévního zásobení mozku potkana a člověka

Asi 2 mm distálně od větvení vnitřní a zevní krkavice odstupuje arteria pterygopalatina (o průměru 0,53 mm), původně Tandlerem (1899) pojmenována jako a. stapedia. U potkana je obvykle plně vyvinutá a její průměr je srovnatelný s průměrem vnitřní krkavice. U člověka se naopak jedná o nekonstantní, rudimentární cévu.

Obě aa. vertebrales (o průměru 0,34 mm) odstupují z podklíčkových tepen potkana, probíhají transverzálním kanálem a skrze velký týlní otvor (foramen occipitale magnum) vstupují do nitrolebního prostoru, kde se spojují v a. basilaris (o průměru 0,36 mm), jejíž terminální zakončení, na rozdíl od člověka, představují dvě aa. cerebellares superiores (o průměru 0,28 mm). Z těchto tepen vycházejí v různých anatomických variantách zadní mozkové tepny (aa. cerebri posteriores).

Na rozdíl od člověka je a. communicans posterior u potkana svojí velikostí srovnatelná se střední nebo přední mozkovou tepnou. Vytváří spojku se zadní

mozkovou tepnou (a. cerebri posterior), která přivádí do mozkového řečiště více krve než u člověka. U potkana a. communicans anterior zcela nahrazuje tzv. a. azygos cerebri anterior, která vzniká spojením obou předních mozkových tepen. A. olfactoria je u potkana velkou větví přední mozkové tepny, která perzistuje u lidského embrya, ale v dospělosti ji nahradí a. ethmoidalis. A. ophthalmica interna je větví vnitřní krkavice, která u potkana zásobuje oko a očníci. Ve srovnání s člověkem však v menším rozsahu. U potkana je tato oblast zásobena hlavně z a. ophthalmica externa. Střední mozková tepna (a. cerebri media) a přední mozková tepna (a. cerebri anterior) jsou u potkana konečnými větvemi vnitřní krkavice. A. cerebri media (0,24 mm v průměru) u potkana vysílá několik větví k piriformní kůře a drobné kortikostriální tepny. Tyto cévy jsou ekvivalentem lentikulostriálních tepen u člověka (Scremin, 1995).

Je zřejmé, že anatomické vztahy cévního zásobení mozku u potkana se podobají mozkovému oběhu člověka. I přes velkou podobnost, jsou však existující anatomické rozdíly příčinou toho, že animální modely mozkové ischemie přinášejí dílčí odlišnosti v porovnání s mozkovou ischemií u člověka.

I.2.2. Animální modely mozkové ischemie: globální a fokální omezení přívodu krve do mozku

Na základě literárních údajů lze animální modely mozkové ischemie rozdělit podle rozsahu a charakteru poškození na dvě velké skupiny: modely globální ischemie a modely ložiskové (fokální) ischemie.

I.2.2.1. Modely globální ischemie

Tuto skupinu modelů mozkové ischemie reprezentují především následující animální modely:

Hypoxicko-ischemický model

Tento model byl poprvé popsán Levinem v roce 1960. Jedná se o kombinaci

jednostranného uzávěru společné krkavice a pobytu zvířete v anoxickém prostředí po dobu 45 minut. Metoda je pro svoji technickou jednoduchost používána i dnes. Nejedná se však o prostou ischemii mozku.

Model kompresivní ischemie

Ljunggren a spol. (1974) nebo Yoshida a spol. (1985) dosáhli globální mozkové ischemie u potkana infuzí arteficiálního mozkomíšního moku (CSF) do cisterna magna. Cílem bylo zvýšit nitrolební tlak o 20-70 mm Hg nad hodnotu systémového krevního tlaku. Tento postup různí autoři kombinují s oboustranným uzávěrem (Yoshida a spol., 1985), nebo s jednostranným uzávěrem společné krkavice, přičemž se jim podařilo snížit průtok krve mozkiem o 85-90 % (Busto a spol., 1989).

Turniketový a dekapitační model ischemie

Turniketový model je označení neinvazivní metody ovlivnění krevního průtoku, kterou popsali Siemkowitz a Hansen v r. 1978. Její předností je možnost ovlivnit krevní průtok různými hodnotami tlaku v nafukované manžetě, což vede k různému stupni ischemie.

Mezi technicky nejsnadnější metody patří globální (anoxický) model navozený dekapitací zvířete (Schreiber a spol., 1987), jehož modifikací je arteficiální zástava srdce (Mossakowski a spol., 1994).

Čtyřvaskulární model

Model popsali Pulsinelli a Brierley již v r. 1979. Po obnažení prvního krčního obratle autoři elektrokauterizovali obě obratlové tepny uvnitř vertebrálního kanálu. Po 24 hodinách pak trvale nebo dočasně podvázali obě společné krkavice. Autory uvedená 8% mortalita byla důsledkem dechové zástavy během prvních 2-3 minut po podvazu.

Pulsinelliho metoda snížila průtok krve v oblastech frontální a parietální mozkové kůry, striáta a hipokampu na 3 % původní hodnoty. V diencephalu, mozečku a v mozkovém kmeni se následně snížil průtok krve na 10-30 % ve srovnání s kontrolními hodnotami (Pulsinelli a spol., 1983).

I.2.2.2. Modely fokální ischemie

Dvouvaskulární model ischemie

Jedná se o modifikaci modelu, který popsal Smith se spolupracovníky (1984). Částečným vykrvácením prostřednictvím kanyly zavedené do ocasní tepny se podařilo snížit hodnotu arteriálního tlaku krve na 45-50 mmHg, přičemž obě společné krkavice se podvázaly nebo klipovali. Experimentální protokol se ukončil odstraněním ligatur či klipů a reinfuzí odebrané krve. Ischemie by v tomto případě neměla trvat déle než 15 minut jinak hrozí zhroucení průtoku krve mozkem (Cregan a spol., 1997). Iwasaki a spol. (1989) proto použili tento model bez systémové hypotenze. Rozsah ischemického poškození závisel na délce trvání tepenného uzávěru. Mortalita výrazně stoupala od druhé hodiny po uzávěru a průtok krve mozkem se snížil o více jak polovinu již v 10. minutě po podvazu. Tato skutečnost nás vedla k tomu, že jsme později dobu uzávěru karotid zkrátili na jednu hodinu, přestože jsme pracovali s 12denními potkaními mláďaty.

Uehara a spol. (1999) popsali dvouvaskulární model u pětidenních potkaních mláďat a zjistili, že nejvíce histopatologických změn bylo v bílé hmotě capsula interna. Na rozdíl od dospělých bylo ischemické poškození mláďat patrné až 2. den po oboustranném tepenném uzávěru. Model se ve své modifikaci stal součástí našeho experimentálního protokolu.

Trojvaskulární model podle Hiramatsu

Model dočasné ložiskové ischemie popsal Hiramatsu a spol. (1993). Z asi 1,5 cm dlouhého řezu nad levým zygomatickým obloukem provedli levostrannou temporobazální kraniotomii, přičemž na a. cerebri media přiložili mikrokclip. Nakonec pevně ligovali obě společné krkavice. Tento model nebyl zatížen vysokou mortalitou a velikost vzniklého mozkového infarktu se příliš neměnila v závislosti na délce uzávěru. Původní práce porovnávala 3 skupiny rozdělené podle doby trvání dočasné ložiskové ischemie od 1 do 3 hodin.

Proximální jednostranný uzávěr arteria cerebri media podle Tamury

Tento model je založen na trvalém uzávěru střední mozkové tepny u potkana (Tamura a spol., 1981). Jednostranný uzávěr střední mozkové tepny trvajících 60 minut provázal nejen nekrotický zánik malých skupin neuronů, ale i makroskopicky zřetelná infarktová ložiska (Siesjö, 1992). Tamura však uvedl, že u tohoto modelu nenašli významný rozdíl v hodnotách krevních plynů, pH krve ani středního arteriálního tlaku v porovnání s kontrolními zvířaty. Waltz (1979) poukázal na podobnost mezi proximálním uzávěrem arteria cerebri media a masivní, nejspíše fatální, ischemickou příhodou u člověka.

Jednostranný uzávěr a. cerebri media užitím intraluminálního vlákna

Metodu popsal a do praxe zavedl Koizumi se spolupracovníky v r. 1986. Nagasawa a Kogure (1989) pak charakterizovali histologický obraz poškození u tohoto modelu v souvislosti se změnami krevního průtoku mozku. Longa a spol. (1989) modifikoval tuto metodu odlišnou technologií přípravy vlákna (Longa konec vlákna tepelně upravil; Koizumi potáhl jeho konec silikonem). Nespornou výhodou tohoto modelu je možnost vyřazení střední mozkové tepny na přesně stanovenou dobu bez

kraniotomie.

Jako spolehlivější se ukázala právě Koizumihova varianta, neboť silikonem potažené vlákno lépe těsnilo a minimalizovalo možnost perforace cévní stěny (Laing a spol., 1993). Jak je uvedeno v tabulce č. 2, po zavedení vlákna do a.cerebri media poklesne průtok krve některými oblastmi mozkové kůry na méně než 15 % původní hodnoty. Letalita během 48 hodin dosáhla až 92,7 %, přičemž k nejvíce poškozeným oblastem patřila frontoparietální kůra. Cílený uzávěr a. cerebri media je však jen výjimečně pozorován u novorozenců, a proto nebyl součástí experimentálního protokolu.

Tabulka 2. Regionální mozkový průtok u potkana v modelu jednostranného uzávěru a. cerebri media intraluminálním vláknem.

Oblast mozku	kontroly	Uzávěr			Uzávěr a reperfuze	
		1 hod	2 hod	3 hod	1+2 hod	3+3 hod
stejnostranná						
FrPaM	1,58±0,25	0,94±0,10*	0,88±0,04*	0,75±0,19*	1,78±0,22	0,56±0,03!
FrPaSS	1,42±0,21	0,19±0,08*	0,09±0,04*	0,08±0,06*	0,96±0,22!	1,56±0,18
CPu(L)	1,62±0,19	0,04±0,02*	0,03±0,02*	0,02±0,01*	0,97±0,18!	1,33±0,15
CPu(M)	1,53±0,14	0,62±0,15*	0,53±0,10*	0,49±0,14*	1,35±0,10	0,77±0,12!
druhostranná						
FrPaM	1,54±0,22	1,49±0,15	1,43±0,23	1,52±0,25	1,83±0,19	1,44±0,15
FrPaSS	1,39±0,19	1,69±0,16	1,59±0,22	1,17±0,20	1,88±0,17	1,42±0,18
CPu(L)	1,65±0,17	1,63±0,12	1,65±0,17	1,31±0,23	1,77±0,22	1,41±0,21
CPu(M)	1,55±0,12	1,73±0,13	1,60±0,18	1,42±0,16	1,76±0,13	1,46±0,19

* $p < 0,01$ v porovnání s kontrolami; ! $p < 0,01$ v porovnání s kontrolami a dalšími hodnotami skupiny uzávěr a reperfuze FrPaM (frontoparietální kůra, motorická oblast), FrPaSS, frontoparietální kůra, somatosenzorická oblast; CPu(L), laterální část komplexu caudatus-putamen; CPu(M), mediální část komplexu caudatus-putamen. Hodnoty jsou uváděny v jednotkách ml/g tkáně/min (podle Nagasawa, Kogure, 1989).

Ischemického poškození mozku lze dosáhnout také použitím světelného paprsku o vlnové délce 520 - 570 nm zaměřeného na oblast průběhu a. cerebri media, je-li několik minut před touto procedurou zvířatům do žíly infundována bengálská červeň. Důsledkem ozáření je peroxidace lipidů v membránách endotelových buněk, která způsobí postupné vytvoření intraluminální trombózy. Velikost vznikající léze je možné ovlivnit intenzitou nebo délkou expozice osvitů a dávkou bengálské červeně (Watson a spol., 1985; Nakayama a spol., 1988; Koroleva a spol., 1998).

Embolizační modely

Patří mezi jednoduché metody, protože nevyžadují kraniotomii. Nevýhodou je skutečnost, že nelze zcela přesně vymezit rozsah a lokalizaci poškození. K embolizaci lze použít velmi malé (menší než 100 μm) fragmenty homologních krevních sraženin nebo karbonové či silikonové mikrokuličky do průměru 35 μm (Kaneko a spol., 1985; Overgaard a spol., 1992).

Endothelinový model mozkové ischemie

Model je ve srovnání s operační metodou dle Tamury a spol. (1981) jednodušší. Výsledná distribuce infarktového ložiska je téměř stejná jako u operačního uzávěru a. cerebri media. Pokles hodnoty regionálního průtoku krve je zobrazen v následující tabulce.

Tabulka 3. Regionální mozkový průtok krve mozkem potkana (rCBF) po uzávěru a. cerebri media a po podání endothelinu E-1.

Vzorky mozkové tkáně (skupiny)	Ischemická m.kůra		Kontralaterální m.kůra		Pons	
	kontrola	E-1(100 nM)	kontrola	E-1(100 nM)	kontrola	E-1(100 nM)
rCBF(ml/100g/min)	53±18***	49±15***	94±23	98±24	132±40	133±45

* významný rozdíl v porovnání s hodnotami CBF v kontralaterální mozkové kůře;
 ** významný rozdíl hodnot při srovnání s hodnotami CBF pontu. E-1, endothelin-1;
 Kontrola ve skupině ischemické mozkové kůry, potkani s uzávěrem ACM; Kontrola ve skupině kontralaterální mozkové kůry, potkani s normálním rCBF v ACM
 (upraveno podle Chi Za Oak a spol., 2001).

Zvláštní případy fokální ischemie

Model vychází ze subdurální infuze neheparinizované autologní krve v množství 0,4 ml. Vzniklý akutní subdurální hematom svým tlakem na mozkovou kůru vede k mikrovaskulárním uzávěrům a k rozvoji ložiskového ischemického poškození (Fujisawa a spol., 1994; Kozler 2002). Model nemá přesně lokalizované poškození, což je jeho nevýhodou.

Dalším speciálním modelem je ischemie pozorovaná u potkana se spontánní hypertenzí (SHRSP), který je neobyčejně citlivý vůči různým technikám cévní okluze, které jsou dobře tolerovány u normotenzních druhů. Okamoto a spol. (1974) jako první popsal vysokou incidenci cévní mozkové příhody u tohoto kmene (u samců dokonce více než 80 %). Vývoj mozkové ischemie u tohoto kmene významně ovlivňují dietní faktory (Ginsberg a Busto, 1989). Vzhledem k výskytu řady podobných morfologicko-angiografických znaků mezi SHRSP a člověkem je tento model vhodný pro experimentální studie mozkové ischemie u člověka (Yamori a spol., 1976).

I.2.3. Je animální model mozkové ischemie i modelem schizofrenie?

Perinatální hypoxie/ischemie patří mezi zevní faktory prostředí, které, podobně jako proteinová malnutrice či virová infekce, narušují normální vývoj mozku (Trojan a Šťastný, 1988). Předpokládá se, že na základě genetické predispozice představuje hypoxie plodu a novorozence rizikový faktor pro vznik psychotického onemocnění. Vzhledem k nejasné etiologii schizofrenie však není možné vytvořit model vyznačující se jeho úplnou konstrukční a fenomenologickou validitou. Proto většina neurovývojových modelů má heuristický charakter (Bubeníková a spol., 2003) a jejich validita bývá nižší než u modelů genetických. Pro simulaci perinatálního hypoxicko-ischemického poškození jako rizikového faktoru schizofrenie jsme vybrali technicky dobře reprodukovatelný a v minulosti často použitý model založený na přechodném podvazu obou společných krkavic (Jílek a spol., 1957; Šťastný a spol., 1971; Smith a spol., 1984).

První otázkou bylo, jaká je fenomenologická validita tohoto animálního modelu? Abychom mohli zodpovědět námi položenou otázku musíme nejprve popsat hlavní příznaky schizofrenie, ale také změny chování charakteristické pro animální modelování psychózy. Základní srovnávané charakteristiky chování pozorované u osob trpících schizofrenií (pozitivní a negativní příznaky, deficit kognitivních funkcí) a u potkanů s modelovou psychózou (změny chování v testu „volného pole“, v akustické úlekové reakci a v prostorovém učení ve vodním bludišti). V této souvislosti je vhodné odkázat na níže uvedený přehled autorů Lipské a Weinbergera z roku 2000 (viz tabulka č. 4). Z přehledu vyplývá, že charakteristiky chování potkana je možné, s potřebnou mírou validity, přirovnat ke změnám chování pozorovaným u pacientů s psychózou.

Tabulka 4. *Klinické aspekty schizofrenie a změny chování v animálním modelu schizofrenie.*

Klinické příznaky schizofrenie	Charakteristiky chování potkana	Změny chování v animálním modelu schizofrenie
PSYCHOTICKÉ SYMPTOMY	Lokomoční aktivita (např. dráha za časovou jednotku)	Hyperlokomoce indukovaná dopaminergními látkami a antagonisty NMDA receptorů
STEREOTYPNÍ CHOVÁNÍ	Opakování jednotlivých behaviorálních aktivit, které mají trvání kratší než 1s (např. kývání hlavou, čichání, atd.)	Stereotypie indukovaná dopaminergními látkami a antagonisty NMDA receptorů
VULNERABILITA NA STRES	Lokomoční aktivita (např. dráha za časovou jednotku)	Hyperlokomoce indukovaná stresem
DEFICIT VE ZPRACOVÁNÍ INFORMACÍ	Prepulzní inhibice úlekové reakce: PPI	Deficit v PPI a ve vlně P50
DEFICIT V POZORNOSTI	Měření odpovědi na podnět podmíněný jiným podnětem (např. zvuk, světlo), kdy je zvíře před podmíněným podnětem vystaveno samotnému stimulu (světlo, zvuk)	Deficit latentní inhibice po podání amfetaminu nebo antagonistů NMDA receptorů
KOGNITIVNÍ DEFICIT	Testování paměti v Morrisově vodním bludišti nebo v radiálním bludišti	Zhoršení prostorové paměti
SOCIÁLNÍ DEFICIT	Doba kontaktu dvou i více zvířat v ohraničené aréně	Snížení sociálního kontaktu mezi zvířaty po podání antagonistů NMDA receptorů

(Upraveno podle Lipské a Weinbergera, 2000)

Podle provedených srovnávacích studií dospěje mozek potkana stupně „zralosti“ donošeného novorozence teprve na konci 2. týdne života po narození (mezi 10.-14. PND). V době narození je mozek novorozeného potkana méně diferencovaný než mozek lidského novorozence (Romijn a spol., 1991; Quinn, 2005). Vzhledem k této skutečnosti byla v našem modelu všechna mláďata vystavena ischemické epizodě 12. PND.

