

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Praha, 2022**

**Mgr. Anna Kroupová**

**Univerzita Karlova**

**3. lékařská fakulta**



**Disertační práce**

**DROGOVÁ ZÁVISLOST A PERINATÁLNÍ STRES**

**DRUG ADDICTION AND PERINATAL STRESS**

**Školitel: prof. MUDr. Romana Šlamberová, Ph.D.**

## **Prohlášení**

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

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

V Praze, 14.03.2022

ANNA KROUPOVÁ

Podpis

## **Identifikační záznam**

KROUPOVÁ, Anna. *Drogová závislost a perinatální stres. [Drug addiction and perinatal stress]*. Praha, 2022. 140 stran, 7 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav fyziologie 2022. Školitel: prof. MUDr. Romana Šlamberová, Ph.D.

**Klíčová slova:** *metamfetamin, drogová závislost, perinatální stres, prenatální stres, postnatální stres, senzitivace, behaviorální testy.*

**Key words:** *methamphetamine, drug addiction, perinatal stress, prenatal stress, postnatal stress, sensitisation, behavioral tests.*

## Poděkování

Velmi ráda bych poděkovala všem, kteří mne v psaní této práce a celém postgraduálním studiu podporovali. Největší poděkování patří mé školitelce prof. MUDr. Romaně Šlamberové, Ph.D., a to nejen za její perfektní odborné vedení, ale také za její velkou podporu a pomoc v průběhu celého postgraduálního studia. Její laskavý přístup a porozumění byly vždy nedílnou součástí její podpory, čehož si nesmírně vážím.

Dále bych chtěla poděkovat svým kolegyním RNDr. Evě Macúchové, Ph.D., RNDr. Ivě Petříkové, Ph.D., Mgr. Márii Ševčíkové a Zuzaně Ježdíkové za pomoc s experimenty a se zaškolením do jednotlivých metodik. Stejně tak děkuji kolegům doc. Ing. Janě Jurčovičové, CSc., PharmDr. Silvestru Poništovi, Ph.D. a PharmDr. Andree Štofkové, Ph.D. za spolupráci při odběru a stanovení hladin sledovaných hormonů a za možnost práce v jejich laboratoři.

V neposlední řadě bych také ráda poděkovala celé své velké rodině za jejich obrovskou podporu, pomoc a trpělivost v průběhu celého mého studia.

## Seznam zkratek

3. LF UK	3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
5-HT	serotonin
A	adrenalin
AADC	DOPA-dekarboxyláza
ACTH	kortikotropin
ADHD	porucha pozornosti s hyperaktivitou
ANOVA	analýza rozptylu
ANS	autonomní nervový systém
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
C	prenatální kontrola
CA1	cornu ammonis 1 (oblast hipokampu)
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CORT	kortikosteron/kortizol
CRH	kortikoliberin
ČR	Česká republika
DA	dopamin
DAT	dopaminový transportér
EMCDDA	Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost
EPM	vyvýšené křížové bludiště
GABA	kyselina gamaaminomáselná
GD	gestační den
GH	růstový hormon
Glu	glutamát
GR	glukokortikoidní receptory
ELISA	analytická metoda kvantitativního stanovení různých antigenů
F	stupeň volnosti
HCl	kyselina chlorovodíková
HPA	osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny
LC	locus coeruleus
L-DOPA	L-dihydroxyfenylalanin

LTP	dlouhodobá potenciace
MA	metamfetamin
MAO	monoaminoxidáza
MDMA	3,4-methylendioxyamfetamin, extáze
MR	minelakortikoidní receptory
MRI	magnetická rezonance
mRNA	„messenger“ ribonukleová kyselina
MWM	Morrisovo vodní bludiště
n	počet zvířat do skupiny
N	nestresovaná postnatální kontrola
NA	noradrenalin
NMDA	N-metyl-D-aspartát
NR1	transmembránové oblasti podjednotek NMDA receptoru
OF	otevřená aréna
ORT	test poznávání předmětu
PD	postnatální den
PET	pozitronová emisní tomografie
PFC	prefrontální cortex
PVN	paraventriculární jádro hypotalamu
S	skupina ovlivněná mateřskou separací
SA	fyziologický roztok
SAM	sympato-adreno-medulární osa
SAP	postoj zvířete, kdy hlava a ramena jsou natažena do otevřeného prostoru a nohy zůstávají v uzavřeném rameni
	EPM
s.c.	subkutánní injekční aplikace
SEM	střední chyba průměru
SERT	serotoninový transportér
SW	skupina ovlivněná kombinací mateřské separace a plavání matek ve studené vodě
TH	tyrosinhydroxyláza
USA	Spojené státy americké
VMAT-2	vezikulární monoaminový transportér 2
W	skupina ovlivněná plaváním matek ve studené vodě

## Abstrakt

**Úvod:** Metamfetamin (MA) patří do skupiny psychostimulancií s centrálním stimulačním a anorektickým účinkem. Bylo zjištěno, že právě MA je nejčastěji zneužívanou drogou závislých těhotných žen. Zneužívání MA u matky může zapříčinit zhoršené mateřské chování a opožděný vývoj potomků. Prenatální aplikace MA může vést i k dlouhodobým změnám v chování, kognici a sociální interakci. Drogy podávané matce mají také dlouhodobý vliv na stresovou odpověď potomků. Stres a drogová závislost jsou tedy úzce spojeny. U dětí je perinatální stres spojen se změnami v učení a paměti, v chování, s fyzickými a emocionální problémy či autismem. U dospělých pak s depresí a vznikem schizofrenie. U zvířat snižuje perinatální stres sociální hru a sociální chování, zvyšuje úzkost a zhoršuje kognitivní funkce.

**Cíl:** Cílem této disertační práce bylo zjistit vliv perinatálních faktorů, jako jsou perinatální MA/stres a/nebo časně postnatální stres, na senzomotorický vývoj mláďat, chování jejich matek v období laktace, sociální chování a hladinu oxytocinu v juvenilním období mláďat a následně na kognitivní funkce a chování exponovaných potomků v dospělosti. U potomků jsme dále sledovali možnou senzitivizaci téže drogy (MA) v pozdějším období.

**Metodika:** Samice potkanů kmene Wistar byly rozděleny do tří skupin, kterým bylo denně po celou dobu gestace injekčně (s.c.) aplikován: 1) MA v dávce 5 mg/kg; 2) fyziologický roztok (SA) o 1 ml/kg; a dále 3) kontrolní skupina bez injekční aplikace (C). Každá skupina samic (MA, SA, C) byla dále rozdělena na čtyři podskupiny, na které byl denně v postnatální dny (PD) mláďat PD 1-21 aplikován různý typ stresoru: I) sociální stres prostřednictvím 3h mateřské separace (S); II) fyzikální stres prostřednictvím plavání matek ve studené vodě (5°C) po dobu 5 minut (W); III) kombinace obou výše vypsanych stresorů (SW); a IV) kontrolní nestresovaná skupina (N). Mláďata byla v PD 21 oddělena od své matky, rozdělena dle pohlaví do skupin a ustájena ve skupinách až do dospělosti. Testováno bylo 8-10 jedinců z každé skupiny. U testů aplikovaných po odstavení mláďat jsme dále sledovali možnou senzitivizaci téže drogy (MA, 1 mg/kg) v den samotného testu s kontrolní skupinou s akutním SA (1 ml/kg). Mláďata (samci i samice) jsme testovali na senzomotorický vývoj a u jejich matek jsme sledovali mateřské chování v období laktace. Juvenilní potomky jsme pak testovali behaviorálním testem Sociální hra a provedli biochemické stanovení hladiny periferního plazmatického oxytocinu u juvenilních samic. Dospělé potomstvo jsme následně testovali v behaviorálních testech Otevřená aréna (OF), Vyvýšené křížové bludiště (EPM) a Morrisovo vodního bludiště (MWM).