Ischémie způsobuje podobné změny v regionálním průtoku krve mozkiem (CBF) jak u člověka, tak i u zvířat s tím, že případné rozdíly vyplývají z odlišností anatomické stavby krevního řečiště i mozku samotného. Při poklesu CBF pod 20 ml/100g/min vzniká u člověka a primátů infarktové ložisko, které doprovází rozvíjející se mozkový edém. Jak uvádí Payan a spol. (1965) používající model dvou- i jednookluzivní mozkové ischémie, existují proto významné rozdíly v časné pooperační mortalitě nejen mezi jednotlivými druhy savců, ale i mezi jednotlivými kmeny téhož druhu. Nepřekvapí proto, že kmeny Lewis, Holtzman či Wistar mají při oboustranném uzávěru krkavic nulovou mortalitu, zatímco kmeny potkanů s označením ACI nebo F344 vykazují téměř 100% mortalitu. Naše zkušenosti s technikou dvouvaskulárního modelu potvrdily více než 85% mortalitu (do 24 hodin) u dospělého potkana, pokud se jednalo o trvalý oboustranný uzávěr společných krkavic. Mnohem lépe byla tolerována dočasná hodinová ischémie u 12denních mláďat, jejichž pooperační mortalita nepřesáhla 10 %.

I.3. PERINATÁLNÍ A ČASNĚ POSTNATÁLNÍ MOZKOVÁ ISCHÉMIE JAKO JEDEN Z MOŽNÝCH PŘÍČINNÝCH FAKTORŮ SCHIZOFRENIE

I.3.1. Definice a výskyt schizofrenie

Schizofrenie (SCZ) je definována jako soubor symptomů, které jsou shrnuty

v diagnostických manuálech DSM IV a ICD 10. Nejen její příčiny, ale i zastoupení jednotlivých projevů je různé. Dokonce ani negativní příznaky nejsou zcela specifické pro schizofrenii, neboť se vyskytují i u organických poruch, zejména v důsledku poškození frontálních laloků. Zatímco negativní příznaky vznikají v důsledku vývojových a degenerativních procesů jako důsledek hypofunkce glutamatergního systému, pozitivní symptomy většinou odrážejí nadměrnou aktivitu mezolimbického dopaminergního systému (Carlson, 2004).

Podle epidemiologických výzkumů se SCZ vyskytuje téměř rovnoměrně ve všech částech světa s celoživotní prevalencí 1,4-1,6 případů na 1000 obyvatel (Jablensky, 1997). Mezi příznaky SCZ patří také kognitivní deficit, který zahrnuje problémy s orientovanou pozorností, vizuálním a verbálním vybavováním, pracovní pamětí a exekutivními funkcemi (Heaton a spol., 1994). Proto již Liddle v roce 1987 rozdělil příznaky SCZ do tří nezávislých syndromologických skupin: syndrom psychomotorického útlumu, syndrom dezorganizace a syndrom zkreslené skutečnosti.

I.3.2. Schizofrenie a mitochondriální dysfunkce

Přestože v současné době neznáme přesnou příčinu tohoto závažného duševního onemocnění, lze se na základě experimentálních prací z posledních let domnívat, že klíčovým patofyziologickým mechanismem je poškození funkce mitochondrií, jako hlavního energetického zdroje buňky (pro přehled viz Šťastný a spol. 2007). Existují i určité vazby mezi aktivitou dýchacího řetězce v mozkových mitochondriích a hladinami dopaminu v dopaminergních strukturách mozku. V této souvislosti je třeba uvést, že v některých oblastech mozku (frontální mozková kůra, striátum a substantia nigra) byly u pacientů trpících SCZ skutečně prokázány změny v počtu a tvaru mitochondrií (Uranova a spol., 1989). V souvislosti s tím Kung a Roberts (1999) popsali významný pokles hustoty synapsí, které obsahují velmi aktivní subpopulaci

mitochondrií ve skupině neléčených schizofreniků, zatímco u nemocných, kteří podstoupili antipsychotickou léčbu, byla hustota těchto struktur většinou na úrovni kontrolních osob bez neuropsychiatrické anamnézy. V oligodendrocytech, které patří k nejvíce postiženým nervovým buňkám u schizofreniků vůbec, popsala Uranova a spol. (2001) významný (33%) pokles jak počtu, tak i velikosti mitochondrií, a to především v nucleus caudatus a v prefrontální kůře. Použití pozitronové emisní tomografie (PET), funkční magnetické rezonance (fMRI), magnetické rezonanční spektroskopie (³¹P-MRS) nebo jednofotonové emisní tomografie (SPECT) pak opakovaně potvrdilo sníženou úroveň prokrvení a předpokládaný pokles metabolismu především v oblastech čelních a spánkových laloků, talamu a v bazálních ganglií (Shachar, 2002).

I.3.3. Význam mitochondriálního systému OXPHOS u schizofrenie

Systém oxidativní fosforylace, nacházející se v mitochondriích (tzv. OXPHOS) a lokalizovaný do vnitřní mitochondriální membrány, postihuje u pacientů se SCZ řada změn. Mezi nejvíce postižené části tohoto systému patří komplex I a IV. Cavelier a spol. (1995) našli sníženou aktivitu komplexu IV – tj. cytochromoxidázy c - o 43 % ve frontální kůře a o 63 % v nucleus caudatus oproti kontrolní skupině osob. Maurer a Moller (1997) potvrdili pokles aktivity tohoto komplexu ve frontální, ale i v temporální části mozkové kůry u osob se SCZ. Naopak v oblasti putamen byla prokázána zvýšená aktivita nejen komplexu IV, ale i komplexu II – tj. sukcinát dehydrogenázy (Prince a spol., 1997). Existují však i práce, které žádné významné změny aktivit výše uvedených součástí OXPHOS systému nezaznamenaly. Přitom změny v aktivitách uvedených komplexů nenalezneme pouze v centrálním nervovém systému, ale také v trombocytech a lymfocytech a to nejen u schizofreniků, ale i u pacientů s Parkinsonovou chorobou či Alzheimerovou demencí.

Rozsáhlá studie Dror a spol. (2002) ukázala na možný vztah mezi aktivitou

mitochondriálního komplexu I a stádiem schizofrenie. V krevních destičkách nemocných se schizofrenií autoři prokázali významně zvýšené hladiny mRNA a bílkovinných podjednotek 24 a 51 kDa pro tento komplex. Zatímco v akutním stádiu byl zjištěn významný vzestup aktivity komplexu I, u chronických pacientů jeho aktivita poklesla až na 53 % kontrolní hodnoty, a to v souvislosti s předpokládaným přímým inhibičním účinkem léčby antipsychotiky. Tento účinek se u jednotlivých antipsychotik liší, přičemž nejvýrazněji je vyjádřen u haloperidolu. Současné byly popsány změny genové exprese mající vztah k uvedeným mitochondriálním komplexům ve vzorcích autoptické mozkové tkáně získané od osob se schizofrenií (blíže viz Šťastný a spol., 2007).

I.3.4. Dopaminová *versus* glutamátová hypotéza schizofrenie

Jednou z možných hypotéz vzniku schizofrenie je zvýšená aktivita dopaminergního systému v některých oblastech mozku pacientů se schizofrenií. Hypotéza vychází z poznatku, že antipsychotika jsou schopna inhibovat dopaminové receptory a že nepřímí agonisté dopaminu způsobují akutní psychotické příznaky podobné schizofrenii (Carlsson, 1988). Jak uvádí Boksa a spol. (2004) existuje celá řada studií, které potvrzují změnu hustoty jak dopaminových receptorů D1 až D4, tak i změnu aktivity transportéru pro dopamin (DA) u SCZ. Vzhledem k tomu, že do metabolismu DA významně zasahuje enzym monoaminoxidáza (MAO), která je přítomna na zevní straně mitochondriální membrány, je velmi pravděpodobné, že tento enzym může interagovat s mitochondriálním OXPHOS systémem. Dokládá to studie Przedborského a spol. (1993), která ukázala, že zvýšená koncentrace DA u potkanů souvisela s poklesem aktivity mitochondriálního komplexu I a hladiny ATP ve striátu. Lze proto předpokládat, že jak dopaminové receptory, tak i mitochondriální systém OXPHOS hrají významnou úlohu v patofyziologii schizofrenie a prostřednictvím jejich

ovlivnění je možná i farmakologická intervence. Podobné vztahy existují na straně jedné mezi glutamatergní neurotransmisí zajišťovanou ionotropními glutamátovými receptory a transportéry pro glutamát (uplatňují se na více než 50 % všech synapsí v mozku !) a na straně druhé, systémem OXPHOS, který reprezentují jak mitochondrie v nervových zakončeních, tak i mitochondrie v tělech neuronů.

Aktivitu dopaminergního mesolimbického a mesostriatálního systému ovlivňují nejen stresové faktory a návykové látky, ale i perinatální hypoxie. Klíčovým neuroprotektivním a neurotrofickým astrocytárním faktorem, jehož změny exprese byly již dříve prokázány, je bazický růstový faktor pro fibroblasty (bFGF; „basic fibroblast growth factor“). Je známo, že jeho exprese u laboratorního potkana krátce po narození je velmi nízká a rychle stoupá do 20. PND. Jinak je tomu u člověka v případě proběhlé porodní hypoxie, která vyvolá pokles bazální exprese bFGF ve ventrálním tegmentu a v pars compacta substantia nigra po dobu 2 týdnů, v oblasti tegmenta je dokonce možné tento pokles pozorovat ještě 3,5 měsíce po porodu (Flores a spol., 2002).

S tím souvisí i změna glutamatergní neurotransmise, a především účast ionotropních glutamátových receptorů v etiopatogenezi tohoto onemocnění. Pomocí metod receptorové autoradiografie a *in situ* hybridizace byl u nemocných se schizofrenií prokázán pokles AMPA-receptorů v hipokampu (v oblasti CA2). V gyrus dentatus byly také zjištěny významně nižší hladiny mRNA pro NR1 podjednotku NMDA receptoru a v CA2 hipokampální oblasti naopak významný vzestup mRNA pro podjednotky NR2B téhož heteromerního receptoru (Gao a spol., 2000).

I.3.5. Hypotéza nerovnováhy druhých posílů a metabolismus fosfatidylinositolu

Jak 1,4,5-inositoltrisfosfát (IP₃), tak i 1,2-diacylglycerol (DG) patří mezi hlavní produkty fosfatidylinositolové hydrolyzy. IP₃ sám má důležitou funkci 2. posla při uvolnění vápníkových iontů z nitrobuněčných zásob a to již v submikromolárních

koncentracích (Rittenhouse a Sasson, 1985). Tato jeho úloha může mít význam i v patofyziologii toxické nebo chronické psychózy schizofrenního typu.

Zvýšená akumulace druhé z uvolňovaných signálních molekul v krevních destičkách nemocných se schizofrenií pravděpodobně způsobuje na DG závisící snížení fosfatidylinositolové hydrolýzy a následně vede k defosforylaci IP_3 a ke změně funkčního zkratu IP_3/Ca^{2+} . Metabolismus fosfatidylinositolu je narušen také stimulací dopaminových D_2 receptorů. Považuje se za prokázané, že u určité podskupiny schizofrenních nemocných (zejména s pozitivními příznaky) lze zjistit abnormality v metabolismu fosfoinositidů nejen v krevních destičkách, ale i v různých oblastech mozku, především pak v mozkové kůře (Kaiya, 1992). Práce ukazuje, že v povrchové membráně krevních destiček u této skupiny pacientů dochází ke změnám metabolismu fosfolipidů a současně se významně mění i jejich na membránu vázané množství. Fosfatidylinositolbisfosfát (PIP_2) a inositoltrisfosfát (IP_3) dosahují u schizofreniků významně vyšších hladin než u zdravé populace. Tato dlouhodobě zvýšená produkce IP_3 může prostřednictvím receptorů ovlivňovat uvolňování nitrobuněčného vápníku ze struktur endoplazmatického retikula (Das a spol., 1992).

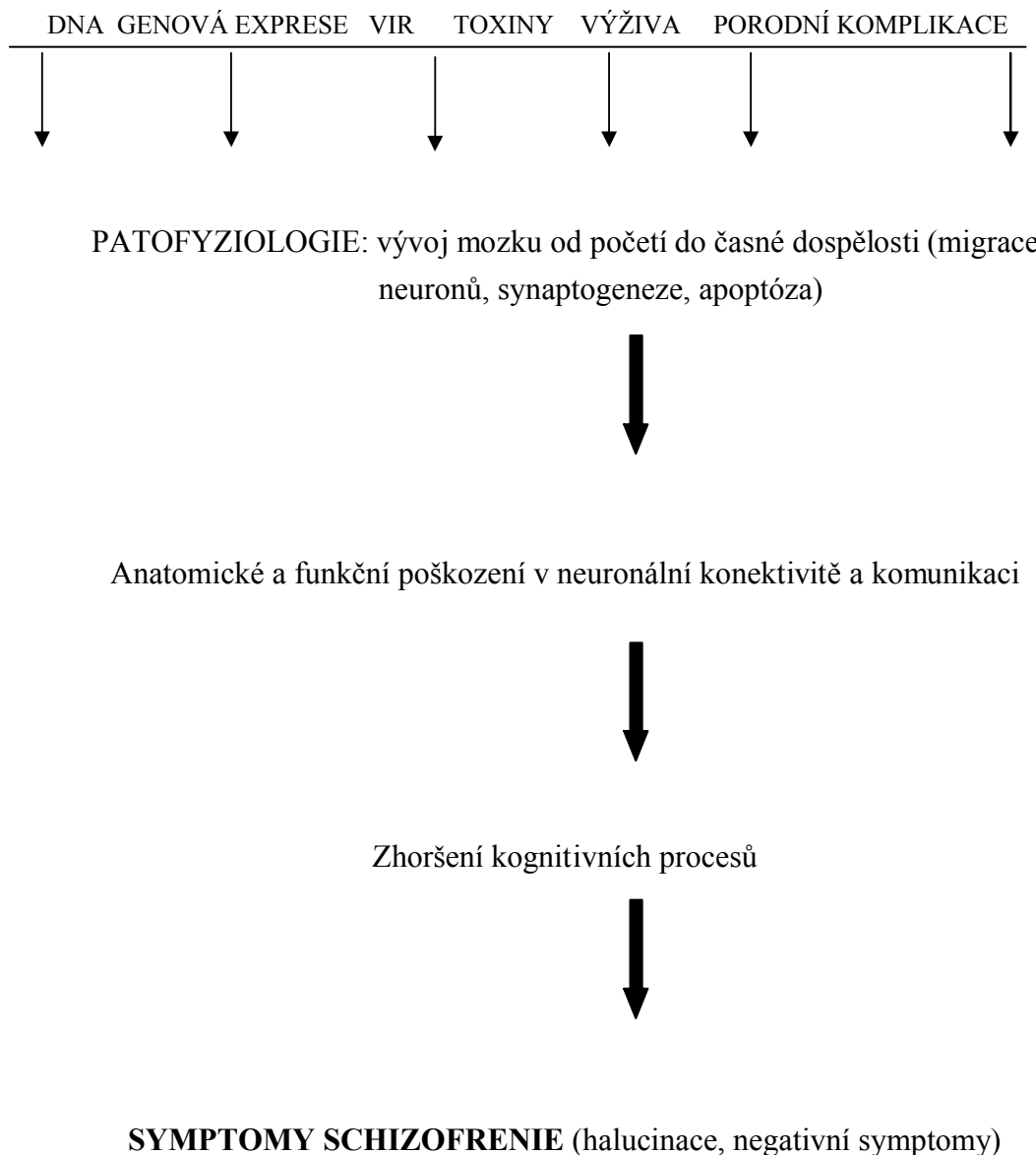
Podobně jako v případě IP_3 nalezneme u schizofrenie poruchu funkce v systému cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a příslušné proteinkinázy. Mezi jinými to dokládá práce Tardity a spol. (2000), kteří prokázali významný pokles hladiny regulačních podjednotek RI a RII na cAMP-závislé proteinkinázy (proteinkinázy A) u nemocných se schizofrenií.

I.3.6. Neurovývojová hypotéza schizofrenie

Neurovývojová hypotéza schizofrenie vychází z předpokladu, že SCZ, resp. predispozice k tomuto onemocnění, může být podmíněna pre- nebo perinatálním poškozením mozku, které ovlivní jeho další vývoj (obrázek č.1). Důkazů, které

potvrzují platnost této teorie přibývá souběžně s tím, jak narůstá počet epidemiologických, klinicko – patologických i experimentálních studií zabývajících se touto otázkou. Při použití neurovývojových animálních modelů je možné ověřit význam různých faktorů, které se uplatňují během prenatalního, perinatálního nebo i časně postnatálního vývoje s cílem objasnit vybrané patofyziologické změny, které se mohou podílet na vzniku tohoto onemocnění. Tyto modely mají svůj základ v experimentálním ovlivnění vyvíjejícího se mozku, které vede ke změně jeho funkce a má důsledky pro modelové chování zvířete v časné dospělosti. Příkladem může být malnutriční model založený na podvýživě potkaních mláďat, model virové infekce (např. chřipkový virus, Borna virus nebo proteinové komplexy viru HIV-1), či působení stresu (např. separace mláďat od matky) (Bubeníková a spol., 2003).

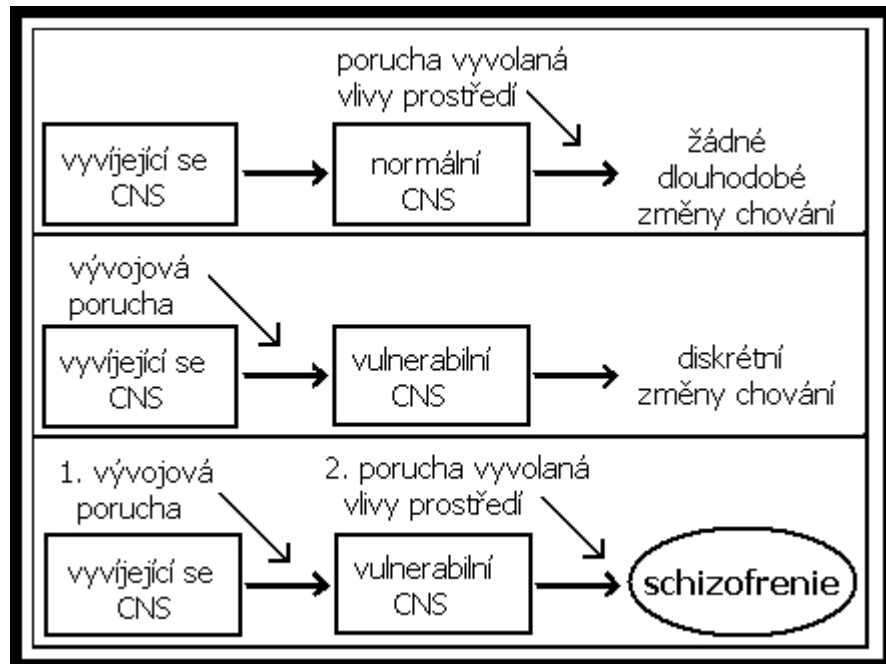
Mezi faktory, u nichž lze předpokládat příčinnou souvislost se vznikem SCZ, patří též hypoxie nebo ischemie mozku. V klinické praxi se jedná o skupinu komplikací během těhotenství a porodu (Cannon a spol., 2000; Hultman a spol., 1997; McNeil a spol., 2000). Přitom práce McNeila a spolupracovníků vyzdvihuje význam komplikací souvisejících bezprostředně s porodem, zatímco Hultmanova skupina klade větší důraz na komplikace před narozením. Neurovývojová hypotéza také předpokládá, že již v průběhu vývoje dítěte jsou přítomny některé subklinické příznaky nemoci. Dokladem toho jsou studie, které prokazují deficit pozornosti nebo existující neuromotorické poškození u dětí, u kterých byla později diagnostikována SCZ (Erlenmeyer-Kimling, 2000).