**Výsledky:** Naše výsledky naznačují, že kombinace prenatalního MA/stresu a mateřských postnatálních stresorů narušuje mateřské chování a časný sensorimotorický vývoj mláďat. Zdá se ovšem, že rozhodujícím faktorem je v tomto případě expozice MA během březosti. Prenatální expozice MA/stresu neměla vliv na sociální hru či sociální exploraci dvou neznámých potkanů v juvenilním věku. Také u postnatálního stresu, bez rozdílu typu stresoru, se neukázal významný vliv na sociální hru juvenilních potkanů. Nicméně akutní droga 45 minut před samotným testem výrazně utlumila sociální chování, ať už sociální hru či sociální exploraci páru zvířat. Juvenilní samice laboratorního potkana byly také významně aktivnější při sociální hře ve srovnání se samci. Časně postnatální stres může snížit sekreci oxytocinu, mírný prenatalní stres však může tomuto efektu předejít. U prenatalních kontrol pak akutní MA stimulovala basální hladinu plazmatického oxytocinu. Naše výsledky dále ukazují, že časně postnatální stres, podobně jako akutní užití MA v dospělosti může snižovat míru úzkostného chování u dospělých samců laboratorního potkana v OF a EPM bez ohledu na prenatalní vlivy. Co se týče kognitivních funkcí, prenatalní expozice MA či stresu nemusí vést k významnému ovlivnění učení a paměti zvířete, jak se ukázalo v testu MWM. Nicméně naopak tomu je u časně postnatálního sociálního stresoru (S), který kognitivní funkce zhoršil nejvíce. Naše výsledky dále naznačují, že aplikace MA v dospělosti zlepšuje výkon zaměřující se na učení a paměť, a to v závislosti na postnatálním stresoru.

**Závěr:** Na základě výsledků z naší práce jsme dospěli k závěru, že sledované perinatální faktory ovlivňují dané funkce jedince různě. Užívání MA *in utero* má největší vliv na sensorimotorický vývoj mláďat, chování jejich matek v období laktace a vede ke zvýšení hladin oxytocinu. Naše data dále poukazují na významnou modulární roli mírného prenatalního stresu v případě odpovědi oxytocinu na postnatální stres a akutní drogu v dospělosti. Časně postnatální stres může narušit vývoj mláďat a dále snížit hladinu oxytocinu v juvenilním věku zvířat. Jeho vliv na chování a kognitivní funkce dospělého jedince je však významnější než vliv prenatalních faktorů. Akutní aplikace MA v den testu tlumí sociální chování páru zvířat bez ohledu na perinatální faktory a zvyšuje hladinu oxytocinu v závislosti na prenatalní expozici droze/stresu. Akutní MA také snižuje úzkostné chování a zlepšuje některé kognitivní funkce v závislosti na typu postnatálního stresoru.

## Abstract

**Introduction:** Methamphetamine (MA) belongs to the psychostimulants with a central stimulating and anorectic effect. It has been found that MA is the most frequently abused drug of drug-addicted pregnant women. Drug abuse of mother can cause worsening maternal behavior and delayed offspring development. Prenatal application of MA can also lead to long-term changes in behavior, cognition and social interaction. It was also shown that maternal injections induce long-lasting effects on stress responsiveness in adult progeny. Stress and drug addiction are therefore closely connected. In children, perinatal stress is associated with cognitive, behavioral, physical and emotional problems as well as with autism. In adults, it is linked to depression and schizophrenia. In animals, perinatal stress reduces social play and social behavior, increases anxiety and impairs cognitive functions.

**Aim:** The aim of this thesis was to determine the effect of perinatal factors such as prenatal MA/stress and/or early postnatal stress on sensorimotor development of pups and their mothers' behavior during lactation period, social behavior and oxytocin levels in juvenile age and subsequently on cognitive functions and behavior of exposed offspring in adulthood. For all behavioral tests of offspring, we monitor the possible sensitization of the same drug (MA) on the day of the test.

**Methods:** Female Wistar rats were divided into three groups of those, who received: MA (s.c., 5 mg/kg), SA (s.c., 1 ml/kg), or no injections (C, controls), during the entire period of gravidity. Litters were then divided into four groups relative to exposure to postnatal stress: maternal separation (S), maternal cold-water stress (W), maternal separation plus maternal cold-water stress (SW), and controls (N). The early postnatal stress was applied daily on postnatal days (PD) of pups PD 1-21. During the experiments, 8-10 individuals from each group were tested. In all behavioral tests, the offspring received an acute administration of MA at a lower dose of 1 mg/kg 45 minutes before the test. The sensorimotor development of pups and maternal behavior was tested during lactation period. Social play test and peripheral plasma oxytocin levels was determined in juvenile age of rats. In the adulthood, the anxiety-like behavior was tested in the Open field arena (OF) and the Elevated plus maze (EPM) and cognition functions in the Morris water maze (MWM).

**Results:** Our results suggest that the combination of prenatal MA/stress and maternal postnatal stressors has detrimental effects on maternal behavior and early sensorimotor development of pups. However, the decisive factor in this case seems to be MA exposure

during pregnancy. Prenatal exposure to MA/stress did not affect the social play behavior or social exploration of two unknown rats at a juvenile age. Postnatal stress, regardless of the type of stressor, also did not show a significant effect on the social play of juvenile rats. However, the acute MA before the test significantly attenuated social behavior of a pair of animals. Juvenile females also significantly increase their activity in social play compared to males. Early postnatal stress can reduce oxytocin secretion, but mild prenatal stress can prevent this effect. In prenatal controls, acute MA stimulated basal plasma oxytocin levels. Our results further show that early postnatal stress, as well as acute use of MA in adulthood, can reduce anxiety-like behavior in adult male rats in the OF and the EPM regardless of prenatal effects. In terms of cognitive functions, prenatal exposure to MA or stress may not significantly affect the animal's learning and memory, as shown in the MWM test. However, the early postnatal social stressor (S) has significantly impaired cognitive function. Our results further suggest that MA application improves learning and memory performance during testing regarding to the postnatal stressors.