Obrázek 1. Neurovývojová hypotéza vzniku schizofrenie (upraveno podle Andreasen, 2000).

Všechny výše uvedené faktory mohou narušit normální vývoj jedince ve fázi jeho pre- nebo časně postnatálního vývoje. Nezodpovězenou otázkou však i nadále zůstává, zda-li k rozvoji příznaků SCZ stačí pouze jediné setkání s vyvolávajícím faktorem (noxou). Nedávné práce totiž ukazují, že samotné časně vývojové faktory spolu s genetickým rizikem jen zvyšují náchylnost k této nemoci a je proto třeba ještě dalších faktorů prostředí, které působí v pozdní fázi vývoje před dosažením pohlavní dospělosti. Tato forma neurovývojové hypotézy je označována jako tzv. „two-hit“

hypotéza (obrázek č. 2). Vychází z principu, že časné faktory tzv. „first hit“ zvyšují pravděpodobnost postižení jedince některým ze skupiny pozdních faktorů tzv. „second hit“ (Van den Buuse a spol., 2003).



Obrázek 2. Schematické znázornění tzv. „two-hit“ hypotézy schizofrenie (převzato z Van den Buuse, 2003)

I.3.7. Porodní komplikace a jejich význam jako rizikového faktoru 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 v letech 1995-2001 Cannon a spol. (2002) na základě meta-analýzy 8 velkých souborů osob. Uvedl 31 porodních komplikací, jejichž společným rysem je vznik schizofrenního onemocnění v dospělosti. O'Callaghan se spolupracovníky (1992) zjistili, že u pacientů s pozitivní anamnézou porodních

komplikací se první příznak SCZ nejčastěji objevuje mezi 20.-25. rokem života.

Jednotlivé klinické komplikace přicházející v průběhu těhotenství v úvahu jako rizikové faktory lze v experimentu simulovat pomocí animálních modelů a následně je charakterizovat na podkladě morfologických, neurochemických nebo behaviorálních změn. Mezi porodní komplikace první skupiny 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. Mezi vlastní porodní komplikace patří porod císařským řezem a hypoxie plodu či novorozence (Boksa, 2004).

Ze spektra sledovaných porodních komplikací byla statisticky významná pouze preeklampsie. Za překvapivé, a nesnadno interpretovatelné, je pozorování provedené El-Khodor-em a Boksou (1998), kteří v animálním modelu prokázali větší poškození mozku při porodu císařským řezem než v důsledku porodní hypoxie. Přitom je známo, že nedostatek O₂ v průběhu porodní hypoxie může způsobit různý stupeň ztráty nervových buněk (tzv. neuronální „prořezávání“) v některých oblastech mozku spojující se s větším synaptickým prořezáváním v období dospívání, které je pozorováno u osob trpících SCZ. Jako důsledek fetální hypoxie proto pozorujeme zmenšení objemu šedé hmoty 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 možností, které nám dává animální model založený na vývojových důsledcích časné (neonatální) ischémie mozku pro chování jedince. Případné změny by bylo možné označit za podobné psychotickému chování člověka, které by přes nepochybná omezení, jichž jsme si vědomi, mohla být extrapolována i na subpopulaci osob trpících SCZ.

II. CÍLE PRÁCE

Ve snaze odpovědět na otázku, zda perinatální ischemická epizoda u člověka, v případě potkana časná neonatální ischemie mozku, má patofyziologický význam pro vznik schizofrenie, jsme si vytyčili následující cíle:

1. Zjistit, zda 1-hodinu trvajícím podvazem obou společných karotid potkana 12. PND může být provázen změnami napětí krevních plynů v jeho krvi;
2. Zjistit, zda tato krátkodobá mozková ischemie ovlivní aktivitu GGT (použita jako možný indikátor ischemického poškození) u potkaního mláděte za 24 nebo 48 h anebo u dospělého jedince 50. PND (za 38 dní po ischemii).
3. Zjistit, zda změny v koncentraci cAMP a IP₃ (použity jako možné indikátory časného ischemického poškození mozku) lze prokázat i v období časně dospělosti (38 dní po ischemii).
4. Zjistit, zda časně ischemické poškození mozku potkana způsobí změny ve vývoji jeho chování charakterizované:
 - a) projevy sociálního a hravého chování mláďat,
 - b) reakcí na nové prostředí (test „volného pole“),
 - c) akustickou úlekovou reakcí a její prepulzní inhibicí.
5. Zjistit, zda námi vypracovaný animální model mozkové ischemie vhodným způsobem navozuje situaci vybraného typu porodní komplikace u lidského plodu (a novorozence) jako rizikového faktoru pro pozdější vznik SCZ.
6. Provést srovnání animálního modelu krátkodobé mozkové ischemie s heuristickými modely v minulosti studovanými v Laboratoři biochemie a patofyziologie mozku Psychiatrického centra Praha, které byly založeny na neonatálním poškození mozku potkana 12. PND kyselinou chinolinovou (QUIN) nebo N-acetyl-L-aspartyl-glutamátem (NAAG).

III. MATERIÁL A METODY

III.1. LABORATORNÍ ZVÍŘATA

V experimentální studii jsme použili laboratorní potkany kmene Wistar/Hann z chovného zařízení v Kolárovicích. S kojící matkou bylo pravidelně dodáno 10 mlád'at ve věku 9. PND, tj. 3 dny před jejich použitím v experimentu. V jednom vrhu bylo 8 mlád'at samčího a 2 mlád'ata samičího pohlaví). Před chirurgickým zákrokem plánovaným na 12. PND byla mlád'ata chována v přirozeném světelném režimu 12 hod světlo/12 hod tma, přičemž světelný režim byl měněn v 7 hodin ráno a v 19 h večer. V chovné místnosti byla stálá vlhkost vzduchu (50 ± 20 %) a teplota (22 ± 2 °C). Všechna mlád'ata byla 28. den odstavena od matky, rozdělena podle pohlaví a samečci byli dále zařazeni do 3 skupin (skupina intaktních (tzv. naivních), kontrolních a pokusných zvířat). K pitné vodě a k peletované potravě (dieta ST-1) měla zvířata volný přístup.

Všechna pozorování byl předem 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 311/1997 Sb a 207/2004 Sb s nařízeními EU.

III.2. DVOUVASKULÁRNÍ MODEL KRÁTKODOBÉ MOZKOVÉ ISCHÉMIE: OPERAČNÍ PROTOKOL

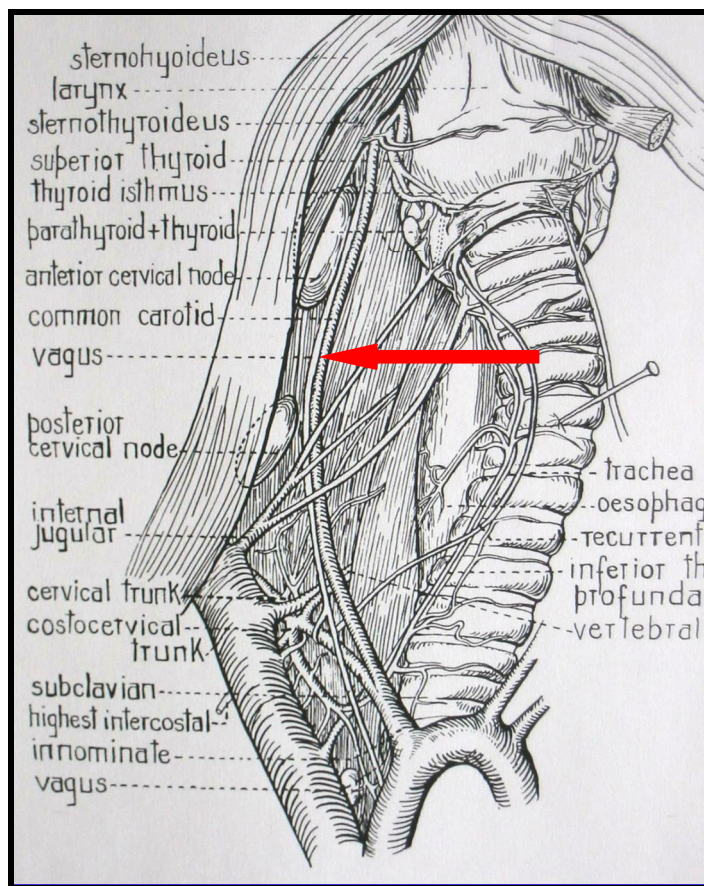
Potkaní samci byli 12. PND operováni v inhalační halotanové anestézii za použití systému Fluovac (obrázek 3). V úvodu mlád'ata inhalovala směs 2,5-3 % halotanu s 95 % kyslíku a 5 % oxidu uhličitého. Dále jsme v anestézii pokračovali směsí 1 %-1,5 % halotanu. Rektální teplota byla konstantně udržována na $36,5 \pm 0,5$ °C

pomocí vyhřívací podložky. Každé zvíře bylo upevněno hřbetem k operačním stolu. Po dezinfekci operačního pole jsme vpředu na 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 (obrázek 4 a 5). Oboustranného tepenného uzávěru bylo dosaženo podvlečením a dotažením vláken orsilonu 4/0. Ránu jsme uzavřeli jedním adaptačním stehem. Doba ischemie trvala 60 minut. Po dobu trvání tepenného uzávěru jsme zvíře navrátili zpět do chovného boxu. Potom jsme jednotlivá potkaní mláďata znovu anestezovali a obě přiložené ligatury operačně odstranili.

V období od března 2001 do srpna 2002 jsme operovali celkem 114 12denních mláďat, přičemž mortalita do 24 hodin činila 7 % (tj. 8 zvířat ze 114). Poškození spojené se silným krvácením jedné z karotid během deligačního zákroku jsme zaznamenali v dalších 7 případech.



Obrázek 3. Zařízení pro inhalační anestézii laboratorních hlodavců – systém Fluovac



Obrázek 4. Schematické znázornění anatomicko-topografických vztahů v krční oblasti dospělého potkana. Červená šipka znázorňuje místo, kde byla přiložena ligatura (podle Greene, 1959)



Obrázek 5. Makroskopický obraz vlastního operačního pole ve fázi před podvazem obou společných krkavic (foto autora)

III.3. ODBĚR VZORKŮ KRVE A STANOVENÍ HODNOT NAPĚTÍ KREVNÍCH PLYNŮ

Pro ověření stupně mozkové ischemie jsme náhodně ze skupiny kontrolních a ischemických mláďat vybrali po 10 z nich pro každou skupinu. Pro orientaci bylo vyčleněno 5 mláďat ke stanovení hodnot krevních plynů také v krvi naivních zvířat. Vzorky krve u této skupiny byly odebrány kardiální punkcí.

U ischemické a kontrolní skupiny jsme po hodinové ischemii v lehké halotanové anestézii u každého mláděte 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. Oba konce naplněné kapiláry byly uzavřeny voskem a uloženy do ledové tříště. Stanovení pH, napětí krevních plynů (O_2 , CO_2) a koncentrací HCO_3^- jsme prováděli na přístroji pH/Blood Gas Analyzer (firma Instrumentation Laboratory, typ 1620, Francie).

III.4. STANOVENÍ HLADIN cAMP V KREVNÍ PLAZMĚ A IP_3 V KREVNÍCH DESTIČKÁCH

Vzorky kardiální krve (2,5 ml) byly odebrány kardiální punkcí do S-Monovette (s náletem K^+ -EDTA) od 50denních potkanů ve střední anestézii. Krev byla 2krát centrifugována při 150 x g po dobu 15 min při 4°C. Oba objemy krevní plazmy obohacené destičkami 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 programu pro obrazovou analýzu 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), nikoliv však déle než 15 dní. Trombocyty byly ihned resuspendovány v roztoku obsahujícím (v mM): HEPES 40, NaCl 113, KCl 5,6, $MgCl_2$ 1,0 a Na_2HPO_4 0,2 (pH7,2) a extrahovány do 0,2 ml ledové 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 (bromtymolová modř byla použita jako pH indikátor). Precipitovaný $KClO_4$ byl odstraněn centrifugací a vzorky byly skladovány při -20°C do doby stanovení IP_3 pomocí [3H]D-myo-inositol 1,4,5-trisfosfátového systému (Amersham, UK). Metodický postup vypracovala a vlastní stanovení hladin [3H]cAMP a [3H]IP₃ provedla Ing. Věra Platilová, CSc.

III.5. STANOVENÍ AKTIVITY GGT V MOZKU A V KREVNÍ PLAZMĚ

V lehké éterové anestézii jsme odebrali vzorek krve srdeční punkcí použitím 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 uložili ho na ledem chlazenou skleněnou destičku. Z obou hemisfér jsme odebrali vzorky z fronto-parietální oblasti mozkové kůry a současně jsme vyjmuli i oba hipokampy. Vzorky mozkové tkáně byly bezprostředně po odběru homogenizovány v izotonickém roztoku NaCl a centrifugovány při 1000 x g. Získané „propláchnuté“ homogenáty vzorků tkáně byly resuspendovány v 1,5-2,0 ml ledové redestilované vody a následně použity ke stanovení membránově vázané aktivity GGT a celkového proteinu (blíže viz Šťastný a spol. 1985; Šťastný a spol., 1997).

U dospělých potkanů jsme stanovovali aktivitu GGT v mozku 50. PND po podvazu obou krkavic, který trval 24 nebo 48 hodin. Tento model nám posloužil k ověření doby přežití a ke stanovení změn aktivity GGT. V další fázi naší studie jsme použili stejného enzymatického markeru u 12denních mláďat. Vzhledem k vysoké mortalitě dospělých potkanů jsme původní dobu uzávěru obou společných krkavic zkrátily u 12denních mláďat na 1 hodinu. Zatímco u dospělých potkanů byla aktivita GGT stanovována bezprostředně po ischemii, u mláďat jsme sledovali možnost přetrvávání změn aktivity tohoto enzymu i v časně dospělosti. Proto byly odběry vzorků plazmy i mozkové tkáně provedeny až za 38 dní po ischemii, tj. 50. PND.

III.6. SLEDOVÁNÍ SOCIÁLNÍHO CHOVÁNÍ MLÁĎAT A REAKCE POTKANA NA NOVÉ PROSTŘEDÍ V TESTU „VOLNÉHO POLE“

III.6.1. Sledování hravého chování („social play behavior“)

Pro test hravého chování byli vybráni potkaní samci 22. PND, které jsme vložili do průhledného boxu o velikosti - délka: 40 cm, šířka: 23 cm, výška: 23 cm. Box byl umístěn ve zvukotěsné místnosti. V den pozorování byla zvířata oddělena od matky a sourozenců a po dobu 3,5 hodiny před vlastním pozorováním byla mláďata umístěna do samostatného boxu. Pro vlastní pozorování jsme použili metodu podle Vanderschurena a spol., (1995). Dyadická interakce mláďat byla zaznamenávána po dobu 15 minut, přičemž jednotlivé páry tvořila zvířata stejných skupin (tzn. kontrolní vs. kontrolní mláďe, ischemické vs. ischemické mláďe), jejichž hmotnostní rozdíly byly menší než 10 g a která pocházela z odlišných vrhů.

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

V rámci experimentu byly rozlišovány a hodnoceny následující kategorie. Z důvodu stručného a výstižného označení jsme ponechali původní anglickou terminologii:

1. pinning – jedno zvíře leží na zádech a druhé stojí nad ním
2. following/approaching – přiblížení se k partnerovi
3. mounting/crawling – přelézání partnera

4. sniffing/grooming – očichávání a čištění partnera včetně anogenitální oblasti
5. alone – tato kategorie je vyhrazena pro stav, kdy si zvířata udržují mezi sebou vzdálenost větší než 10 cm

Hravé chování potkana (pinning) je důležité pro vzájemnou komunikaci potkanů, pro určení sociální hierarchie a pro nácvik sociálních dovedností (Van den Berg a spol., 1999).

III.6.2. Studium reakce na nové prostředí (test „volného pole“)

Použitá laboratorní metoda umožňuje studium orientační reakce a postupné adaptace potkana na nové prostředí. Zahrnuje vlastní lokomoci (prostorovou exploraci), vyhledávací reakci i projevy, jimiž zvíře reaguje na změnu prostředí. Komplex reakcí je ovlivňován různými faktory, jako jsou denní cyklus, manipulace se zvířetem (handling), podmínky chovu, věk a pohlaví nebo farmakologický zásah. Princip testu spočívá v tom, že zvíře vložíme do nového, jemu neznámého prostředí a sledujeme a současně zaznamenáváme vzorce jeho chování (Tejkalová a Šťastný, 2005).

Pro pozorování jsme použili speciální box, umístěný ve zvukotěsné místnosti, jehož stěny byly z průhledného plexiskla (délka: 65 cm, šířka: 46 cm, výška: 35 cm). Zvíře bylo vždy umístěno do středu arény. 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 podobným způsobem (viz.výše) registrovali předem definované behaviorální vzorce (Benešová a spol., 2001).

V průběhu testu byly rozlišovány a dále hodnoceny následující kategorie chování:

1. Lokomoce (crossing) – horizontální pohyb zvířete v experimentálním prostoru s vyjádřením jeho aktivity celkovým počtem přechodu čtverců vyznačených na podlázce.
2. Panáčkování (rearing) – vertikální explorace v experimentálním prostoru bez opory nebo s oporou předních končetin o stěny.
3. Klidová aktivita (immobility) – zvíře bez viditelného pohybu – sezení, ležení – velmi často se zavřenýma očima (> 10 s).
4. Věťření (air sniffing) – výrazná olfaktorická explorace na místě se zvednutou hlavou a čenichem šikmo vzhůru.
5. Čenichání podlázky (floor sniffing) – olfaktorická explorace s čenichem těsně k podlázce, často doprovázeno lízáním podlázky.
6. Čistící aktivita (grooming) – typická péče o srst na všech částech těla.