**Conclusion:** Based on the results of our work, we concluded that the observed perinatal factors affecting the individual's functions in different ways. The use of MA in utero has the greatest effect on the sensorimotor development of pups, the behavior of their mothers during lactation and leads to an increase in oxytocin levels. Our data further point to the modular role of mild stress in the oxytocin response to postnatal stress and acute drug in adulthood. Even early postnatal stress can disrupt pup development and further reduce oxytocin levels in the juvenile age of animals. However, its effect on adult behavior and cognitive functions is more significant than the effect of prenatal factors. Acute MA administered on the day of the test suppresses social play and social exploration of a pair of animals regardless of perinatal factors and increases oxytocin levels depending on prenatal drug/stress exposure. Acute MA also reduces anxiety-like behavior and improves some cognitive functions depending on the type of postnatal stress.

# OBSAH

Prohlášení .....	2
Identifikační záznam .....	3
Poděkování .....	4
Seznam zkratk.....	5
Abstrakt .....	7
Abstract .....	9
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>15</b>
1.1. METAMFETAMIN .....	15
1.1.1. HISTORIE UŽÍVÁNÍ.....	16
1.1.2. CHEMICKÉ VLASTNOSTI .....	18
1.1.3. FARMAKOKINETIKA .....	19
1.1.4. FARMAKODYNAMIKA.....	19
1.1.5. TOXIKOLOGIE.....	21
1.1.5.1. ÚČINKY MA.....	21
1.1.5.2. ABSTINENČNÍ SYNDROM.....	23
1.1.6. PRENATÁLNÍ EXPOZICE METAMFETAMINU .....	23
1.1.6.1. KLINICKÉ STUDIE.....	24
1.1.6.2. PREKLINICKÉ STUDIE .....	25
1.2. STRES .....	27
1.2.1. MECHANISMUS ÚČINKU .....	28
1.2.2. PRENATÁLNÍ STRES .....	31
1.2.2.1. KLINICKÉ STUDIE.....	31
1.2.2.2. PREKLINICKÉ STUDIE.....	31
1.2.3. ČASNĚ POSTNATÁLNÍ STRES A STRES MATKY .....	33
1.2.3.1. KLINICKÉ STUDIE.....	33
1.2.3.2. PREKLINICKÉ STUDIE .....	35
1.2.3.2.1. SOCIÁLNÍ STRES.....	35
1.2.3.2.2. FYZIKÁLNÍ STRES .....	37
<b>2. HYPOTÉZY .....</b>	<b>39</b>
<b>3. CÍLE .....</b>	<b>40</b>
<b>4. MATERIÁL A METODIKA.....</b>	<b>42</b>
4.1. PÉČE O LABORATORNÍHO POTKANA A FERTILIZACE .....	42
4.2. PRENATÁLNÍ APLIKACE.....	42
4.3. POSTNATÁLNÍ "CROSS-FOSTERING" .....	43
4.4. POSTNATÁLNÍ STRES .....	43

4.4.1.	SOCIÁLNÍ STRES .....	43
4.4.2.	FYZIKÁLNÍ STRES MATEK.....	44
4.5.	APLIKACE DROGY V DOSPĚLOSTI.....	44
4.6.	EXPERIMENTÁLNÍ SKUPINY.....	44
4.7.	APLIKOVANÉ TESTY A ODBĚRY.....	45
4.7.1.	VÝVOJ MLÁĐAT.....	46
4.7.1.1.	PARAMETRY MLÁĐAT .....	46
4.7.1.2.	BATERIE TESTŮ HODNOTÍCÍ SENZORIMOTORICKÝ VÝVOJ MLÁĐAT .....	46
4.7.1.2.1.	VZPŘIMOACÍ REFLEX NA PODLOŽCE .....	46
4.7.1.2.2.	NEGATIVNÍ GEOTAXE .....	47
4.7.1.2.3.	VZPŘIMOACÍ REFLEX VE VZDUCHU.....	48
4.7.1.2.4.	HRAZDIČKA .....	48
4.7.1.2.5.	ROTAROD.....	49
4.7.2.	MATEŘSKÉ CHOVÁNÍ .....	50
4.7.2.1.	OBSERVAČNÍ TEST .....	50
4.7.2.2.	„RETRIEVAL“ TEST .....	51
4.7.3.	SOCIÁLNÍ HRA .....	51
4.7.4.	STANOVENÍ HLADINY OXYTOCINU.....	52
4.7.5.	OTEVŘENÁ ARÉNA .....	53
4.7.6.	VYVÝŠENÉ KŘÍŽOVÉ BLUDIŠTĚ.....	54
4.7.7.	MORRISOVO VODNÍ BLUDIŠTĚ .....	55
4.7.7.1.	UČENÍ.....	55
4.7.7.2.	„PROBE TEST“ .....	56
4.7.7.3.	TEST PAMĚTI.....	57
4.8.	STATISTICKÁ ANALÝZA DAT .....	57
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>59</b>
5.1.	MATEŘSKÉ CHOVÁNÍ .....	59
5.1.1.	VLIV EXPOZICE MA/STRESU V PRŮBĚHU GESTACE .....	59
5.1.2.	VLIV EXPOZICE STRESU V PRŮBĚHU OBDOBÍ LAKTACE.....	59
5.2.	VÝVOJ MLÁĐAT.....	62
5.2.1.	PARAMETRY MLÁĐAT .....	62
5.2.1.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU .....	62
5.2.1.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	62
5.2.1.3.	VLIV POHLAVÍ.....	62
5.2.2.	BATERIE TESTŮ HODNOTÍCÍ SENZORIMOTORICKÝ VÝVOJ MLÁĐAT.....	63
5.2.2.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU .....	63
5.2.2.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	64

5.2.2.3.	VLIV POHLAVÍ.....	64
5.3.	SOCIÁLNÍ HRA .....	66
5.3.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	66
5.3.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	66
5.3.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	66
5.3.4.	VLIV POHLAVÍ.....	66
5.4.	STANOVENÍ HLADINY OXYTOCINU.....	68
5.4.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	68
5.4.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	68
5.4.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	69
5.5.	OTEVŘENÁ ARÉNA .....	71
5.5.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	71
5.5.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	71
5.5.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	72
5.6.	VYVÝŠENÉ KRÍŽOVÉ BLUDIŠTĚ.....	76
5.6.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	76
5.6.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	76
5.6.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	76
5.7.	MORRISOVO VODNÍ BLUDIŠTĚ .....	78
5.7.1.	UČENÍ.....	78
5.7.1.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU .....	78
5.7.1.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	78
5.7.1.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA .....	79
5.7.2.	„PROBE“ TEST .....	82
5.7.2.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU .....	82
5.7.2.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU.....	82
5.7.2.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA .....	83
5.7.3.	TEST PAMĚTI.....	86
5.7.3.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU .....	86
5.7.3.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	86
5.7.3.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA .....	86
<b>6.</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>89</b>
6.1.	MATEŘSKÉ CHOVÁNÍ .....	89
6.1.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	89
6.1.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	89
6.2.	PARAMETRY MLÁŽDAT .....	90
6.2.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	90

6.2.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	90
6.3.	VÝVOJ MLÁDAT.....	91
6.3.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	91
6.3.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	92
6.4.	SOCIÁLNÍ HRA .....	93
6.4.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	93
6.4.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	93
6.4.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	94
6.4.4.	VLIV POHLAVÍ.....	95
6.5.	STANOVENÍ HLADINY OXYTOCINU.....	96
6.5.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	96
6.5.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	96
6.5.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	97
6.6.	ZMĚNY CHOVÁNÍ V DOSPĚLOSTI.....	98
6.6.1.	ANXIETA .....	98
6.6.1.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU .....	98
6.6.1.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	98
6.6.1.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA .....	100
6.6.2.	PSYCHOMOTORICKÉ A EXPLORATIVNÍ CHOVÁNÍ .....	100
6.7.	MORRISOVO VODNÍ BLUDIŠTĚ .....	102
6.7.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	102
6.7.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	104
6.7.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	105
<b>7.</b>	<b>SOUHRN NEJVÝZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ .....</b>	<b>109</b>
7.1.	VLIV PRENATÁLNÍ EXPOZICE MA/STRESU.....	109
7.2.	VLIV POSTNATÁLNÍ EXPOZICE STRESU .....	109
7.3.	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MA.....	110
<b>8.</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCE.....</b>	<b>114</b>
<b>10.</b>	<b>PUBLIKACE A PREZENTACE AUTORA.....</b>	<b>138</b>
10.1.	PUBLIKACE <i>IN EXTENSO</i> S IMPAKT FAKTOREM .....	138
10.2.	PUBLIKACE <i>IN EXTENSO</i> BEZ IMPAKT FAKTORU .....	138
10.3.	PREZENTACE A ABSTRAKTA.....	139
<b>11.</b>	<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>141</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Metamfetamin

Zneužívání metamfetaminu (MA) je významný problém naší společnosti, jak na národní úrovni, tak i celosvětově. Psychostimulanty ze skupiny amfetaminů jsou druhou nejužívanější skupinou drog na světě a dle dostupných statistik právě MA této skupině vévodí (Courtney a Ray 2014, EMCDDA a Europol 2019). Problémy spojené s užíváním MA jsou patrné zejména v Severní Americe a Asii a problematika zvyšujícího užívání této drogy se šíří i do nových oblastí, zejména do některých zemí Afriky, Středního východu a do určitých částí jižní polokoule. Ačkoliv v Evropě zůstává užívání MA celkově omezené ve srovnání s jinými stimulanty jako je kokain a amfetamin, v některých evropských zemích je příčinou značných škod. V České republice (ČR) je závislost na MA důvod pro jednoho z každých dvou přijatých pacientů ke specializované protidrogové léčbě (EMCDDA a Europol 2019). Evropské průzkumy vedené Evropským monitorovacím centrem pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA) z roku 2017 uvádí zvýšený počet vysoce rizikových uživatelů MA v ČR, tj. odhadem 34 700 uživatelů ve věku 15-64 let, oproti roku 2009 s 20 900 vysoce rizikovými uživateli MA. Nicméně odhadované počty těchto uživatelů byly v posledních letech relativně stabilní (EMCDDA a Europol 2019). Průzkum EMCDDA však zdůraznil, že objem výroby MA v ČR v uplynulých letech rostl, což bylo prokázáno nárůstem množství zachycené drogy či odhalených varen. Je také třeba poznamenat, že injekční aplikace zůstává primárním způsobem užívání MA v ČR, kde je také tato droga často užívána spolu s jinými drogami (EMCDDA a Europol 2019). Injekční užívání uvádí v Evropě jako nejčastější způsob aplikace 31 % uživatelů MA, kteří žádají o léčbu závislosti. Celková situace v Evropě je významně ovlivněna právě ČR, na kterou připadá více než 70 % uživatelů, kteří užívají MA injekčně a žádají o léčbu závislosti na této droze (EMCDDA 2021).

Užívání MA v roce 2020 bylo ovlivněno pandemií onemocnění COVID-19. Z dostupných informací EMCDDA vyplývá, že za rok 2020 byla v Evropě pozorována nižší míra užívání MA (a jeho derivátu 3,4-methyldioxymethamfetaminu, MDMA). Jakékoliv poklesy užívání drog, k nimž došlo během prvních omezení volného pohybu osob, se však s uvolňováním opatření snižovaly. Uvolnění omezení pohybu a návrat ke společenským akcím v létě 2020 bylo spojeno s opětovným zvýšením užívání těchto drog (EMCDDA 2021).



### 1.1.1. Historie užívání

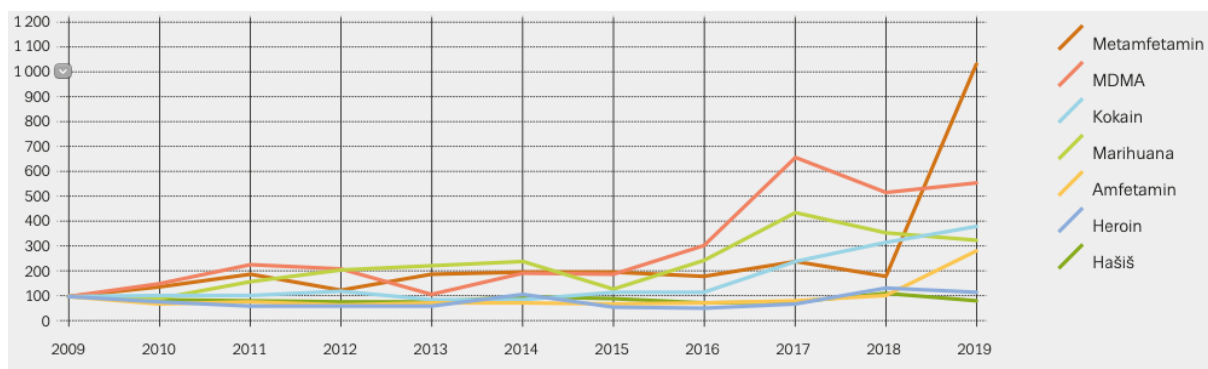
MA byl poprvé syntetizován z efedrinu v Japonsku v roce 1919 Akirou Ogatou (Zábranský 2007, EMCDDA a Europol 2019). O rok později byl MA patentován a uveden na trh ve formě hydrochloridu jako léčivý přípravek Methedrine (Logan 2002, EMCDDA a Europol 2019). Použití tohoto přípravku a přípravku s obsahem amfetaminu (Benzedrin, Dexedrin) se v Evropě a na Západě rozšířilo ve 20. a 30. letech 20. století. Amfetamin byl předepisován z různých lékařských důvodů, včetně hubnutí, léčby únavy, deprese, narkolepsie, alkoholismu, arteriosklerózy a senné rýmy. Pro své povzbuzující účinky byl také vyhledáván i v nelékařských situacích (např. studenty). Problematické vedlejší účinky dlouhodobého užívání amfetaminů, zahrnující mimo jiné hypertenzi, depresi, závislost či psychiatrické poruchy, jsou dokumentovány od konce 30. let 20. století (EMCDDA a Europol 2019). V roce 1938 zahájila berlínská farmaceutická společnost Temmler výrobu MA pod značkou Pervitin (Griffiths *et al.* 2008). Během druhé světové války byl tento přípravek široce distribuován německým jednotkám ve snaze zvýšit jejich výkonost. Tato droga se následně dostala i mezi německé civilisty (Zábranský 2007, EMCDDA a Europol 2019). V Japonsku byl MA poprvé komerčně vyráběn v roce 1941. Od roku 1942 byl dodáván japonským vojákům a pracovníkům v klíčových válečných odvětvích pod názvem Philopon. Užívání MA se následně rozšířilo v japonské populaci, která drogu nazvala „shabu“ (Tamura 1989). Na straně spojenců byla situace podobná, ale stimulant podávaný americkým vojákům byl častěji amfetamin než MA (Zábranský 2007, EMCDDA a Europol 2019). Tato počáteční vlna užívání syntetických stimulantů, poháněná prodejem obrovského válečného přebytku amfetaminů civilistům, pokračovala až do konce 40. let 20. století. Přestože byla na počátku 50. let zavedena omezení předepisování a prodeje amfetaminu a MA, poptávka zůstala vysoká a užívání amfetaminů pokračovalo i v 50. a 60. letech 20. století. Většina v té době dostupných amfetaminů se ještě v 60. letech 20. století používali jako bezpečné a prospěšné látky a byly legálně vyráběny farmaceutickými společnostmi pro terapii depresí, poruch pozornosti či obezity (Tamura 1989, EMCDDA a Europol 2019). Nejvyšší čísla pacientů užívající tyto látky ve Spojených státech (USA) jsou spjaty s rokem 1967, kdy bylo identifikováno 31 milionů receptů na amfetaminy (Anglin *et al.* 2000). Během 60. let 20. století byla provedena další omezení terapeutického užití MA a amfetaminu, čímž se v Severní Americe a Evropě začaly objevovat nelegální zdroje dodávek těchto drog. Amfetamin a MA byly následně přidány do Seznamu II podle Úmluvy OSN o psychotropních látkách z roku 1971, což umožnilo jejich další omezení. Do 80. let 20. století MA prakticky