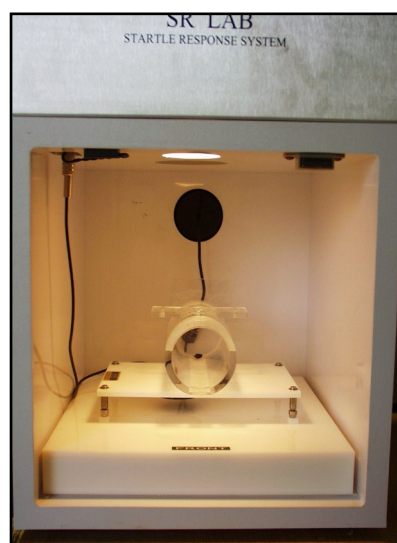
III.7. MĚŘENÍ AKUSTICKÉ ÚLEKOVÉ REAKCE A JEJÍ PREPULZNÍ INHIBICE

Akustická úleková reakce (ASR) a její prepulzní inhibice (PPI) byla měřena pomocí zařízení SR-LAB (San Diego Instruments, USA, obrázek 6), jehož součástí je zvukotěsná komora, piezoelektrický akcelerometr, uzavíratelné válcovité pouzdro na umístění zvířete a reproduktor. Válec z plexiskla o průměru 8,2 cm a délce 10 cm byl spojen s piezoelektrickým akcelerometrem, který detekoval pohyb zvířete ve válci a převáděl ho na elektrické napětí s hodnotami uváděnými v mV. Vysokofrekvenční reproduktor umístěný uvnitř zvukotěsné komory 24 cm nad válcem generoval jednotlivé akustické podněty o různé intenzitě podle programovatelného nastavení (software dodán San Diego Instruments, USA).

Zvířata absolvovala testy 50. PND. Čtyřicet osm hodin před vlastním testem

proběhl habituální nácvik, kdy potkani po dobu 5 min byli vystaveni „aklimatizačnímu“ šumu o intenzitě 70 dB a následně 12 zvukovým podnětům o intenzitě 120 dB (PA). Mezi jednotlivými podněty byly zachovány intervaly trvající v průměru 15 sekund.

Časový sled a druhy předpodnětů (prepulsů, PP) v rámci vlastního pozorování byly uspořádány podle Ellenbroeka a spol. (2002). Po 5ti-minutové „aklimatizační“ periodě bylo každé zvíře randomizovaně vystaveno 50 sekvencím akustických podnětů, kdy byl prezentován buď samotný silný podnět (PA - 10krát 120 dB, trvání 30 ms) nebo ve spojení s předpodněty o intenzitě 3, 5 a 10 dB nad úrovní „bílého“ šumu mající intenzitu 70 dB (PP3, PP5, PP10), které byly vždy generovány o 70 ms dříve než PA. Vlastní intenzita předpodnětů proto činila 73, 75 nebo 80 dB, přičemž každý z nich byl opakován během testu celkem 10krát. Variabilní intervaly mezi sekvencemi byly v rozmezí 10-20 sekund. 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).



Obrázek 6. Zařízení pro měření akustické úlekové reakce e její PPI (San Diego Instruments, USA)

III.8. STATISTIKA

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

IV. VÝSLEDKY

IV.1. NAPĚTÍ KREVNÍCH PLYNŮ V KRVI 12DENNÍCH POTKANŮ PO 1 HODINOVÉ MOZKOVÉ ISCHÉMII

Jednu hodinu trvající ischemie mozku 12denních potkanů způsobila významné snížení hodnoty pH krve v porovnání s kontrolní skupinou. Současně v této pokusné skupině mláďat statisticky významně pokleslo procentuálně vyjádřené sycení krve O₂ (spO₂) a to navzdory tomu, že pokles hodnoty pO₂ nedosáhl statistické významnosti při srovnání s kontrolní skupinou. Mezi další sledované ukazatele, jejichž hodnota se vlivem ischemie změnila, patřil vzestup napětí CO₂ (pCO₂), který však neprovázela významná změna v plazmatické koncentraci hydrogenuhličitanového aniontu (HCO₃⁻).

Statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a naivní skupinou nebyl zjištěn u žádného ze sledovaných hodnot pro napětí krevní plynů ve vzorcích krve odebraných z cévy (kontrolní mláďata) nebo přímo z pravého srdce (naivní mláďata), jak dokládá tabulka č. 5. 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 neovlivňovaly napětí krevních plynů v žádné ze studovaných skupin potkaních sameček.

Tabulka 5. *Napětí krevních plynů v krvi 12denních potkanů ve skupině naivních, kontrolních a, ischemických mláďat po jednohodinovém podvazu obou společných krkavic.*

Skupina	n	pH	pO ₂ [kPa]	pCO ₂ [kPa]	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	spO ₂ [%]
Naivní!	5	7,27±0,01	27,4±5,2	6,4±0,1	23,8±0,4	99,1±0,3
Kontrolní	10	7,30±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 ± S.E.M.; * statisticky významný rozdíl oproti kontrolní skupině, p < 0,05; n - počet zvířat; ! - odběry provedené kardiální punkcí.

IV.2. ISCHEMIÍ NAVOZENÉ ZMĚNY AKTIVITY GGT V MOZKOVÉ TKÁNI A V KREVNI PLAZMĚ POTKANA

V naší studii jsme měřili aktivitu membránově vázané GGT ve frontoparietální oblasti mozkové kůry a v hipokampech mladých (12. PND) a dospělých (50. PND) potkanů a současně jsem stanovovali i aktivitu solubilní formy tohoto enzymu v krevní plazmě.

Mozkovou ischemií jsme u mláďat i u dospělých potkanů navodili použitím výše popsaného „dvouvaskulárního modelu“. Obě skupiny se lišily délkou podvazu

obou krkavic (blíže viz část III). U dospělých zvířat jsme odběr vzorků mozkové tkáně provedli 24 hodin po podvazu obou krkavic. V případě 12denních mláďat, která byla vytavena hodinové ischemii, jsme odebrali vzorky mozkové tkáně a krve za 38 dní po deligaci krkavic, tj. 50. PND, kdy již samci dosáhli pohlavní dospělosti. Odběr vzorků krevní plazmy u mláďat jsme prováděli také kardiální punkcí, a to za 24 nebo 48 hodin po 1-hodinové ischemii mozku. Aktivita obou forem GGT v mozkové tkáni, respektive v krevní plazmě, je pro jednotlivé věkové a experimentální skupiny uvedena v tabulce č. 6 a 7.

Oboustranný uzávěr karotických tepen trvajících 24 hodin vedl k ischemickému poškození, které provázal vzestup aktivity GGT v mozkové tkáni a to jak v mozkové kůře, tak i v hipokampu. Ve srovnání s kontrolní skupinou byl tento vzestup statisticky významný v obou oblastech mozku. Zvýšenou aktivitu GGT jsme zaznamenali také ve vzorcích krevní plazmy, ve srovnání s kontrolami dosáhl tento vzestup statistické významnosti jen ve skupině, kde byly vzorky plazmy odebrány po 48 hodinách.

Na základě této zkušenosti jsme použitím stejného modelu navodili mozkovou ischemii u mláďat potkana 12. PND. Vzorky mozkové kůry a hipokampu byly odebrány za 38 dní od proběhlé ischemie, tj. v časně dospělosti (50.PND). Výsledky, které jsme získali ukazují, že jednohodinová mozková ischemie 12denních mláďat nevyvolá změny aktivity GGT v mozku ani v krevní plazmě, které by bylo možné zaznamenat i v časně dospělosti. Zatímco při porovnání skupiny mláďat, jejichž plazma byla odebrána 48 hodin od ischemické příhody se skupinou dospělých zvířat, jsme zaznamenali pokles aktivity GGT, který byl statisticky významný (tabulka č. 6 a 7).

Tabulka 6. Aktivita membránově vázané formy GGT v mozku potkana [nmol pNA/mg proteinu/min] po podvazu obou společných karotid u potkanů 12. nebo 50. PND

Oblast mozku	12 .PND	50. PND
Kontrolní - PCX	8,27 ± 1,06	8,47 ± 0,48
Kontrolní - HIPP	6,45 ± 0,37	7,99 ± 0,21
Ischemická - PCX	7,31 ± 0,48	10,58 ± 0,65*
Ischemická - 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 kůra mozku, HIPP - hipokampus

Tabulka 7. Aktivita solubilní formy GGT v plazmě 50denních potkaních samců [U/litr plazmy] po podvazu obou společných karotid

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

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

IV.3. HLADINY CAMP A IP₃ V KRVI 50DENNÍCH POTKANŮ PO 1-HODINOVÉ NEONATÁLNÍ ISCHÉMII MOZKU

Pozdní důsledky jednohodinové mozkové ischemie 12. PND jsme hodnotili prostřednictvím koncentrace cAMP stanovené v krevní plazmě a hladiny IP₃ v trombocytech. Vzorky krve 50denních potkanů byly získány kardiální punkcí

způsobem popsaným v části III. Neprokázali jsme však statisticky významný rozdíl v koncentracích druhých poslů při srovnání experimentální skupiny s kontrolní nebo naivní skupinou potkanů (tabulka č. 8 a 9). Z výsledků je zřejmé, že krátkodobá mozková ischemie v časném neonatálním období vývoje potkana nezpůsobuje dlouhodobé změny v plazmatických hladinách cAMP nebo koncentraci IP₃ v krevních destičkách v časně dospělosti, přestože v krvi pacientů trpících SCZ byly změny koncentrace IP₃ v jejich trombocytech prokázány.

Tabulka 8. Koncentrace cAMP v plazmě 50denního potkana

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

Koncentrace c AMP je vyjádřena v nM/litr. Uvedené hodnoty jsou vyjádřena jako průměr jednotlivých měření ± S.E.M.; statistická analýza - nepárový t-test; n - počet zvířat.

Tabulka 9. 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 jednotlivých měření ± S.E.M.; statistická analýza - nepárový t-test, n - počet zvířat.

IV.4. ZMĚNY CHOVÁNÍ ZPŮSOBENÉ NEONATÁLNÍ ISCHÉMIÍ

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, neboť jak je zřejmé z pozorování autorů Lipské a Weinbergera (tabulka č.4) je možné právě těmto behaviorálním aktivitám zvířat přiřadit konkrétní klinické příznaky, kterými se manifestuje schizofrenní onemocnění u člověka.

IV.4.1. Sociální chování 22. PND a důsledky neonatální ischemie

V tabulce č. 10 jsou uvedeny výsledky sociálních interakcí u mladých potkanů 22. PND ve skupině naivních, kontrolních a ischemických jedinců. 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).

Zkrácení doby čistící aktivity (tzv. grooming) a přelézání (tzv. mounting) ve skupině potkanů po ischemické epizodě nedosáhlo statistické významnosti. V ostatních aktivitách byla u mláďat s ischemickým postižením tendence k prodloužení doby trvání, které však při srovnání s kontrolní skupinou nebylo statisticky významné. Lze se proto domnívat, že zvířata po ischemické epizodě reagovala na sociální situaci podobně jako kontroly.

Tabulka 10. Vliv krátkodobé ischemie (12. PND) na sociální chování potkana v prepubertálním období (22. PND).

Skupina	n	Hravé chování	Sociální chování bez vztahu k hravému chování			Vzájemné vzdálení se na ≥ 10 cm
		pinning	mounting or crowling	grooming	approaching or following	
Naivní	2	29,30 \pm 29,30	95,30 \pm 8,50	83,35 \pm 1,85	280,8 \pm 14,40	186,8 \pm 8,30
Kontrolní	9	5,72 \pm 5,72	64,64 \pm 10,57	103,7 \pm 17,36	354,6 \pm 20,07	175,0 \pm 22,65
Ischemická	11	9,61 \pm 6,37	81,00 \pm 10,86	72,21 \pm 15,81	351,8 \pm 14,49	184,7 \pm 21,63

Výsledná data jsou vyjádřena jako průměr trvání [sec] hodnocených aktivit \pm S.E.M. v průběhu 15 minutového sezení, n - počet testovaných dvojic. Při srovnání skupiny ischemických zvířat s kontrolními jsme pomocí ANOVA nezjistili žádné statisticky významné rozdíly.

IV.4.2. Spontánní aktivita ve volném poli 35. PND a změny indukované ischemií

U potkanů v období dospívání 35. PND jsme prostřednictvím testu otevřeného pole hodnotili pohybovou aktivitu ve všech 3 skupinách (tabulka č. 11 a 12). 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 větření dosáhla kontrolní skupina zvýšení statistického významu oproti naivním potkanům. Zvířata kontrolní skupiny delší dobu setrvala v klidu, více větřila a kratší dobu čenichala.

Na rozdíl od kontrolních skupin zvířata vystavená po narození krátkodobé mozkové ischemii vykazovala výrazně vyšší lokomoční aktivitu. Dokládá to statisticky významné zvýšení frekvence horizontálního pohybu doprovázené také 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 hodnocenými skupinami nezjistili. U zvířat s ischemickým poškozením jsme pozorovali vyšší frekvenci větření i čenichání

podlážky, které navíc ve srovnání s kontrolními zvířaty dosáhlo statistického významu.

Z výsledků je zřejmé, že potkani obou skupin (kontrolní i ischemické) více věřili než ve skupině naivní. 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. 12).

Tabulka 11. Vliv krátkodobé neonatální ischemie (12. PND) na chování potkana (35. PND) z hlediska frekvence jednotlivých aktivit a latence klidové fáze.

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

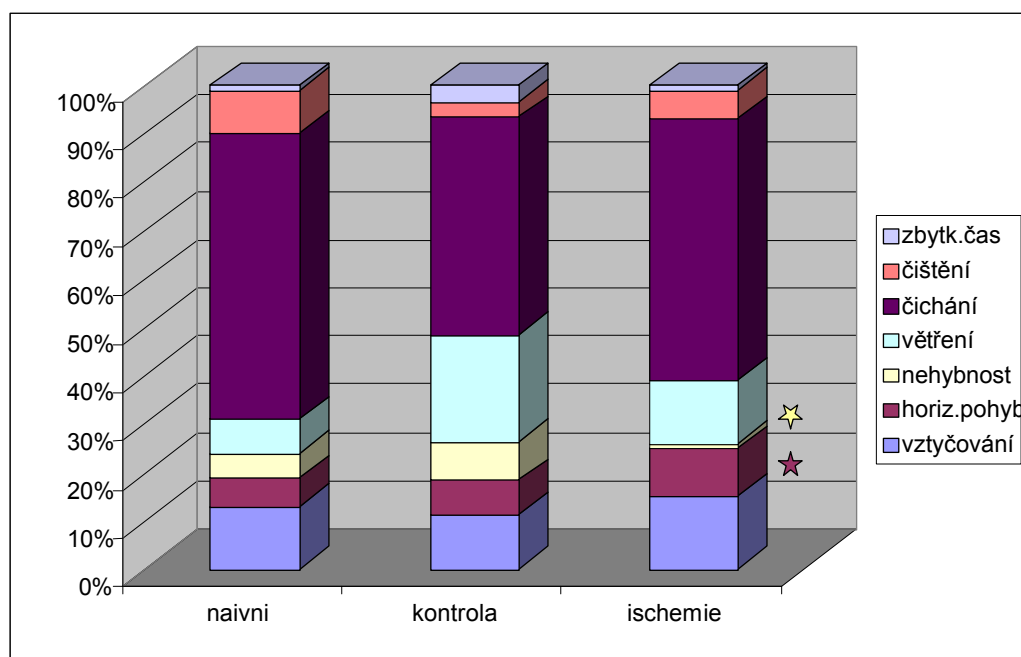
Frekvence je vyjádřena jako průměr počtu aktivit během 5 minut ± S.E.M., $p < 0,05$, ANOVA. * statisticky významný rozdíl od kontrolní skupiny, n - počet zvířat. Výsledky latence nehybnosti jsou uvedeny v sekundách.

Tabulka 12. Vliv krátkodobé neonatální ischemie (12. PND) na chování potkana (35. PND) z hlediska trvání vybrané aktivity.

Skupina	n	Nehybnost Doba trvání [s]	Větření Doba trvání [s]	Čenichání Doba trvání [s]
Naivní	4	14,0 ± 6,8	32,0 ± 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.; $p < 0,05$, ANOVA, * statisticky významný rozdíl vůči kontrolní skupině, n - počet zvířat.

Pomocí přehledného grafu (obrázek č. 7) jsme zobrazili délku trvání sledovaných kategorií chování ve všech třech skupinách (naivní, kontrolní, ischemická). Mezi aktivity, které trvaly 35. PND nejdéle, patřily čenichání podlahy, větření a vztyčování. Při srovnání s kontrolními zvířaty došlo vlivem ischemie ke statisticky významnému zkrácení trvání nehybnosti a prodloužení horizontálního pohybu.



Obrázek 7. Délka trvání jednotlivých vzorců chování u potkana 35. PND

Osa y - délka trvání jednotlivých kategorií chování v procentech, (100% = 300 s).★ statisticky významný rozdíl od kontrolní skupiny.

IV.4.3. Spontánní aktivita ve volném poli 50. PND a změny indukované ischemií

Pomocí testu otevřeného pole jsme hodnotili pohybovou aktivitu a chování ve skupině naivních, kontrolních a ischemických potkanů také v období časně dospělosti (50. PND). Spontánní motorická aktivita v reakci na nové prostředí, charakterizovaná frekvencí lokomočních pohybů a vztyčováním, byla u ischemických zvířat pouze nevýznamně zvýšena (tabulka č. 13) ve srovnání s kontrolními potkany. Na rozdíl od 35. PND se pohybové a explorační aktivity potkanů s neonatálním ischemickým

poškozením významně nelišily od kontrolních zvířat v žádném ze sledovaných ukazatelů (tabulka. č. 13 a 14). Statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami jsme nezaznamenali ani v případě doby trvání nehybnosti nebo frekvence větření či čenichání (tabulka č. 13).

Tabulka 13. Vliv krátkodobé neonatální ischemie (12. PND) na chování v časné dospělosti (50. PND) z hlediska frekvence jednotlivých aktivit a latence klidové fáze.

Skupina	n	Horizontální pohyb frekvence	Vztyčování frekvence	Nehybnost latence [s]	Větření frekvence	Čenichání frekvence
Naivní	10	67,5 ± 5,9	15,9 ± 1,6	249,1 ± 18,9	20,4 ± 2,6	72,9 ± 4,7
Kontrolní	20	68,8 ± 5,0	16,5 ± 1,0	224,0 ± 18,9	16,0 ± 3,4	69,7 ± 4,6
Ischemická	22	79,6 ± 4,1	19,8 ± 1,6	265,6 ± 15,3	15,8 ± 1,8	77,6 ± 2,7

Frekvence je vyjádřena jako průměr počtu aktivit během 5 minut ± S.E.M. Hodnoty latence nehybnosti jsou uvedeny v sekundách.; n - počet zvířat, Ke statistické analýze použita ANOVA.