zmizel z trhu s nelegálními drogami ve většině evropských zemí. Nicméně amfetamin, ke kterému se později přidal derivát MDMA, byl hlavní nekokainovou stimulační drogou v daném období (EMCDDA a Europol 2019).

Ve USA nabyl MA na popularitě mezi drogově závislími opět až v 90. letech a na počátku nového tisíciletí. Statistiky z této doby uvádějí, že v roce 1991 bylo identifikováno 210 000 nových uživatelů MA starších 12 let. Následně v roce 1998 bylo takových uživatelů MA více jak dvakrát tolik, tj. zhruba 454 000. Až v roce 2005, po omezení dostupnosti pseudoefedrinu, začalo uživatelů MA v USA ubývat, což podporuje údaj o 192 000 nových uživatelů MA za rok 2005 (Courtney a Ray 2014). Nicméně počet nových uživatelů po roce 2010 začal s počtem nových varen a vyrobeného MA opět stoupat. V roce 2012 bylo v USA identifikováno 379 000 uživatelů MA s diagnózou závislosti na této droze, což bylo zvýšení o 127 000 závislých za jeden rok. Další statistiky z roku 2012 ukázaly, že v USA žije přes 12 milionů lidí, kteří užívají či užívali MA v průběhu svého života. Průzkum ukázal, že nejmladší věkovou kategorií se zkušenostmi s touto drogou jsou děti ve věku již od 12 let (Courtney a Ray 2014).

Přestože se jevílo užívání MA v Evropě v 80. letech minulého století utlumené, ČR byla v této době výjimkou. Nezákonná výroba a užívání MA se staly v ČR hlavní drogovou problematikou již v 70. let 20. století. Zdejší výroba byla pravděpodobně usnadněna existencí farmaceutické firmy VUAB, která byla významným výrobcem efedrinu. Také léčivé přípravky, které obsahovali dané prekurzory (efedrin, pseudoefedrin) zde byly široce dostupné (EMCDDA a Europol 2019). Evropské průzkumy z roku 2014 zjistily vzrůstající počet uživatelů tvrdých drog ze skupiny stimulantů a zároveň i zvyšující se počet injekční aplikace těchto drog v porovnání s předchozími lety. Stimulantia obecně, a z nich právě zejména MA, byly nejčastěji hlášenými primárně užívanými drogami (EMCDDA 2016). Průzkum EMCDDA také zdůraznil, že výroba pervitinu ve více potentní formě D-enantiomeru se soustředí zejména v ČR. Objem výroby této drogy v ČR každoročně roste, což prokazuje nárůst množství zachycené drogy a odhalených varen. Z počtu 300 nelegálních varen MA zachycených v Evropské unii v roce 2017 bylo 264 objeveno v ČR (EMCDDA a Europol 2019). MA byla dlouhá léta nejčastěji zachycovaným stimulantem nejen v ČR, ale i na Slovensku, v Německu, některých severských zemí a aktuálně i ve Francii, Španělsku a Turecku (EMCDDA a Europol 2019). Počet hlášených záchytů MA a jeho derivátu MDMA se v Evropě mezi lety 2009 až 2019 každoročně zvyšoval nejvíce ze všech pozorovaných drog. V roce 2019 byl počet záchytů MA o 182 % vyšší než v roce 2009 a u zachyceného

množství této drogy to bylo o 931 % více (Obr. 1). Nárůst zachycené drogy pravděpodobně odráží zvyšující se nechtěnou úlohu Evropy jako místa výroby, vývozu a tranzitu MA. V roce 2019 bylo v zemích s nejvyšším množstvím zachyceného MA (Španělsko, Slovensko) hlášeno, že zachycená droga pochází z Mexika, což podpořilo vyjádření i dalších států Evropy (Rakousko, Německo, Belgie). ČR v roce 2019 hlásila, že většina dostupného MA se vyrábí v tuzemsku a část pochází z Nizozemska, Belgie a Polska. Osoby žádající o léčbu závislosti MA se v roce 2019 nacházeli především v ČR, Německu, Slovensku a Turecku (EMCDDA a Europol 2019, EMCDDA 2021). Nevětší nárůst vysoce rizikových uživatelů MA (tj. s injekční aplikací) v ČR byla zjištěn mezi lety 2007 až 2014, což znamená nárůst z přibližně 20 000 uživatelů na více než 36 000 (EMCDDA 2016, Holubová a Šlamberová 2017). Další roky byl pak odhadovaný počet vysoce rizikových uživatelů MA stabilní (EMCDDA a Europol 2019).



**Obr.1. Množství drog zachycených v Evropské unii, indexované trendy 2009-2019.** Indexované trendy odráží relativní změny záchytů drog během desetiletého období, neposkytují však žádné informace o skutečných množstvích (EMCDDA 2021).