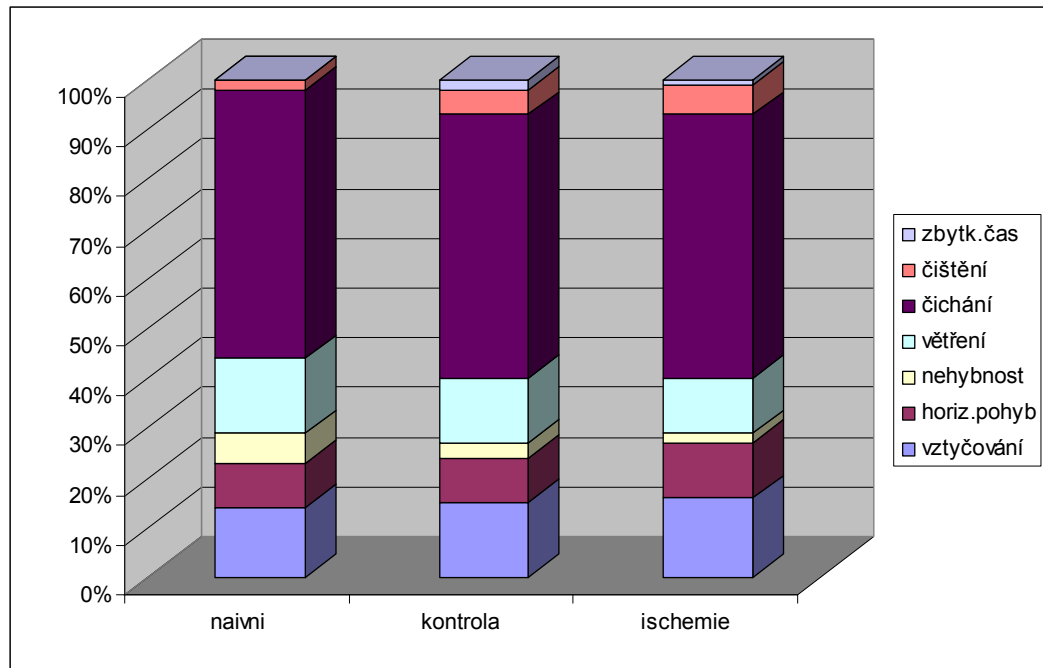
Tabulka 14. Vliv krátkodobé neonatální ischemie (12. PND) na chování v časné dospělosti (50. PND) z hlediska trvání vybrané aktivity.

Skupina	n	Nehybnost Trvání [s]	Větření trvání [s]	Čenichání trvání [s]
Naivní	10	16,9 ± 11,7	44,8 ± 8,8	160,7 ± 10,3
Kontrolní	20	8,7 ± 3,3	38,7 ± 5,7	159,9 ± 9,2
Ischemická	22	7,4 ± 4,1	33,8 ± 4,2	158,9 ± 5,5

Uvedené hodnoty vyjadřují průměr trvání aktivit v sekundách ± S.E.M.; n - počet zvířat. Ke statistické analýze použita ANOVA

Podobně jako 35. PND také u 50denních potkanů patřily mezi nejdéle trvající

aktivity čenichání podlahy, větrání a horizontální pohyb (celkový přehled uvádí obrázek č.8).



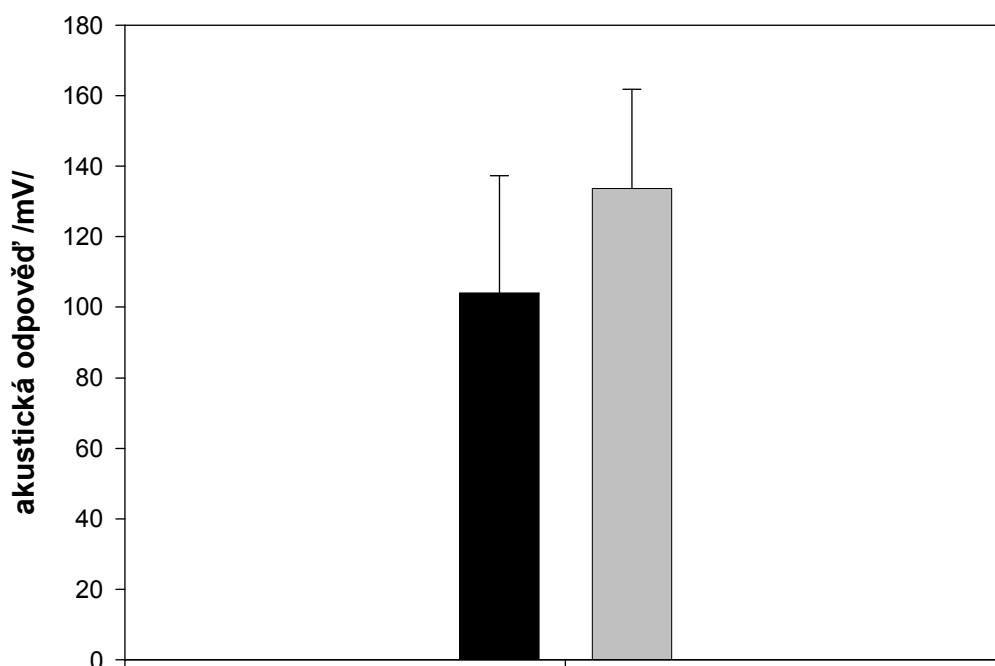
Obrázek 8: Délka trvání jednotlivých vzorců chování u potkana 50. PND

Osa y - délka trvání jednotlivých kategorií chování v procentech,
(100% = 300 s)

IV.5. PREPULZNÍ INHIBICE AKUSTICKÉ ÚLEKOVÉ REAKCE A DŮSLEDKY NEONATÁLNÍ ISCHÉMIE

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

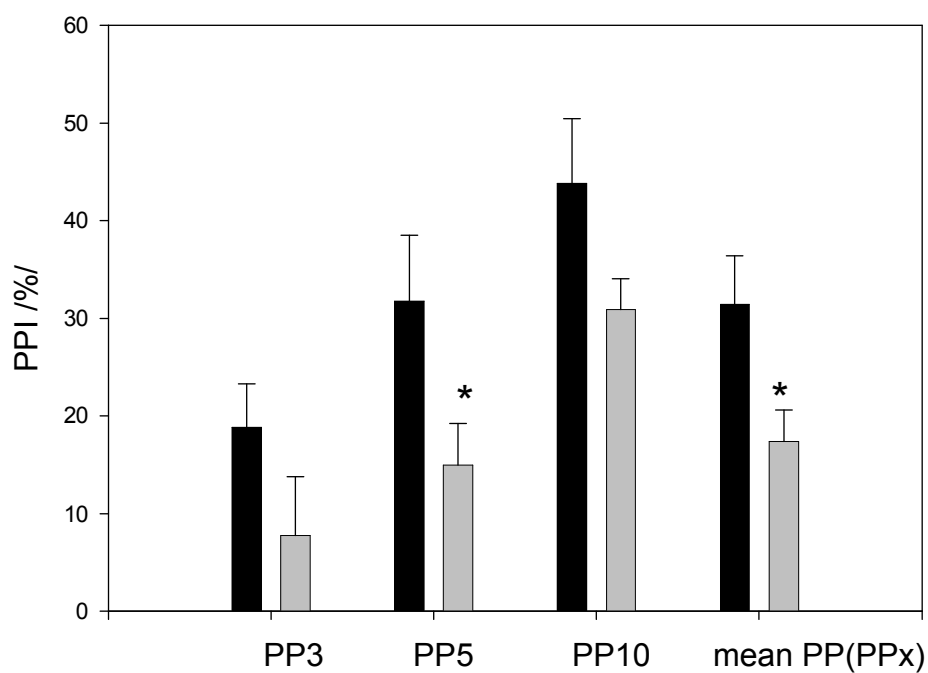
Jak je patrné z obrázku č. 9, odpověď na samotný zvukový podnět o intenzitě 120 dB se u zvířat po krátkodobé neonatální ischemii v období jejich časně dospělosti (50. PND) statisticky významně nelišila od stejně starých kontrolních zvířat.



Obrázek 9: *Vliv krátkodobé neonatální ischemie (12. PND) na akustickou úlekovou reakci (50. PND)*

Intenzita akustického podnětu 120 dB. Kontrolní zvířata - černý sloupec, neonatálně ischemizovaná zvířata - šedý sloupec. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr jednotlivých měření \pm SEM; $n = 7$ kontrolní, respektive $n = 11$ neonatálně ischemizovaných zvířat.

Následující obrázek č. 10 znázorňuje, že deficit prepulzní inhibice akustického úleku lze pozorovat u zvířat po krátkodobé neonatální ischemii. Statisticky významný deficit prepulzní inhibice jsme zjistili po vyhodnocení rozdílů mezi kontrolní a pokusnou skupinou v případě předpodnětu o intenzitě 5 dB (PP5) a u celkové hodnoty PP_x , která představuje průměr ze všech získaných hodnot naměřených při PP3, PP5 a PP10. Přitom rozdíly naměřené s předpodněty o intenzitě 3 dB (PP3) a 10 dB (PP10) nad prahem „bílého“ šumu (intenzita 70 dB) dosáhly jen hraniční statistické významnosti ($p > 0,05$).



Obrázek 10: 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, $p < 0,05$.

V. DISKUSE

Cílem naší práce bylo prokázat do jaké míry námi ověřovaný model mozkové ischemie (a) vykazuje konstrukční a fenomenologickou validitu porodního nebo poporodního hypoxického poškození mozku ve vztahu k psychóze podobnému chování potkana a (b) zda jeho charakteristiky mají predikční validitu pro lepší pochopení etiopatogenezi schizofrenie. Zajímalo nás zda vůbec, případně do jaké míry se změny chování potkana v období puberty a v časně dospělosti následkem krátkodobé neonatální hypoxicko – ischemické epizody. Vzhledem k tomu, že hypoxie plodu a novorozence je spolu s genetickými vlivy uváděna mezi příčinnými faktory vzniku schizofrenie, zjišťovali jsme jak souvisí tyto změny chování s projevy, které mohou připomínat psychotické onemocnění člověka. Model respektuje neurovývojovou hypotézu vzniku tohoto vážného duševního onemocnění, jehož jasně definované příčiny zůstávají stále nejasné.

V následujících částech dizertace proto diskutujeme nejen dosažené výsledky, které zahrnují jednotlivé charakteristiky námi zvoleného heuristického modelu, ale i vhodnost našeho modelu, založeného na krátkodobé postnatální hypoxii mozku, která má etiopatogenetický význam pro některá onemocnění dospělého věku.

V.1. NAPĚTÍ KREVNÍCH PLYNŮ VE DVOUVASKULÁRNÍM MODELU MOZKOVÉ ISCHÉMIE

Dočasná ischemie navozená oboustranným uzávěrem společných krkavic je potkanem, na rozdíl od člověka, relativně dobře tolerována. Předpokládaným vysvětlením této skutečnosti je existence významného podílu kolaterálního přívodu

krve z cév vertebrobasilárního povodí, který je mnohem významnější u potkana než u člověka a může významně kompenzovat vyřazení přívodu krve do mozku prostřednictvím společných krkavic (Pulsinelli a Brierley, 1979). Přesto jejich podvaz v použitém dvouvaskulárním modelu snižuje množství přiváděné krve a tím i kyslíku do mozku, což ve své podstatě odpovídá stagnační formě hypoxie (Barcroft, 1920). Z celého spektra porodních komplikací naše modelová situace asi nejvíce vystihuje formu perinatální hypoxie, která vzniká na podkladě poškození fetoplacentárního oběhu z důvodu krční strangulace pupeční šňůrou nebo spasmem pupečnickových cév (viz. výše kapitola I.1.4.).

Iwasaki a spol. (1989) použili tentýž model u dospělých potkanů kmene Wistar a Fischer a porovnávali postischemické změny, které způsobil uzávěr trvající 1/2, 1 a 2 hodiny. Zatímco půlhodinová ischemie nebyla zatížena úmrtností ani v jediném případě, úmrtnost u jednohodinového uzávěru činila 6% a u dvouhodinového dokonce 38%. V našem případě však 24hodinový podvaz obou společných krkavic způsobil úhyn téměř 85% dospělých potkanů. Naopak u 12denních mláďat byl stejně provedený 1-hodinový podvaz obou krkavic příčinou úhynu v méně než 10 % mláďat.

Histopatologické nálezy odpovídající proběhlé ischemii byly rozděleny do 2 odlišných kategorií podle stavu hematoencefalické bariéry na infarkty a oblasti s degenerativními změnami neuronů, které převažovaly. Mezi nejvíce postižené oblasti mozku patřily CA1 podoblast hipokampu, oblast bazálních ganglií a mozková kůra (Iwasaki a spol., 1989).

O 10 let později použili Uehara a spol., (1999) dvouvaskulární model u 5denních potkaních mláďat, v němž obě krkavice trvale uzavřeli pomocí bipolární elektrokoagulace. Jejich pooperační úmrtnost činila 12%. Po dvou dnech ischemie provedli histologické vyšetření vzorků mozkové tkáně a zjistili, že více jak 90 % změn bylo nalezeno v bílé hmotě mozku, především v jeho capsula interna. Tyto změny měly

charakter koagulačních nekróz a cystické degenerace mozku. Vzhledem k podobnému uspořádání našeho protokolu jsme detailní histologické hodnocení změn ve vlastním modelu neprováděli. Další podrobný popis změn uvádějí Rice a spol. (1981), kteří použili původního Levinova modelu u 7denních mláďat potkana. Prokázali ischemické změny různého stupně lokalizované do oblastí mozkové kůry, hipokampu a striáta, přičemž více jak 50 % tvořily mozkové infarkty. Kromě atrofie mozkové kůry, hipokampu a striáta v postižené mozkové hemisféře, souběžně s těmito změnami bylo pozorováno i kompenzatorní zvětšení postranních mozkových komor (Lubics a spol., 2005). Tyto rozdíly je možné vysvětlit různými hodnotami průtoku krve (CBF) studovanými oblastmi mozku. Zatímco v případě samotného dvouvaskulárního uzávěru klesne CBF na 25% kontrolní hodnoty, u Levinovy modifikace je pokles CBF významnější a dosahuje jen 15-20% hodnoty zjištěné u kontrol.

Vzniklé hypoxické poškození jsme charakterizovali stanovením pH krve, napětím krevních plynů a kyslíkovou saturací, přičemž vzorky arterializované krve byly odebrány bezprostředně po ischemické příhodě. Eklöf a Siesjö, (1972) použili obdobný ischemický model u dospělého zvířete a zjistili, že samotný uzávěr trvajících 5 nebo 30 minut neovlivnil koncentraci arteriálních krevních plynů, ale byl pozorován vzestup $p\text{CO}_2$ a naopak pokles $p\text{O}_2$ v žilní krvi získané z horního šípového splavu. Tyto změny dosáhly statistické významnosti ve srovnání s kontrolami při kombinaci uzávěru s uměle navozenou hypotenzí na 100 nebo 70 mm Hg. Nižší hodnota $p\text{O}_2$ souvisela s poklesem mozkového krevního průtoku na 50 % normální hodnoty. Jestliže byla udržována stálá hodnota středního arteriálního tlaku (kolem 100 mm Hg) nebyly pozorovány ani významné změny v energetickém metabolismu mozku. Výrazné snížení normálního mozkového krevního průtoku pod 50% potvrdil také Smith a spol., (1984) ve dvouvaskulárním modelu u potkanů kmene Wistar. Tento model patnáctiminutové mozkové ischemie byl překvapivě zatížen velkou mortalitou.

Pokles pH krve po uzavěru obou krčních tepen je možné vysvětlit rozvojem metabolické acidózy a akumulací CO₂. Domníváme se, že statisticky významný vzestup pCO₂ v našem modelu vznikl jako důsledek přetrvávajícího tepenného uzavěru. Pro srovnání s našimi hodnotami u 12denních mláďat uvádíme hodnoty naměřené v arteriální a venózní krvi dospělého potkana (tabulka 15).

Tabulka 15: *Vliv oboustranného uzavěru společných krkavic po dobu 5 a 30 min na napětí krevních plynů a pH v arteriální (a. femoralis) a v žilní krvi (sinus sagitalis superior)*

Skupina	Arteriální krev			Žilní krev		
	pH	pO ₂ [kPa]	pCO ₂ [kPa]	pH	pO ₂ [kPa]	pCO ₂ [kPa]
Kontrolní	7,38±0,01	16±0,4	5±0,1	7,32±0,01	6,8±0,2	6,5±0,1
Ischemická (5 min)	7,35±0,01	15,3±0,5	4,9±0,1	7,28±0,01	5,5±0,2*	7,4±0,1*
Ischemická (30 min)	7,28±0,01	16,4±0,5	5,1±0,1	7,17±0,02	4,8±0,2*	8,4±0,2*

(upraveno podle Eklöfa a Siesjö, 1972)

V.2. CHARAKTERISTIKA ISCHEMICKÉHO POŠKOZENÍ MOZKU BĚHEM VÝVOJE PROSTŘEDNICTVÍM AKTIVITY GGT

Membránově vázaná GGT patří mezi indikátory poškození a tím i v mnoha případech propustnosti mozkové kapilární bariéry. V mozku potkana je přítomna na lumenální straně povrchu endotelových buněk mozkových kapilár, které jsou nositeli převážné části GGT aktivity v mozkové tkáni (Lisý a spol., 1979; Šťastný a spol., 1997).

Aktivita membránově vázané GGT vlivem hypoxicko-ischemického poškození mozku významně stoupá ve srovnání s kontrolami v některých oblastech mozkové kůry a hipokampu, avšak tato změna nemá trvalý charakter, neboť dospělá zvířata vystavená po narození opakované výškové hypoxii měla naopak sníženou aktivitu této formy GGT (Šťastný a spol., 1985). Z hlediska neurovývojového modelu lze tento enzymatický parametr považovat za možný ukazatel nedostatku O₂ v modelu neonatální hypoxie. Změny aktivity GGT můžeme pozorovat i jako důsledek zánětlivých změn, které hypoxicko-ischemické poškození doprovázejí (Šťastný a spol., 1997). Mohou být způsobeny zvýšením hladinami některých prozánětlivých molekul jakou je např. i zvýšená tvorba interleukinu 1 β (IL-1 β). Zjistili jsme, že v závislosti na aplikační cestě (i.v. nebo i.c.v.) infuze IL-1 β způsobuje bifázické změny v aktivitě GGT charakterizované poklesem aktivity enzymu v prvních hodinách a jejím vzestupem za 24 hodin v hipokampech dospělého potkana. Největší změny v histochemicky detekovatelné enzymové aktivitě jsme pozorovali ve stratum radiatum a stratum lacunosum-moleculare hipokampu (Kaiser a spol., 2006). Pro technické obtíže jsme podobné pozorování neprovedli u 12denních mláďat, ale z hlediska změn zjištěných u mláďat po opakované výškové hypoxii (Šťastný a spol., 1985) lze předpokládat alespoň dílčí podobu popsaných změn v aktivitě membránově vázané GGT i u našich mláďat s podvazem obou krkavic.

D'Erasmu a spol.,(1993) sledovali hladiny GGT v krevním séru u žen, které prodělaly mozkovou ischémii. U 42 žen popsali významně vyšší sérové hladiny GGT od 3. do 10. dne od mozkové příhody ve srovnání s kontrolní skupinou.

V.3. FOSFOINOSITIDOVÝ SIGNÁLNÍ SYSTÉM A cAMP JAKO UKAZATELÉ NEONATÁLNÍHO POŠKOZENÍ MOZKU U SCHIZOFRENIE

IP₃ a cAMP patří mezi druhé posly, jejichž aktivita se mění u nemocných se schizofrenií. Deficit cAMP, který nalezneme v krevních destičkách nemocných se schizofrenií, vzniká na podkladě předpokládané poruchy aktivity adenylátcyklázy, enzymu odpovědného za jeho tvorbu anebo změnami v jeho receptorové vazbě (Garver a spol., 1982). Jak je však patrné z námi zjištěných výsledků (viz. tabulka č. 8), nezaznamenali jsme žádné přetrvávající změny v plazmatické koncentraci cAMP v časně dospělosti potkana v důsledku neonatální mozkové ischemie.

Inositoltrifosfát (IP₃) je součástí signálního fosfoinositidového systému, který je přítomen v krevních destičkách jak léčených tak i neléčených schizofreniků ve vyšší koncentraci než u kontrolních osob bez neuropsychiatrické anamnézy. Abnormality fosfoinositidů v krevních destičkách nemocných se schizofrenií popsala v minulosti řada autorů. Kaiya a spol., 1989 prokázali hromadění DG a nižší resyntézu kyseliny fosfatidové v destičkách 6 pacientů se schizofrenií po stimulaci trombinem. Essali a spol., (1990) pravděpodobně jako první zjistili že koncentrace fosfoinositidů v trombocytech zdravých jedinců se v klidu výrazně neliší od koncentrace nemocných se schizofrenií. Po stimulaci trombinem dochází ke zvýšené tvorbě IP u schizofreniků, která je statisticky významnější ve srovnání se souborem hodnot získaných u zdravých dobrovolníků. Dále ukázali, že k alteraci jednotlivých součástí fosfoinositidového systému v destičkách nemocných schizofrenií dochází i vlivem léčby neuroleptiky.

Koncentrace IP₃ je statisticky významně vyšší u nemocných se schizofrenií ve srovnání se zdravými jedinci. Zvýšené hladiny tohoto „druhého posla“ přetrvávají i u

nemocných dlouhodobě léčených neuroleptiky (Řípová a spol., 1997). Hodnoty IP₃ v trombocytech se významně neliší mezi léčenými a neléčenými pacienty. Kromě vyšší hladiny fosfoinositidů byl v destičkách schizofreniků nalezen i zvýšený obsah iontů vápníku (Řípová a spol., 1999; Strunecká a Řípová, 1999). Dlouhodobě zvýšená produkce IP₃ byla pozorována jako důsledek zvýšené tvorby jeho prekurzoru, PIP₂, a to v souvislosti s desenzibilizací IP₃ receptoru, kterou lze vysvětlit sníženou odpověď Ca²⁺ v přítomnosti trombinu (Das a spol., 1992).

Vzhledem k tomu, že změny homeostázy nitrobuněčného vápníku a hladin fosfoinositidů jsou považovány za možný biologický „marker“ schizofrenie, použili jsme koncentraci IP₃ jako jednu z charakteristik našeho heuristického modelu. Získané výsledky však ukazují, že krátkodobá, neonatální mozková ischemie nezpůsobila trvalé změny IP₃ v trombocytech. Z hlediska našeho modelu proto tento ukazatel nemá výpovědní hodnotu ve prospěch jeho fenomenologické validity s nálezy u člověka.

V.4. BEHAVIORÁLNÍ CHARAKTERISTIKY NEUROVÝVOJOVÉHO MODELU SCHIZOFRENIE ZALOŽENÉHO NA ISCHEMICKÉM POŠKOZENÍ MOZKU

Chování podobné schizofrenii se v animálním modelu vyznačuje hyperlokomocí a stereotypií, které je pravděpodobně podmíněno zejména hyperaktivitou dopaminergního systému, agonisty dopaminu a nepřímo i stresem. Sociálně kognitivnímu deficitu odpovídá v animálním modelu zhoršení prostorové paměti a sociálního kontaktu mezi jedinci, které naopak souvisí s hypofunkcí NMDA receptorů (Lipská a Weinberger, 2000).

V modelu časně neonatální hypoxie jsme v prepubertálním období (22. PND) neprokázali statisticky významné změny v hravém chování mezi kontrolní a

ischemickou skupinou zvířat. Hravé chování se během ontogenetického vývoje u potkana začíná objevovat 15. PND a vrcholí mezi 30. – 36. PND, pak jeho intenzita klesá (Thor a Holloway, 1984). V našem pozorování oproti literárním údajům bylo hravé chování registrováno málo. Dokonce i ve skupině naivních zvířat (tzn. zvířat, která nebyla vystavena operačnímu zákroku) byla četnost jeho charakteristik velmi nízká. Tento rozdíl nemůžeme vysvětlit odlišnými světelnými podmínkami v průběhu pozorování (Vanderschuren a spol., 1995), protože jejich režim se po celou dobu neměnil. Domníváme se, že pokles motivace ke hře mohl nastat u mláďat v důsledku příliš krátké doby izolace od matky (3,5 hod) před měřením sociálních interakcí. Svůj význam mohl mít i jejich pozdější odstav od matky, který se v laboratořích patofyziologie mozku Psychiatrického centra provádí až 28. PND. Ani v dalších formách kontaktního chování (mounting, crowling, grooming) jsme v uvedených charakteristikách u žádné ze sledovaných skupin neprokázali statisticky významný rozdíl. Je pravdou, že žádná z dostupných studií se nezabývala hodnocením změn sociálního chování v pubertálním období za použití stejného operačního postupu, druhu zvířete i doby odstavu, jako v našem experimentu. Z výše uvedeného je proto možné se domnívat, že rozdílné chovné podmínky, především úloha matky, mohou hrát důležitou roli v procesu socializace mláďat.

Výsledky sledování explorační aktivity ukazují, že neonatálně ischemizovaná zvířata 35. PND vykazovala výrazně vyšší lokomoční aktivitu oproti kontrolní skupině. Rozdíly byly patrné zejména ve frekvenci přebíhání (crossingu) a v prodloužení latence klidové fáze (immobility). Statisticky významně se zkrátila také doba věření a klidové fáze u experimentální skupiny oproti kontrolním zvířatům. Na rozdíl od pubertálního období jsme nepozorovali žádné statisticky významné změny spontánní pohybové a explorační aktivity, které by se v důsledku neonatální ischemie projevíly v postpubertálním období (50. PND). Tento jev podporuje myšlenku existence určitého

kompenzačního mechanismu napravujícího následky perinatálního poškození, který může být projevem vyššího stupně plasticity nervové tkáně u potkana (Balduini a spol., 2000).

Projevy hyperaktivity, ale i motorické hypoaktivity jako důsledku hypoxicko-ischemického poškození mozku potkana publikovala řada autorů. Zjištěné rozdíly mezi jednotlivými studii byly pravděpodobně podmíněny rozdílnou volbou animálního modelu a výběrem zvířecího druhu nebo i kmene daného druhu. Podobné behaviorální projevy po hypoxické epizodě jaké jsme pozorovali u potkanů po narození popisují i studie publikované v nedávné době. Rogalska a spol., (2004) označili chování potkana po neonatální hypoxii, vyvolané pobytem v prostředí s vyšší koncentrací dusíku, jako bifazický proces. Ve shodě s našimi výsledky pozorovali hyperaktivitu potkana v testu otevřeného pole, která vrcholila mezi 5. a 30. PND. Druhá fáze byla provázena poklesem aktivity od 45. PND. Decker a spol., (2003) pozorovali posthypoxickou lokomoční hyperaktivitu u 35denních potkanů bez ohledu na fázi cirkadiálního cyklu. K pozorování si zvolili model intermitentní hypoxie způsobené pobytem 7denních mláďat ve speciální komoře po dobu 4 hodin. Spolu s hyperlokomocí byli potkani během světelné fáze cirkadiálního cyklu více „spaví“, přičemž v průběhu spánku převládala jeho REM fáze. Výsledky ukazují, že tato krátkodobá opakovaná hypoxie vyvolala změny prokazatelné v dospělosti jedince, zatímco ojedinělá hypoxická příhoda byla z hlediska dlouhodobých následků méně významná. Zvýšenou frekvenci vztyčování a hyperlokomoci u potkanů v období puberty popsali po 30minutové anoxii novorozených potkaních mláďat i Dell'Anna a spol., (1991).

Změny chování v důsledku hypoxicko-ischemického poškození, které postihlo mozek v ranné fázi vývoje, byly charakterizovány hyperlokomocí, stereotypií, deficitem paměti nebo narušením sociálního kontaktu. Vyskytují se jako možný

důsledek zvýšené syntézy dopaminu, která může být projevem narušené funkční integrity mesolimbických a mezokortikálních drah nebo ztrátou hipokampálních neuronů (Dell'Anna a spol., 1991; Decker a spol., 2003).

V.5. ZMĚNY ÚLEKOVÉ REAKCE A JEJÍ PREPULZNÍ INHIBICE JAKO DALŠÍ CHARAKTERISTIKA NÁMI ZVOLENÉHO ANIMÁLNÍHO MODELU SCHIZOFRENIE

Prepulzní inhibice (PPI) úlekové reakce je automatický a vůlí nekontrolovatelný proces. U člověka je měřitelná již několik měsíců po narození a její velikost kolísá až do dospělosti. Je možné ji definovat jako schopnost slabého zvukového předpodnětu inhibovat motorickou odpověď na intenzivní úlekový podnět (Graham, 1975; Koch, 1999; Bubeníková, 2002). Reakce PPI je založena na principu, který dovolí jedinci „filtrovat“ přicházející zevní podněty takovým způsobem, že ty nepodstatné ignoruje a důležité dále zpracovává, aby se jeho mozek vyvaroval zahlcení informacemi. Metoda prepulzní inhibice akustické úlekové reakce je používána jako ukazatel změn zpracování informací („sensorimotor gating“) u člověka i zvířete. Deficit prepulzní inhibice byl popsán u nemocných se schizofrenií, obsedantně-kompulzivní poruchou, Tourettovým syndromem, blefarospasmem, temporální epilepsií nebo u póůrazové stresové poruchy (Braff a spol., 2001).

První podrobná studie o PPI u potkana byla publikována Hoffmanem a Searlem (1968). U lidí byla poprvé hodnocena až o 10 let později. Na animálních modelech můžeme její deficit navodit farmakologicky (apomorfin, MK-801), ale též vnějšími zásahy do časného ontogenetického vývoje (izolace mláďat od matky, mateřská deprivace, stres nebo chemické poškození amygdaly, hipokampu či frontální mozkové kůry). Zatímco u člověka nejsou přesně známy oblasti mozku, které se účastní na její

regulaci, u potkana ji řídí kortiko-limbicko-palido-striatální okruh. Tyto oblasti mozku hrají významnou roli v patogenezi schizofrenie, která patří mezi psychiatrická onemocnění, u nichž byl prokázán deficit PPI (Swerdlow a spol., 2001). U nemocných se schizofrenií a jejich příbuzných je snížení PPI často dokumentovaným jevem a považuje se proto za neurobiologický ukazatel tohoto onemocnění (Bubeníková a spol., 2002).

V testu vlastní úlekové reakce jsme v naší studii neprokázali významný rozdíl v odpovědi mezi kontrolní a ischemickou skupinou, avšak deficit v prepulzní inhibici u zvířat po neonatální ischemické epizodě byl ve srovnání s kontrolními potkany statisticky významný. Vzhledem k těmto výsledkům se proto domníváme, že ischemické poškození mozku potkana v časné postnatálním období vede k latentním změnám ve vývoji CNS, které se projeví změnami PPI až v časně dospělosti. Obdobné změny PPI uvedl ve své přehledné práci Van den Buuse a spol., (2003). Mezi neurovývojové modely, u nichž byl zaznamenán deficit PPI, zahrnul i model sociální izolace a dočasné ztráty mateřské péče (tzv. mateřskou deprivaci), poškození hipokampu kyselinou ibotenovou a též časné poškození amygdaly. Braff a spol., (2001) ve své práci uvedl řadu studií, které zaznamenaly deficit PPI u nemocných se schizofrenií. Z tohoto pohledu se zdá volba našeho animálního modelu vhodná a to jak z hlediska konstrukční tak i predikční validity. Protože se žádná z nedávných studií nezabývala vlivem postnatální hypoxie na PPI a lokomoci v dospělosti (Fortier a spol., 2004; Decker a spol., 2003), je možné považovat uspořádání našeho pozorování v mnoha ohledech za původní. Výjimkou je v tomto směru Jansenova studie, která prokázala přítomnost sensorimotorického deficitu u dospělých potkanů, který vznikl v důsledku neonatálního hypoxicko–ischemického poškození mozku. Ke stanovení deficitu nebyla použita metoda PPI, ale byla měřena doba, po kterou byla zvířata schopna setrvat uvnitř rotujícího kola (Jansen a Low, 1996).

V.6. PERINATÁLNÍ HYPOXICKÉ POŠKOZENÍ JAKO HEURISTICKÝ ANIMÁLNÍ MODEL SCHIZOFRENIE

Neurovývojový model schizofrenie je založen na hypotéze, že schizofrenie vzniká v důsledku chybného vývoje mozku. Mezi nezanedbatelné neurovývojové faktory, jejichž frekvence výskytu je u nemocných se schizofrenií vyšší než u zdravé populace či nemocných s jinými psychiatrickými diagnózami patří porodní a těhotenské komplikace. Lewis a Murray (1987) prokázali, že výskyt těchto komplikací v porodní anamnéze, a to zejména u mužských jedinců, souvisel s následně těžším průběhem schizofrenie. K podobnému závěru na větším souboru nemocných dospěli i Smith a spol., (1995). Mimoto zjistili, že tyto komplikace neměly vliv na časnější začátek nemoci ani na výsledný efekt léčby.

Experimentální poškození vyvíjejícího se mozku vede ke změně jeho funkce s důsledky pro celkové chování jedince. Neurovývojový model nám proto umožnil ověřit si významnost neonatální ischemie jako možného etiopatogenetického faktoru, který se vyskytuje nejčastěji během perinatálního období. Cílem bylo přispět k lepšímu pochopení tohoto rizikového faktoru v patofyziologii schizofrenie. Podle některých epidemiologických studií je právě mozková hypoxie faktorem, který zvyšuje riziko předčasného vzniku schizofrenie (Jones a spol., 1998; Cannon a spol., 2000; Cannon a spol., 2002; Rantakallio a spol., 1987). I přes tyto závěry však přímá příčinná souvislost mezi hypoxií a vznikem schizofrenie dosud prokázána nebyla.

Již v minulosti práce Owena a spol., (1988) poukázala na vyšší výskyt porodních komplikací v anamnéze nemocných se schizofrenií, ač byl zaznamenán i u jiných psychiatrických onemocnění. V poslední době Höschl a spol., (2004) uvedli, že následkem porodních komplikací vznikají periventrikulární ložiska krvácení, která jsou důsledkem pre- nebo perinatální hypoxie, kdy poškození neuronů je provázeno

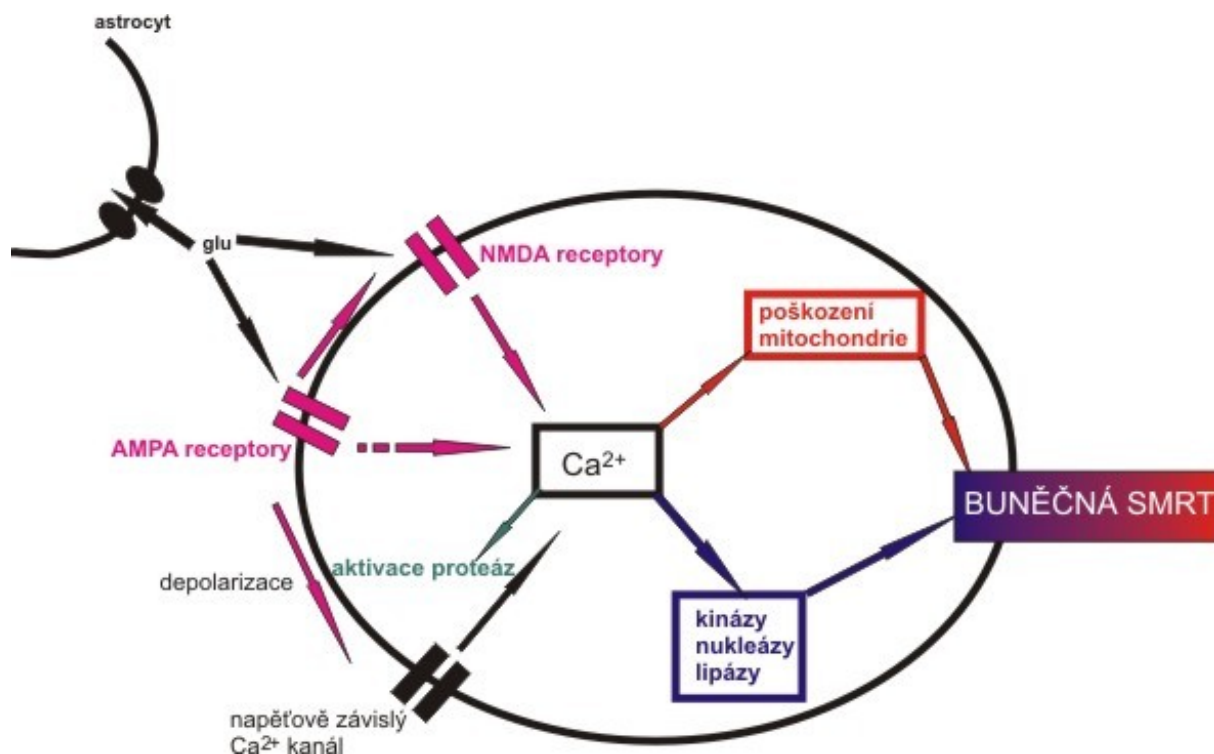
poruchou neuronálního spojení nebo i neuronální smrtí. Přestože schizofrenie je onemocnění objevující se typicky u lidí, pro řadu existujících podobností mezi potkanem a člověkem lze použít animálních modelů k tomu, abychom přesněji vymezili vliv změn v krevním průtoku mozku, které jsou důsledkem ischemické epizody, na rozvoj abnormalit podobných psychóze. Na rozdíl od člověka je možné tento vliv nedostatku kyslíku přesně charakterizovat a jeho důsledky studovat po celou délku života potkana.

Porucha mozkové perfuze a následný pokles přívodu krve a tím i kyslíku a živin do mozku je hlavní příčinou jeho perinatálního poškození. Přibližně 3 - 9 novorozenců z tisíce narozených dětí postihne nějaká forma perinatální ischemicko-anoxické příhody nebo protražované hypoxie. K takové situaci dochází nejčastěji při komplikacích jako jsou placentární dysfunkce, protražovaný či předčasný porod nebo při kardiopulmonální resuscitaci (Tuor a spol., 1996). Krátkodobá apnoe s mírnou asfyxií se vyskytne u 59 – 84 % dětí narozených před 36. týdnem těhotenství. Tyto předčasně narozené děti jsou velice rizikovou skupinou z pohledu možného vzniku schizofrenie (Henderson–Smart, 1981).