### 1.1.2. Chemické vlastnosti

MA je derivát amfetaminu patřící do skupiny psychomotorických stimulantů. V ČR je více známý pod názvem pervitin a jeho další synonyma jsou desoxyfedrin, piko, metylamfetamin nebo anglicky používané „ice“ či „crystal meth“ (Courtney a Ray 2014, EMCDDA a Europol 2019). Tato nezákonně dostupná a zneužívaná droga může existovat ve dvou enantiomerech (optických izomerech) D- a L-metamfetaminu. Oba enantiomery mají psychoaktivní účinky, nicméně D-enantiomer je v účincích silnější a trvá delší dobu než levotočivý L-enantiomer. V Evropě se zneužívá racemická směs těchto izomerů

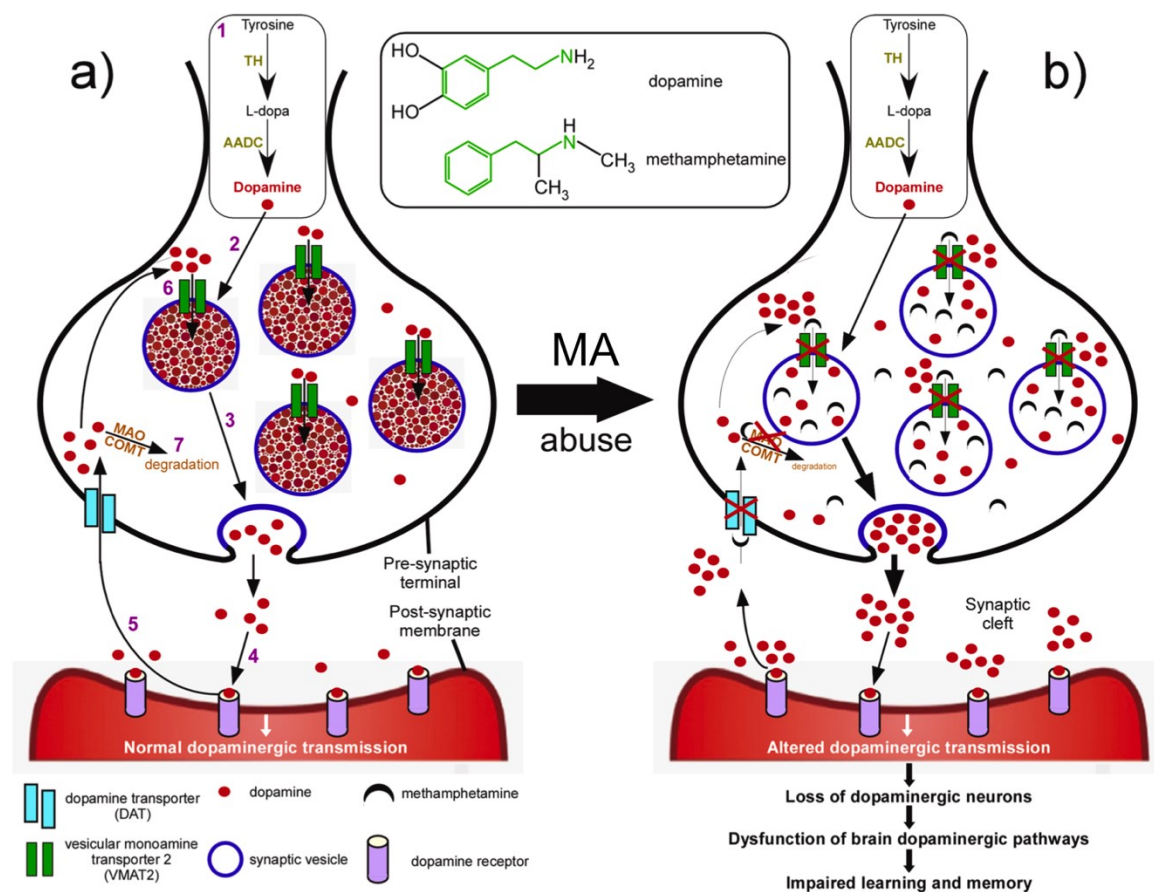
ve shodném poměru či čistá forma D-metamfetaminu (Mendelson *et al.* 2006, EMCDDA a Europol 2019). Takto vyrobený MA se zde objevuje v krystalické formě nebo jako prášek. V této podobě, nebo pokud je droga rozpuštěna, je zneužívána zejména intravenózní cestou, dále také perorálním, intranasálním, sublinguálním či rektálním podáním a v neposlední řadě i kouřením (Courtney a Ray 2014, EMCDDA 2016, Holubová a Šlamberová 2017).

### **1.1.3. Farmakokinetika**

MA je metabolizován převážně v játrech a jeho detekovatelné metabolity zahrnují amfetamin, 4-hydroxymetamfetamin, norefedrin, kyselinu hippurovou, 4-hydroxyamfetamin a 4-hydroxynorefedrin. MA a jeho metabolity jsou dále vylučovány ledvinami. Ve 30–50 % je ledvinami vylučován nezměněný MA, dále až 15 % jako 4-hydroxymetamfetamin a 10 % jako amfetamin. Zhruba 70 % jednorázové perorální dávky se pak vyloučí močí do 24 hodin. Nicméně po 4-denním užívání MA v dávce 10 mg byla tato droga v moči detekovatelná ještě 7 dní po poslední dávce. Hodnocení abstinence MA v klinických studiích tedy zahrnuje i analýzu moči cca 2x týdně (Courtney a Ray 2014).

### **1.1.4. Farmakodynamika**

MA je lipofilní molekula, která stimuluje uvolňování katecholaminů v centrální nervové soustavě (CNS) a zároveň částečně blokuje jejich zpětné vychytávání. Díky strukturální podobnosti nahrazuje MA transportéry pro dopamin (DA), noradrenalin (NA), serotonin (5-HT), vezikulární monoaminový transportér 2 (VMAT-2) a ovlivňuje jejich redistribuci (Obr.2.). Následná nadměrná koncentrace těchto neurotransmiterů neúměrně stimuluje postsynaptické monoaminové receptory. MA také zeslabuje metabolismus monoaminů prostřednictvím inhibice jejich degradace monoaminoxidázi (MAO), což dále podporuje hromadění přebytečných monoaminů v synapsi a synaptické štěrbině (Courtney a Ray 2014, Holubová a Šlamberová 2017). MA tedy způsobuje poškození (nejen) dopaminergního systému prostřednictvím nadměrné aktivace DA receptorů, což nakonec vede k trvalé ztrátě dopaminergních nervových zakončení (Shukla a Vincent 2021).



**Obr.2. Procesy v dopaminergní synapsi za a) fyziologických podmínek a b) podmínek vyvolaných MA.** a) (1) Dopamin (DA) je syntetizován z tyrosinu přes L-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA) enzymem tyrosinhydroxylázou (TH) a dále DOPA-dekarboxylázou (AADC) v presynaptickém zakončení dopaminergních neuronů. (2) Dopamin je poté uložen do synaptických vezikul pomocí vezikulárního monoaminového transportéru 2 (VMAT2), (3) odkud je uvolňován do synaptické štěrbině. (4) Po navázání DA na jeho receptory na postsynaptické membráně a transdukci signálu je (5) zpětně recyklován pomocí DA-transportéru (DAT) do cytoplazmy presynapse, kde se může (6) reinkorporovat do synaptických vezikul prostřednictvím VMAT2 nebo být (7) katabolizován enzymy, jako je monoaminoxidáza (MAO) a katechol-O-methyltransferáza (COMT). (b) Metamfetamin (METH, MA) působí na přenos DA narušením intravezikulárního protonového gradientu, utlumením funkce VMAT2 a obrácením transportu DA do cytoplazmy, čímž snižuje jeho koncentraci v synaptických vezikulách. MA také způsobuje výraznou dysfunkci DAT na presynaptické plazmatické membráně vedoucí k nadměrné koncentraci DA v synaptické štěrbině, což zásadně ovlivňuje bazální homeostázu přenosu DA a vyvolává dlouhotrvající neuroadaptaci. Navíc se MA váže na MAO a blokuje degradaci DA, což opět vede ke zvýšené dostupnosti volného DA. (Převzato a upraveno z: Shukla a Vincent 2021).