V.7. EXCITOTOXICKÉ POŠKOZENÍ VYVOLANÉ ISCHÉMIÍ A JEHO SROVNÁNÍ S ÚČINKEM NAAG A KYSELINY CHINOLINOVÉ

Za normálních podmínek glutamát prostřednictvím ionotropních a metabotropních receptorů ovlivňuje řadu morfogenetických procesů, od neurogeneze a růstu axonů, až po správnou tvorbu a stabilizaci synapsí (Nguyen a spol., 2001). Zvýšená aktivace ionotropních glutamátových receptorů NMDA a AMPA typu nebo inhibice transportérů pro glutamát je příčinou „excitotoxického“ poškození mozku nebo

i zániku nervových buněk. Současně se předpokládá, že excitotoxicky poškozené neurony, které by za normálních podmínek zajišťovaly synaptické spoje s jinými neurony, sekundárně spustí apoptotický zánik nezapojených neuronů (Young a spol., 2004). Podstatou excitotoxického poškození mozkové tkáně je zvýšená koncentrace glutamátu, která vede k aktivaci uvedených receptorů. Prostřednictvím AMPA receptorů dochází k aktivaci receptorově řízených kanálů přednostně propustných pro Na^+/K^+ a k následné depolarizaci membrány, jejímž důsledkem je uvolnění Mg^{2+} z iontového kanálu NMDA receptoru. Déletrvající depolarizace vede ke vstupu nejen Na^+ , ale pasivně i Cl^- a vody do buňky, podmiňující její edémové zbobtnání, poškození organel a v konečném důsledku vede až k buněčné smrti. Intracelulární koncentrace Ca^{2+} se zvýší po aktivaci NMDA receptoru prostřednictvím receptorově řízených kanálů přednostně propustných pro ionty Ca^{2+} . Aktivace Ca^{2+} -dependentních enzymů vede ke zvýšené produkci NO a volných radikálů a k následnému poškození mitochondrií a dalších buněčných organel, a nakonec k fragmentaci DNA a k zániku buňky (viz obrázek 11). Uvolněním glutamátu ze zanikajících buněk však dále stoupá jeho extracelulární koncentrace, takže se poškození nejen prohlubuje, ale i šíří do okolí.



Obrázek 11: Schématické znázornění mechanismu vedoucího k excitotoxickému poškození nervové buňky. Excitotoxické poškození je způsobeno nadměrnou aktivací NMDA a AMPA receptorů nebo inhibicí transportéru pro glutamát (upraveno podle Fonnum a Lock, 2004).

Dříve než provedeme srovnání jednotlivých heuristických modelů, bude vhodné si připomenout a charakterizovat konkrétní zástupce. *N*-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát (NAAG) jako agonista metabotropních glutamátových receptorů skupiny II (mGluR II), především podtypu mGluR 3, působí neuroprotektivně při jejich aktivaci (Orlando a spol., 1997). Jeho hydrolýza však vede k hromadění glutamátu, který prostřednictvím NMDA receptorů může působit excitotoxicky. U pacientů se schizofrenií byly nalezeny zvýšené hladiny tohoto dipeptidu v hipokampu a v prefrontální mozkové kůře (Tsai a spol., 1995).

Další neurotoxickou látkou, která je endogenním metabolitem L-tryptofanu vznikajícím v L-kynureninové dráze, je kyselina chinolinová (QUIN). Její zvýšená

produkce aktivovanou mikroglií a makrofágy vede k nadprodukcí chemokinů, které dále zvyšují přestup leukocytů a makrofágů z krevního řečiště do mozku (Schiefer a spol., 1998). QUIN však je i slabým agonistou NMDA receptorů s exprimovanou NR2A/NR2B podjednotkou, takže sama působí neuroexcitotoxicky (Šťastný a spol., 2005)

Sociální a hravé chování v období puberty (22. PND) se v případě ischemického modelu podobá modelu s aplikací NAAG. V obou případech jsme nezaznamenali statisticky významné změny. Zcela odlišná je situace u zvířat, kterým byla infundována QUIN. Vzniklý deficit v trvání hravého chování je významný v porovnání jak s kontrolními zvířaty, tak se zvířaty po neonatální infuzi NAAG či po ischemické epizodě.

Statisticky významné zvýšení frekvence horizontálního pohybu 35. den a zvýšená frekvence exploračních aktivit (tabulka č.11) jsou odrazem zvýšené pohybové aktivity po proběhlé neonatální ischemii. Tímto výsledkem se náš animální model zásadně odlišuje od zvířat jimž byl do mozkových komor neonatálně infundován NAAG nebo QUIN. Po infuzi NAAG se lokomoční aktivita nezměnila a po QUIN jen nevýznamně. Ischemii podobná hyperlokomoce pozorovaná v našem modelu byla popisována i po podání dopaminergních látek nebo antagonistů NMDA receptorů. Ukazuje se, že neonatální ischemie mozku modeluje situaci, která v případě psychóze podobném chování potkana fenomenologicky odpovídá psychotickým příznakům u člověka (Lipská a Weinberger, 2000).

V období rané dospělosti (50. PND) jsme u ischemického modelu žádné významné změny chování nepozorovali. V modelu psychózy založeném na neonatální infuzi QUIN jsme však ve stejném období prokázali statisticky významné změny v aktivitách zjištěných ve volném poli. Po infuzi NAAG se ve srovnání s příslušnou kontrolní skupinou statisticky významně prodloužila jen doba čištění (Bubeníková-

Valešová a spol., 2006).

Jak dále vyplývá z vlastního pozorování, velikost akustické úlekové reakce (50. PND) se následkem neonatální ischemie (12. PND) zvýšila, avšak ve srovnání s kontrolní skupinou tento vzestup nedosáhl statistického významu. Na druhé straně jsme prokázali statisticky významný deficit prepulzní inhibice při použití námi zvolených intenzit předpoklady. Pozorovaná změna prepulzní inhibice je mírou deficitu ve zpracování informací a podporuje tak validitu našeho modelu při ověřování neurovývojové hypotézy schizofrenie, ve kterém i neonatální ischemie mozku je rizikovým faktorem. Snížení PPI je často dokumentovaným jevem právě u pacientů se schizofrenií a jejich příbuzných a považuje se za neurobiologický ukazatel tohoto onemocnění (Bubeníková a spol., 2002). Použití stejných testů v modelu s intracerebroventrikulární aplikací NAAG 12. PND nevedlo ke změnám ani úlekové reakce ani prepulzní inhibice. V tomto ohledu není model neonatálního ischemického poškození srovnatelný s modelem založeným na poškození NAAG. Naopak, vzhledem k tomu, že neonatální excitotoxická léze kyselinou kainovou (7. PND) měla za následek pokles PPI u dospělých potkanů (56. PND) a podobně i neonatální léze ventrálního hipokampu způsobená kyselinou ibotenovou poškodila PPI u dospělých potkanů (56. PND), má námi diskutovaný ischemický model blíže k těmto neurovývojovým modelům (Howland a spol., 2004, Lipská a spol., 1995).

Změny chování a prepulzní inhibice, které vznikly v období puberty a časně dospělosti v důsledku excitotoxického poškození čichové kůry mozku novorozeného potkana kyselinou ibotenovou, popsali Schmadel a spol., (2004). Autoři se však domnívají, že pokud vznikne poškození v novorozeneckém období, nedochází k významnému narušení prepulzní inhibice díky schopnosti kompenzovat ztrátu sensorimotorického gatingu reorganizací kortikoakumbeálního systému. Bylo by proto třeba zjistit, kdy se tento defekt objevuje. Zvířata s neonatální lézí NAAG dokázala

v časně dospělosti zpracovávat senzomotorické informace stejně jako kontrolní zvířata. Naopak neonatální excitotoxické poškození mozku kyselinou kainovou (7. PND) nebo QUIN (12. PND) mělo za následek pokles PPI u dospělých potkanů (50. PND) jak uvádějí některé práce (Howland a spol., 2004; Šťastný a spol., 2005). Podle Lipské a spol. (1995) způsobuje neonatální poškození ventrálního hipokampu kyselinou ibotenovou (56. PND) deficit PPI u mladého dospělého potkana. Z pohledu ovlivnění velikosti akustické reakce a zejména její PPI je ischemický model srovnatelný s modely, ve kterých bylo použito kyseliny kainové, ibotenové nebo chinolinové. Z pohledu ovlivnění velikosti PPI se ischemický model významněji odlišuje jen od modelu s neonatální infuzí NAAG.

VI. Závěr

Výsledky naší práce dokládají, že námi vypracovaný a experimentálně ověřovaný dvouvaskulární model mozkové ischemie se vyznačuje jistou mírou jak konstrukční, fenomenologické a tím i predikční validity. Vzniklé ischemicko-hypoxické poškození, které jsme navodili dočasným uzávěrem obou společných krkavic 12. PND u potkana, lze s přihlédnutím k rozdílnému stupni zralosti funkcí přirovnat k situaci způsobené porodní hypoxií lidského novorozence. Přes dílčí rozdíly ve vybraných biochemických ukazatelích (napětí krevních plynů, aktivita GGT, ale i 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 rizikovým faktorem pro vznik schizofrenie, a to především u jedinců s genetickým rizikem jaké představují jednonukleotidové polymorfizmy kandidátních genů (Šťastný a spol., 2004, 2005, 2007).

VII. Seznam publikací

Publikace in extenso 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 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. 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)**
8. Beneš V., Buchvald P., Kaiser M., Mikuláščík J., Suchomel P.: *Centrální neurocytom: kasuistika a přehled literatury. *Cesk Slov Neurol (přijato do tisku)**

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. *Physiol Res 52, 37P; (2003)**
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 -glutamyl transpeptidase activity in adult rat brain. *Physiol Res 52, 41P; (2003)**

4. Kaiser M., Buchvald P., Suchomel P.: *Chirurgická léčba extramedulárních tumorů míchy, Pracovní dny České neurochirurgické společnosti, (2001)*
5. Kaiser M.: *Naše zkušenosti s měřením ICP 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, (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, XII. Jihočeské onkologické dny (Sborník abstrakt), (2005)*
10. Kaiser M., Macháňová M., Hrušková L.: *Problematika léčby primárních míšních tumorů, XI. dny profesora Vladimíra Staška, (2005)*
11. Macháňová M., Kaiser M., Hrušková L.: *Dispenzární péče u nemocných po léčbě primárních mozkových nádorů, XI. dny profesora Vladimíra Staška, (2005)*

VIII. Literatura

1. Andersen M.B., Zimmer J., Sams-Dodd F.: *Specific behavioral effects related to age and cerebral ischemia in rats. Pharmacol Biochem Behavior* 62; (1998): 673-682
2. Andreasen N.C.: *Schizophrenia: the fundamental questions. Brain Res Rev* 31(2-3); (2000): 106-112.
3. Araki T., Kato H., Kanai Y., Kogure K.: *Postischemic changes of intracellular second messengers in the gerbil brain after long-term survival: an autoradiographic study. Neuroscience* 53; (1993): 829-836
4. Avery G.B., Fletcher M.A., MacDonald M.G.: *Pathophysiology and management of the newborn. In: Neonatology (4th ed.), Lippincott, (1994)*
5. Balduini W., De Angelis V., Mazzoni E., Cimino M.: *Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Res* 859; (2000): 318-325
6. Bankir L., Ahloulay M., Devreotes P.N., Parent A.C.: *Extracellular cAMP inhibits proximal reabsorption: are plasma membrane cAMP receptors involved? Am J Physiol Renal Physiol* 282; (2002): 376-392
7. Barcroft J.: *Anoxemia. Lancet* 2; (1920): 485-489
8. Benešová O., Tejkalová H., Křištofíková 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
9. Bittigau P., Ikonomidou Ch.: *Glutamate in neurologic diseases. J Child Neurol* 12; (1997): 471-485
10. Blomqvist P., Lindvall O., Stenevi U., Wieloch T.: *Cyclic AMP concentrations in rat neocortex and hippocampus during and following incomplete ischemia: effects of central noradrenergic neurons, prostaglandins, and adenosine. J Neurochem* 44; (1985): 1345-1353
11. Boksa P.: *Animal model of obstetric complications in relation to schizophrenia. Brain Res Rev* 45; (2004): 1-17
12. 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

13. Brown A.W., Brierley J.B.: *The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optical microscope. Br J Exp Path* 49; (1968): 9-106
14. Bubeníková-Valešová V., Balcar V.J., Tejkalová H., Langmeier M., Šťastný F.: *Neonatal administration of N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamate induces early neurodegeneration in hippocampus and alters behaviour in young adult rats. Neurochem Int* 6-7; (2006): 512-522
15. Bubeníková V., Horáček J., Benešová O., Šťastný F.: *Animální modely schizofrenie. Psychiatrie* 7; (2003): 26-30
16. Bubeníková V., Horáček J., Šťastný F.: *Prepulzní inhibice úlekové reakce jako ukazatel deficitu zpracování informací. Psychiatrie* 6(1); (2002): 29-32
17. Busto R., Dietrich W.D., Globus M.Y., Ginsberg M.D.: *Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. Neurosci Lett* 101; (1989): 299-304
18. Cannon M., Jone P.B., Murray R.M.: *Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. Am J Psychiatry* 159; (2002): 1080– 1092
19. Cannon M., Rosso I.M., Hollister J.M., Bearden C.E., Janchez L.E., Hadley T.: *A prospective cohort study of genetic and perinatal influences in the etiology of schizophrenia. Schizophr Bull* 26; (2000): 351-366
20. Carlsson A.: *The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. Neuropsychopharmacology* 1; (1988): 179-186
21. Carlson N.: *Physiology of behaviour, Pearson Education Inc., (2004)*
22. Carter B.S., Haverkamp A.D., Merenstein G.B.: *The definition of acute perinatal asphyxia. Clin Perinatol* 30; (1993): 287-30
23. Cavelier L., Jazin E., Eriksson I., Prince J., Bave B., Orelan L. and Gyllensten U.: *Decreased cytochrome c oxidase activity and lack of age related accumulation of mtDNA in brain of schizophrenics. Genomics* 29; (1995): 217-228
24. Cregan E.F., Peeling J., Corbett D., Buchan A.M., Saunders J., Auer R.N., Gao M., Mccarthy D.J., Eisman M.S., Campbell T.M., Murray R.J., Stagnitto M.L. and Palmer G.C.: *[(S)-Alpha-phenyl-2, pyridine-ethanamine dihydrochloride], a low affinity uncompetitive N-methyl-D-aspartic acid antagonist, is effective in rodent models of global and focal ischemia. J Pharmacol Exp Ther* 283; (1997): 1412-1424

25. Das I., Essali M.A., De Bellerocche J., Hirsch S.R.: *Inositol phospholipid turnover in platelets of schizophrenic patients. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 46; (1992): 65-66
26. 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
27. 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
28. D'Erasmus E., Acca M., Medici F., Pisani D.: *Clinical aspects of early increase in serum gamma-glutamyl transferase in cerebral infarction. Biomed Pharmacother* 47; (1993): 89-92
29. Dobbing J., Sands J.: *Quantitative growth and development of human brain. Arch Disease in Childhood* 48; (1973): 757-767
30. Donát P.: *Measuring behaviour: The tools and the strategies. Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 15; (1991): 447-454
31. Dror N., Klein E., Karry R., Sheinkman A., Kirsh Z., Mazor M., Tzukerman M., Ben-Shachar D.: *State dependent alterations in mitochondrial complex I activity in platelets: a potential peripheral marker for schizophrenia. Mol Psychiatry* 7; (2002): 995-1001
32. Drtílková I.: *Význam prenatálních a perinatálních komplikací z hlediska neurovývojového modelu schizofrenie. Psychiatrie* 3; (2001): 175-781
33. 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
34. El-Khodor B.R., Boksa P.: *Birth insult increases amphetamine induced responses in the adult rat. Neuroscience* 87; (1998): 893-904
35. Ellenbroek B.A., Cools A.R.: *Early maternal deprivations and prepulse inhibition: the role of postdeprivation environment. Pharmacol Biochem Behav* 73; (2002): 177-184
36. Erlenmeyer-Kimling L., Rock D., Roberts S.A., Janal M., Kestenbaum C., Cornblatt B., Adamo U.H., Gottesman I.I.: *Attention, memory, and motor skills as childhood predictors of schizophrenia-related psychoses: the New York High-Risk Project. Am J Psychiatry* 157; (2000): 1416-1422

37. Essali M.A, Das I., Bellerocche J.: *The platelet polyphosphoinositide system in schizophrenia: The effects of neuroleptic treatment. Biol Psychiatry* 28; (1990): 475-487
38. Evrard P.: *Pathophysiology of perinatal brain damage. Dev Neurosci* 23; (2001): 171-174
39. Fischer J., Jílek L., Trojan S.: *Qualitative and quantitative neurohistological changes produced in the rat brain by prolonged aerogenic hypoxia in early ontogeny. Physiol Bohemoslov* 23; (1974): 211-219
40. Fischer J., Langmeier M., Trojan S.: *Changes in the length and width of the postsynaptic density, the width of the intersynaptic density and the synaptic cleft in the cerebral cortex synapses of rats exposed to prolonged aerogenic hypoxia during early ontogenesis. An electron microscopic morphometric study. Physiol Bohemoslov* 29; (1980): 561-567
41. Flores C., Stewart J., Salmaso N., Zhang Y. a Boksa P.: *Astrocytic basic fibroblast growth factor expression in dopaminergic regions after perinatal anoxia. Biol Psychiatry* 52; (2002): 362-370
42. Fonnum F., Lock E.A.: *The contributions of excitotoxicity, glutathione depletion and DNA repair in chemically induced injury to neurones: exemplified with toxic effects on cerebellar granule cells. J Neurochem* 88; (2004): 513-531
43. Fortier M.E., Joober R., Luheshi G.N., Boksa P.: *Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine – induced locomotion and startle response in adult rat offspring. J Psychiatr Res* 38; (2004): 335-345
44. Fujisawa H., Maxwell W.L., Graham D., Reasdale G.M., Bullock R.: *Focal microvascular occlusion after acute subdural haematoma in the rat: A mechanism for ischemic damage and brain swelling? Acta Neurochir Scandinavica Suppl* 60; (1994): 193-196
45. Gao X., Sakai K., Roberts R.C., Conley R.R., Dean B. a Tamminga C.A.: *Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: Effects of schizophrenia. Am J Psychiatry* 157; (2000): 1141-9
46. Garver D.L., Johnon C., Kanter D.R.: *Schizophrenia and reduced cyclic AMP production: evidence for the role of receptor – linked events. Life Sci* 31; (1982): 1987-1992