MA působí na hlavní dopaminergní, noradrenergní a serotoninergní dráhy mozku. V případě DA aktivuje MA mesolimbickou, mesokortikální a nigrostriatální dráhu, které jsou spojovány s euforickým efektem, viditelným po aplikaci drogy. Noradrenergní vliv v tomto případě je směřován na mediální bazální oblast předního mozku, hipokampus a prefrontální kortex (PFC). Zde se po aktivaci MA uplatňují různé změny v chování jako excitace a dále také změny v kognitivních procesech. Dalším ovlivněným systémem jsou serotoninergní neurony v mozku regulující různé funkce jako je dýchání, vnímání bolesti, sexuální aktivitu, odměnu, vyšší kognitivní procesy jako jsou myšlení, pozornost, představitost a řeč. Mechanismus účinku chování, které vede ke zneužívání drog a závislosti, je pravděpodobně na základě potenciace dopaminergní neurotransmise v mesokortikolimbické dráze. Nicméně na posilování tohoto chování může mít také vliv endogenní opioidní systém (endorfiny, enkefaliny a dynorfiny). Amfetaminová stimulancia jej ovlivňuje v oblasti mesokortikální dopaminergní dráhy, ve ventrální tegmentální oblasti a nucleus accumbens. Funkce těchto drah je v případě užití drogy spojena s procesy v systému odměny a motivace. Preklinická data ukazují, že systém endogenních opiátů je zahrnut do změn v projevu chování a lokomoce drogově závislých zvířat na MA, analogicky bychom našli spojení ke kompulsivnímu chování „bažení“ u lidí (Courtney a Ray 2014, Holubová a Šlamberová 2017).

## 1.1.5. Toxikologie

### 1.1.5.1. Účinky MA

Jako silný psychostimulant způsobuje MA v nízké až střední dávce (5-30 mg) euforii, nabuzení, tachykardii, hypertenzi, dilataci pupil, periferní hypertermii, krátkodobé zlepšení kognice, úzkost a snižuje únavu a apetit (Cruickshank a Dyer 2009, Courtney a Ray 2014). Po jednorázové vyšší dávce a dále pak při chronickém užívání může způsobovat psychotické epizody (Hermens *et al.* 2009, Ujike a Sato 2004, Courtney a Ray 2014). Akutní účinky MA na chování zahrnují zvýšení energie a bdělosti, sníženou potřebu spánku, euforii, zvýšenou sexualitu, nadměrné mluvení, pocení, napjaté čelistní svaly a skřípání zubů a již uvedenou ztrátu chuti k jídlu (Hart *et al.* 2008, Courtney a Ray 2014). Dle studie McKetin *et al.* (2016) lze příznaky související s psychikou uživatele po aplikaci MA rozdělit do tří skupin: a) pozitivní psychotické symptomy jako je podezřívavost, neobvyklý obsah myšlenek, halucinace a bizarní chování; b) afektivní symptomy zahrnující deprese, sebevražedné chování, vinu, nepřátelství či zanedbávání sama sebe; a c) psychomotorické symptomy jako je

napětí, vzrušení, roztržitost a hyperaktivitu (McKetin *et al.* 2016). Mezi nejzávažnější psychiatrické poruchy patří psychóza, deprese, sebevražedné chování, úzkost a násilné chování. Užívání MA může vést k řadě dalších potíží včetně kardiovaskulárních a cerebrovaskulárních onemocnění, závislosti, infekčním nemocem či smrti. Kouření MA je také spojeno s poškozením dýchacích cest a s kazivostí zubů a dásní (tzv. „meth mouth“). Akutní intoxikace MA může vést k těžké hypertermii, selhání ledvin a srdečnímu infarktu (Darke *et al.* 2008, EMCDDA a Europol 2019).

Přechod od příležitostného k nutkavému a opakovanému užívání MA může být rychlý. Některé studie uvádějí, že od začátku užívání drogy do prvního bažení po droze trvá v průměru asi 50 dní. Celkově 60 dní od začátku užívání MA trvá přechod k pravidelnému užívání a 85 dní k nutkavému užívání (Wang *et al.* 2017, Paulus a Stewart 2020). Opakované užívání střední až vysoké dávky MA je spojováno s neurotoxickým účinkem na dopaminergní a serotonergní systémy CNS. To může vést až k nevratné ztrátě nervových zakončení a/nebo těl neuronů (Cho a Melega 2002), což podporují i výsledky klinických studií, které k zobrazení struktur použily pozitronovou emisní tomografii (PET) a magnetickou resonanci (MRI). Bylo také naměřeno snížení hustoty striatálního transportéru pro DA (DAT), což může vést k deficitu paměti a zhoršené psychomotorické koordinaci (Courtney a Ray 2014, McCann *et al.* 1998, Volkow *et al.* 2001a, Volkow *et al.* 2001b). Snížení hustoty transportéru pro 5-HT (SERT) pak může vést ke zvýšené agresivitě (Sekine *et al.* 2006). Po dlouhotrvající abstinenci vykazovaly některé markery jako hustota DAT obrát k původním hodnotám (Volkow *et al.* 2001a). Jedna z hypotéz pro mechanismus neurotoxického účinku uvádí, že zvýšené množství uvolněného DA v cytoplazmě vede k nahromadění reaktivních forem kyslíku a následně k silnému oxidativnímu stresu v neuronu (Berman *et al.* 2008, Courtney a Ray 2014). U chronických uživatelů MA bylo také ve srovnání se zdravými kontrolami pozorováno snížení integrity bílé hmoty spojené s různými psychiatrickými příznaky zahrnující například deprese (Tobias *et al.* 2010), redukce šedé hmoty v cingulární, limbické a paralimbické kůře (Thompson *et al.* 2004), redukce objemu hipokampu spojeného s horší pamětí (Thompson *et al.* 2004), změněný tvar corpus callosum (Oh *et al.* 2005) a zvýšený objem putamen a globus pallidus, který může ukazovat na možný kompenzační účinek (Chang *et al.* 2005, Courtney a Ray 2014).