47. Geddes R., Vannucci R.C., Vannucci S.J.: *Delayed cerebral atrophy following moderate hypoxia-ischemia in the immature rat. Dev Neurosci* 23; (2001): 180-185
48. Ginsberg M.D., Busto R.: *Rodent models of cerebral ischemia—review. Stroke* 20; (1989): 1627-1642
49. Graham F.K.: *The more or less startling effects of weak prestimulation. Psychophysiology* 32; (1975): 238-248
50. Greene E.H.: *Anatomy of the rat. Hafner Publishing Co, (1959)*
51. Heaton R., Paulsen J.S., McAdams L.A., Kuck J., Zisook S., Braff D., Harris J., Jeste D.V.: *Neuropsychological deficits in schizophrenics. Relationship to age, chronicity, and dementia. Arch Gen Psychiatry* 51; (1994): 469-476
52. 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
53. Hicks S.P.: *Brain metabolism in vivo. 1. The distribution of lesions caused by cyanide poisoning, insulin hypoglycemia, asphyxia in nitrogen and fluoroacetate poisoning in rats. Arch Pathol* 49; (1950): 111-137
54. Hill A.: *Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term infant. Pediatr Neurol* 7; (1991): 317-325
55. Hiramatsu K., Kassell N.F., Gotto Y., Soleau S., Lee K.S.: *A reproducible model of reversible, focal, neocortical ischemia in Sprague-Dawley rat. Acta Neurochir* 120; (1993): 66-71
56. Hoffman H.S., Searle J.L.: *Acoustic and temporal factors in the evocation of startle. J Acoust Soc Am* 43; (1968): 269-282
57. Höschl C., Libiger J., Švestka J.: *Psychiatrie, Tigris 2. vydání, (2004): 352-412*
58. Howland J.G., Hannesson D.K., Phillips A.G.: *Delayed onset of prepulse inhibition deficits following kainic acid treatment on postnatal day 7 in rats. Eur J Neurosci* 20; (2004): 2639-2648
59. Hultman C.M., Ohman A., Cuattinguis S., Wieselgren I.M., Lindstrom L.M.: *Prenatal and neonatal risk factors for schizophrenia. Br J Psychiatry* 170; (1997): 128-133
60. Chi O.Z., Liu X., Weiss H.R.: *Effects of endothelin-1 on blood-brain permeability during focal cerebral ischemia in rats. Exp Brain Res* 141; (2001): 1-5
61. Iwasaki Y., Ito S., Suzuki M., Nagahori T., Yamamoto T. and Konno H.: *Forebrain ischemia induced by temporary bilateral common carotid occlusion in normotensive rats. Journal of the Neurological Sciences* 90; (1989): 155-165

62. Jablensky A.: *The 100-year epidemiology of schizophrenia. Schizophr Res 28; (1997): 111-125*
63. Jansen E.M., Low W.C.: *Long-term effect of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor tasks in rats. Behav Brain Res 78; (1996): 189-194*
64. 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*
65. Jilek L.: *Stagnační hypoxie a anoxie mozku v průběhu ontogeneze, SZdN, (1966)*
66. Jilek L., Antošová R., Dravid A.R., Fischer J., Haber B., Janata V., Králová A., Krásný J., Krulich L., Rychlík I., Sirakova I, Sirakov L., Trávníčková E., Trojan S., Večerek B., Wagner J.: *Ontogenesis of the Brain, Charles University Press, (1967) 143-157*
67. Jones P.B., Rantakallio P., Hartikainen A.L., Isohanni M., Sipila P.: *Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: a 28-year follow-up of the 1996 North Finland general population birth cohort. Am J Psychiatry 155; (1988): 355-364*
68. 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*
69. Kaiya H.: *Second messenger imbalance hypothesis of schizophrenia. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 46; (1992): 33-38*
70. Kaiya H., Nishida A., Imai A., Nakashima S., Nozawa Y.: *Accumulation of diacylglycerol in platelet phosphoinositide turnover in schizophrenia: a biological marker of good prognosis? Biol Psychiatry 26; (1989): 669-676*
71. Kaneko D., Nakamura N., Ogawa T.: *Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: development of a new experimental model. Stroke 16; (1985): 76-84*
72. Koch M.: *The neurobiology of startle. Progress in Neurobiology 59; (1999): 107-128*
73. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G.: *Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jap J Stroke 8; (1986):1-8*
74. Koroleva V.I., Korolev O.S., Loseva E., Bureš J.: *The effect of MK-801 and of brain-derived polypeptides on the development of ischemic lesion induced by*

- photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in rats. Brain Res 786; (1998): 104-114*
75. Kozler P.: *Experimentální in vivo modely ischemie mozku. Čs fyziologie 51; (2002): 61-68*
 76. Krulich L., Jílek L., Trojan S.: *The effect of oligemia on the content of glycogen and lactic acid in the brain of the rat during ontogeny. Physiol Bohemoslov 11; (1962): 58-63*
 77. Křeček J.: *Údobí odstavu a vodní metabolismus. Praha, 1962*
 78. Kung L., Roberts R.C.: *Mitochondrial pathology in human schizophrenic striatum: a post-mortem ultrastructural study. Synapse 31; (1999): 67-75*
 79. Laing R.J., Jakubowski J., Laing R.W.: *Middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 24; (1993): 294-298*
 80. Lambertsen Ch.J.: *Medical Physiology, Vol.2, Mountcastle, V.B.Ed., C.V.Mosby, St.Louis,1974,1538*
 81. Langmeier M., Marešová D.: *Intermitentní hypobarická hypoxie během vývoje – morfologické změny v neokortexu a hipokampu. Čs fyziologie 47; (1998): 62-66*
 82. Langmeier M., Pokorný J., Mareš J., Mareš P., Trojan S.: *Effect of prolonged hypobaric hypoxia during postnatal development on myelination of the corpus callosum in rats. J Hirnforsch 28; (1987): 385-395*
 83. Levine S.: *Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. Amer J Pathol 36; (1960): 1-17*
 84. Lewis S.W. and Murray R.M.: *Obstetric complications, neurodevelopmental deviance, and risk of schizophrenia. J Psychiat Res 21; (1987): 413-421*
 85. Liddle P.F.: *The symptoms of chronic schizophrenia: a re-examination of the positive-negative dichotomy. Br J Psychiatry 151; (1987): 145-151*
 86. Lipská B.K., Weinberger D.R.: *To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. Neuropsychopharmacology 23; (2000): 223-239*
 87. Lipská B.K., Swerdlow N.R., Geyer M.A., Jaskiw G.E., Braff D.L., Weinberger D.R.: *Neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats causes postpubertal changes in prepulse inhibition of startle and its disruption by apomorphine. Psychopharmacology 27; (1995): 47-54*
 88. 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.*

89. Lisý V., Šťastný F., Lodin Z.: *Gamma-glutamyl transpeptidase activity in isolated cells and in various regions of the mouse brain during early development and aging. Physiol Bohemoslov 32(1); (1983):1-9*
90. Ljunggren B., Schutz H., Siesjö B.K.: *Changes in energy state and acid-base parameters of the rat brain during complete compression ischemia. Brain Res 73; (1974): 277-289*
91. Longa Z.E., Weinstein R.P., Carlson S., Cummins R.: *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 20; (1989): 84-91*
92. Lubics A., Reglödi D., Tamás A., Kiss P., Szalai M., Szalontay L., Lengvári I.: *Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. Behav Brain Res 157; (2005): 157-165*
93. Maurer I., Moller H.J.: *Inhibition of complex I by neuroleptics in normal human brain cortex parallels the extrapyramidal toxicity of neuroleptics. Mol Cell Biochem 174; (1997): 255-259*
94. McDonald R.L., Stoodley M.: *Pathophysiology of cerebral ischemia. Neurol Med Chir 38; (1998): 1-11*
95. McIlwain H.: *Biochemistry and the Central Nervous System. London, 1959*
96. McNeil T.F., Cantor-Graae E., Ismail B.: *Obstetric complications and congenital malformation in schizophrenia. Brain Res Rev 31; (2000): 166-178*
97. Mossakowski M.J., Lossinsky A.S., Pluta R., Wisniewski H.M.: *Abnormalities of the blood-brain barrier in global cerebral ischemia in rats due to experimental cardiac arrest. Acta Neurochir Suppl 60; (1994): 274-276*
98. Nagasawa H., Kogure K.: *Correlation between cerebral blood flow and histological changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. Stroke 20; (1989): 1037-1043*
99. Nakayama H., Dietrich W.D., Watson B.D., Busto R., Ginsberg M.D.: *Photothrombotic occlusion of rat middle cerebral artery: Histopathological and hemodynamic sequelae of acute recanalization. J Cereb Blood Flow Metab 8; (1988): 357-366*
100. Nečas E.: *Pathophysiology of Oxygen Supply in Organism and in Its Tissues, Avicenum, (1982)*
101. Nguyen L., Rigo J.M., Rocher V., Belachew S., Malgrange B., Rogister B., Leprince P., Moonen G.: *Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. Cell Tissue Res 305; (2001): 187-202*

102. 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
103. Okamoto K., Yamori Y., Nagaoka A.: Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res (Suppl I)* 34-35; (1974): 143-153
104. Olney J.W., Labruyere J., Wang G., Wozniak D.F., Price M.T., Sesma M.A.: NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254; (1991): 1515-8
105. Orlando L.R., Luthi-Carter R., Standaert D.G., Coyle J.T., Penny Jr J.B., Young A.B.: N-acetylaspartylglutamate (NAAG) protects against rat striatal quinolinic acid lesions in vivo. *Neurosci Lett* 236; (1997): 91-94
106. Overgaard K., Sereghy T., Boysen G., Pedersen H., Hoyer S., Diemer N.H.: A rat model of reproducible cerebral infarction using thrombotic blood clot emboli. *J Cereb Blood Flow Metab* 12; (1992): 484-490
107. Owen M.J., Lewis S.W. and Murray R.M.: Obstetric complications and schizophrenia: a computed tomographic study. *Psychol Med* 18; (1988): 331-339
108. Payan H.M., Levine S., Strebel R.: Effects of cerebral ischemia in various strains of rats. *Cerebral Ischemia in Rats* 28; (1965): 208-209
109. Pokorný J., Trojan S.: The development of hippocampal structure and how it is influenced by hypoxia. *Acta Univ Carol Med Monographia* 113; (1986)
110. Prado R., Busto R., Globus M.Y.: Ischemia-induced changes in extracellular levels of striatal cyclic AMP: role of dopamine neurotransmission. *J Neurochem* 59; (1992): 1581-1584
111. Prince J.A., Blennow K., Gottfries C.G., Karlsson I. and Oreland L.: Mitochondrial function in differentially altered in the basal ganglia of chronic schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 21; (1997): 372-379
112. Przedborski S., Jackson-Lewis V., Muthane U., Jiang H., Ferreria M., Naini A.B. and Fahn S.: Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann Neurol* 34; (1993): 715-723
113. Pulsinelli W.A., Brierley J.B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10; (1979): 267-272
114. Pulsinelli W.A., Levy D.E., Duffy T.E.: Cerebral blood flow in the four-vessel occlusion rat model. *Stroke* 14; (1983): 832-833

115. Quinn R.: *Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?* *Nutrition* 21; (2005): 775-777
116. Rantakallio P., von Wendt L., Koivu M.: *Prognosis of perinatal brain damage: a prospective study of a one year birth cohort of 12 000 children.* *Early Hum Dev* 15; (1987): 75-84
117. Rapoport J.L., Addington A.M., Frantou S.: *The neurodevelopmental model of schizophrenia (review).* *Molec Psychiatry* 10; (2005): 134-449
118. Rice J.E. III., Vanucci R.C., Brierley J.B.: *The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat.* *Ann Neurol* 9; (1981): 131-141
119. Rittenhouse S.E., Sasson J.P.: *Mass changes in myoinositol trisphosphate in human platelets stimulated by trombin.* *J Biol Chem* 260; (1985): 8657-8660
120. 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
121. 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
122. Řípová D., Strunecká A., Farská I., Němcová V.: *Calcium induced alterations in phospholipids in platelets of schizophrenic patients.* *Physiol Res* 46; (1997): 59-68
123. Řípová D., Strunecká A., Platilová V., Höschl C.: *Phosphoinositide signalling system in platelets of schizophrenic patients and the effect of neuroleptic therapy.* *Prostaglandins, Leukotrienes and Essentials Fatty Acids* 61; (1999): 125-129
124. Sarnat H.B., Sarnat M.S.: *Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study.* *Archives of Neurology* 33; (1976): 696-705
125. Scremin O.U.: *Cerebral vascular system.* In: *The Rat Nervous System, 2nd Edition*, Academic Press; (1995): 3-35
126. Shachar D.B.: *Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: a possible linkage to dopamine.* *J Neurochem* 83; (2002): 1241-1251
127. Schiefer J., Topper R., Schmidt W., Block F., Heinrich P.C., Noth J., Schwarz M.: *Expression of interleukin 6 in the rat striatum following stereotaxic injection of quinolinic acid.* *J Neuroimmunol* 89; (1998): 468-576
128. Schmadel S., Schwabe K. a Koch M.: *Effects of neonatal excitotoxic lesions of the entorhinal cortex on cognitive functions in the adult rat.* *Neuroscience* 128; (2004): 365-374

129. Schreiber M., Trojan S., Šťastný F.: *Effects of glucose, insulin and flunarizine on the resistance of respiratory neurons to acute anoxia in young rats. In: Ontogenesis of the Brain, The Biochemical, Functional and Structural Development of the Nervous System. Charles Univ. Press, Volume 4; (1987): 523-528*
130. Siemkowicz E., Hansen A.J.: *Clinical restitution following cerebral ischemia in hypo- normo- and hyperglycemic rats. Acta Neurol Scand 58; (1978): 1-8*
131. Siesjö B.K.: *Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia – part I. J Neurosurg 77; (1992): 169-184*
132. 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*
133. Smith G.N., Honer W.G., Kopala L., MacEwan G.W., Altman S., Smith A.: *Obstetric complications and severity of illness in schizophrenia. Schizophrenia Research 14; (1995): 113-120*
134. Strunecká A., Řípková D.: *What can the investigation of phosphoinositide signaling system in platelets of schizophrenic patients tell us? Prostaglandins, Leukotrienes and Essential fatty Acids 61; (1999): 1-5*
135. Swerdlow N.R., Geyer M.A., Braff D.L.: *Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. Psychopharmacology 156; (2001): 194-215*
136. 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*
137. 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*
138. Šťastný F., Antošová 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*
139. Šťastný F., Tejkalová H., Skuba I., Páleníček T., Pliss L., Mareš V., Křištofiková Z., Kaiser M., Höschl C., Bubeníková V. a Balcar V.J.: *Interakce dopaminového D1/D2 receptoru s glutamátovým receptorem NMDA typu: od molekul k animálním modelům schizofrenie. Psychiatrie 8 (Suppl.3); (2004): 30-39*

140. 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
141. Štípek S., Měchurová A., Novák L., Trojan S.: *Hypoxantine in diagnosis, prognosis and patogeny of hypoxic injury. Biomed Biochem Acta* 48; (1989): 194-199
142. Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale G.M.: *Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. J Cer Blood Flow Metab* 60; (1981): 53-60
143. Tanaka K., Nogawa S., Nagata E., Suzuki S., Dembo T., Kosakai A., Fukuuchi Y.: *Inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase in the acute phase of focal cerebral ischemia in the rat. Neuroscience* 94; (1999): 361-371
144. Tandler J.: *Zur Vergleichenden Anatomie der Kopfarterien bei den Mammalia. Denks Akad Wiss* 67; (1899): 677-784
145. Tardito D., Tura G.B., Bocchio L., Bignotti S., Pioli R., Racagni G., Perez J.: *Abnormal levels of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunits in platelets from schizophrenic patients. Neuropsychopharmacology* 23; (2000): 216-9
146. Tejkalová H., Šťastný F.: *Neurovývojová a neuroinfekční hypotéza schizofrenie v animálním modelu. Psychiatrie* 9 (Suppl.3); (2005): 21-24
147. Tejkalová H., Kaiser M., Klaschka J., Šťastný F.: *Does neonatal brain ischemia induces schizophrenia-like behaviour in young adult rats. Physiol Res* 56; (2006):
148. Thor D.H., Holloway W.R.: *Developmental analyses of social play behaviour in juvenile rats. Bull Psychosom Soc* 22; (1984): 587-590
149. Tomášová H., Macek M., Hronková J., Burjánková J., Hryčejová I.: *Gamma-glutamyltransferase activity in amniotic fluid in fetuses with chromosome abnormalities and hereditary metabolic defects. Cesk Pediatr* 42(10); (1987): 577-582
150. Trojan S., Šťastný F.: *Part C: Factors influencing brain development. In: Handbook of Human Growth and Developmental Biology. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, 101-122*
151. Trojan S., Šťastný F.: *Perinatální hypoxie a vývoj mozku. Čas Lék Čes* 127; (1988): 33-38

152. Tsai G., Passani L.A., Slusher B.S., Carter R., Baer L., Kleinman J.E., Coyle J.T.: *Abnormal excitatory neurotransmitter metabolism in schizophrenic brains. Arch Gen Psychiatry* 52; (1995): 829-836
153. Tupper D.E., Wallace R.B.: *Utility of the neurological examinations in rats. Acta Neurobiol Exp* 40; (1980): 999-1003
154. 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
155. Uehara H., Yoshioka H., Kawae S., Nagai H., Ohmae T., Hasegawa K., Sawada T.: *A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. Brain Res* 837; (1999): 213-220
156. Uranova N.A., Aganova E.A.: *Ultrastructure of synapses of the anterior limbic cortex in schizophrenia. Zhurnal Nevropatologii i Psykhiatrii Imeni S-S-Korsakova* 89; (1989): 56-59
157. Uranova N.A., Orlovskaya D., Vikhreva O., Zimina I., Kolomeets N., Vostrikov V. and Rachmanova V.: *Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. Brain Res Bull* 55; (2001): 597-610
158. Valkounová I., Marešová D., Trojan S.: *Perinatal Complication: Hypoxic-ischemic encephalopathy. Sbornik lékařský* 102; (2001): 455-463
159. 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
160. Van den Berg C.L., Hol T., Van Ree J.M., Spruijt B.M., Everts H., Koolhaas J.M.: *Play is indispensable for an adequate development of coping with social challenges in the rat. Dev Psychobiol* 34; (1999): 129-138
161. Van den Buuse M., Garner B., Koch M.: *Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. Curr Molec Med* 3; (2003): 459-471
162. Vannucci R.C.: *Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic ischemic encephalopathy. Pediatrics* 85; (1990): 961-968
163. Wahl F., Allix M., Plotkine M., Boulu R.G.: *Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. Stroke* 23; (1992): 267-271
164. Waltz AG.: *Clinical relevance of models of cerebral ischemia. Stroke* 10; (1979): 211-213

165. Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S., Ginsberg M.D.: Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17; (1985): 497-504
166. Yamori Y., Horie R., Handa H., Sato M., Fukase M.: Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* 7; (1976): 46-53
167. Yant W.P., Chornyak J., Schrenk H.H., Patty F.A., Sayers R.R.: Studies in asphyxia. IV. Neuropathology resulting from comparatively rapid asphyxia by atmospheres deficient in oxygen. *Pub Health Bull* 211; (1934): 29-40
168. Yoshida S., Busto R., Watson B.D., Santiso M., Ginsberg M.D.: Postischemic cerebral lipid peroxidation in vitro: Modification by dietary vitamin E. *J Neurochem* 44; (1985): 1593-1601
169. Young C., Tenkova T., Dikranian K., Olney J.W.: Excitotoxic versus apoptotic mechanisms of neuronal cell death in perinatal hypoxia/ischemia. *Curr Mol Med* 4; (2004):77-85
170. Zauner A., Daugherty P.W., Bullock R.M.: Brain oxygenation and energy metabolism: Part I - Biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 51; (2002): 289-302