### 1.1.5.2. Abstinenční syndrom

Dlouhodobé užívání MA má za následek vyčerpání presynaptických zásob monoaminů, down-regulaci receptorů a neurotoxicitu (Barr *et al.* 2006, Courtney a Ray 2014). Při vysazení MA po určité době užívání nestačí tělo na danou změnu rychle zareagovat a tyto zmíněné účinky MA v CNS pak mají za následek významné abstinenční příznaky. Mezi tyto příznaky MA patří únava, hypersomie, podrážděnost, úzkost, agresivita a bažení („craving“) po droze (Courtney a Ray 2014). Charakteristickým znakem vysazení MA jsou depresivní stavy, které mohou trvat i déle než dva týdny po začátku abstinence. Většina abstinenčních příznaků po vysazení MA obvykle odezní do 14 dnů po abstinenci. Nicméně bylo pozorováno, že bažení po této droze trvá minimálně 5 týdnů. Závažnost abstinenčního syndromu také pravděpodobně souvisí s četností předchozího užívání drogy (Courtney a Ray 2014, Zorick *et al.* 2010). Stejně jako u jiných poruch souvisejících s užíváním návykových látek je závislost na MA považována za chronickou a recidivující poruchu charakterizovanou neurobiologickými změnami (Courtney a Ray 2014, Koob *et al.* 2004).

### 1.1.6. Prenatální expozice metamfetaminu

Dle statických dat přechází řada drogově závislých žen během těhotenství z jiných tvrdých drog právě na pervitin (Marwick 2000, Šlamberová 2019). Pravděpodobně se tak děje pro anorektický účinek MA, euforii a sníženou únavu po podání této drogy (Malinová-Ševčíková *et al.* 2014). V roce 2006 více než 400 000 žen v reprodukčním věku v USA uvedlo, že v předchozím měsíci užily MA. Tyto ženy tvořily v daném roce téměř 40 % všech žen užívajících návykové látky (Terplan *et al.* 2009). Také počet hospitalizací v souvislosti s MA mezi těhotnými ženami stoupá, stejně jako s nimi spojená zátěž v podobě zdravotních a sociálních potíží (Terplan *et al.* 2009). Studie z Kalifornie zaměřující se na vývoj kojenců a životního stylu těhotných žen zjistila, že 0,7 % žen (z celkových 29 494) užívalo během těhotenství drogy ze skupiny amfetaminů (Vega *et al.* 1993, Liles *et al.* 2012). Podobně i 0,7 % matek (z 436) na Havaji užívalo během těhotenství MA (Derauf *et al.* 2003) a v oblastech s jeho vysokým užíváním užívalo tuto drogu v průběhu těhotenství 5,2 % matek (z 1 632) (Arria *et al.* 2006, Liles *et al.* 2012). Kromě toho matky užívající MA byly při narození svého dítěte mladší, chudší, svobodné a méně vzdělané než matky neužívající MA. Tyto matky také užívaly jiné návykové látky a byly více vystaveny domácímu násilí



než kontrolní skupina (Derauf *et al.* 2007, Good *et al.* 2010, Liles *et al.* 2012, Smith *et al.* 2006).

O matkách užívajících MA a jejich rodičovských zkušenostech se však s tím, jak jejich děti rostou, ví jen málo. Výzkum ukazuje, že zneužívání drog ze strany matky je rizikovým faktorem pro špatné rodičovství a problémy s chováním dětí (Liles *et al.* 2012). Rostoucí incidence uživatelů MA ukazuje, že užívání drog v průběhu gravidity je celosvětovým problémem (Terplan *et al.* 2009). Přestup MA přes placentární bariéru do plodu je velmi snadný (Dattel 1990, Rambousek *et al.* 2014). Zneužívání MA v průběhu gravidity tak má negativní dopad nejen na matku, ale i na vývoj potomstva. Dané znevýhodnění potomků může přetrvávat až do dospělosti (Malinová-Ševčíková *et al.* 2014, Rokyta *et al.* 2008).

### 1.1.6.1. Klinické studie

Psychostimulancia aplikovaná *in utero* mohou vést k nedostatečné výživě matky i plodu. Navíc je zde vysoké riziko přenosu infekce nebo sexuálně přenosných nemocí ve spojení s užíváním nesterilních jehel. Také roste riziko hepatitidy, anemie, hypertenze, pre-eklampsie v průběhu těhotenství a je zaznamenáno větší riziko potratů a mrtvě narozených dětí (Johnson a Leff 1999, Holubová a Šlamberová 2017). Další klinické studie zaměřující se na následky prenatální expozice MA prokázaly sníženou porodní váhu a menší obvod hlavy, malformace jako například rozštěpy rtu, srdeční defekty, mozkové krvácení či nesestouplá varlata (Little 1998, Holubová a Šlamberová 2017). Ačkoliv abstinenční příznaky nebyly u novorozených dětí exponovaných MA *in utero* pozorovány (Kittirattanapaiboon *et al.* 2017, Smith a Santos 2016), byly zjištěny jiné příznaky související s prenatální expozicí MA jako zvýšený svalový tonus, tremor, podrážděnost, nepravidelný spánek a ovlivněná adaptabilita na stres (Wouldes *et al.* 2004). Dále bylo zjištěno, že prenatální expozice MA u dětí může vést ke snížení objemu subkortikálních struktur mozku (nucleus caudatus, putamen, globus pallidus, hipokampus). Redukce v těchto oblastech koreluje se zhoršenou pozorností a s opožděnou verbální pamětí (Chang *et al.* 2004, Holubová a Šlamberová 2017). Expozice MA *in utero* je také významně spojena s poruchou sání a kojení, zhoršeným spánkem, poruchou motoriky a zvýšeným stresem u dětí (Smith *et al.* 2015, Holubová a Šlamberová 2017).

Některé klinické studie uvádí, že děti vystavené MA prenatálně nevykazují deficity v rozvoji jazykových dovedností či v inteligenčním kvocientu, ale projevují se zvýšenou

úzkostí, emočními problémy, agresivním chováním, poruchou pozornosti s hyperaktivitou (ADHD) a poruchou dalších kognitivních funkcí až do věku 7,5 let (Diaz *et al.* 2014, Kittirattanapaiboon *et al.* 2017). Švédská kohortová studie zkoumala účinky prenatální expozice MA na behaviorální chování a kognitivní funkce u dětí od narození do 14 let věku (Zhang *et al.* 2021). Výsledky od 65 dětí s opakovanou expozicí MA po celou dobu těhotenství ukázaly, že k poruše emočního chování došlo ve věku 1 roku dítěte (Billing *et al.* 1980), adaptace dítěte byla narušena ve věku 4 let (Billing *et al.* 1988), zvýšený výskyt agresivního chování byl zjištěn ve věku 8 let (Billing *et al.* 1994), intelekt 12 % dětí ze studie byl nižší ve srovnání s normálním intelektem vrstevníků ve věku 10 let (Eriksson a Zetterstrom 1994), hodnocení v matematice, švédském jazyce a sportu bylo pak významně horší ve srovnání s vrstevníky ve věku 14 let (Cernerud *et al.* 1996). Tyto výsledky tedy naznačují, že prenatální expozice MA může ovlivnit vývoj dětí minimálně do věku 14 let (Zhang *et al.* 2021).

Statistické průzkumy také ukazují, že drogově závislé matky nevěnují svému dítěti dostatečnou péči. Sociální, ekonomická a psychologická znevýhodnění, která doprovázejí uživatele nelegálních drog, jsou v tomto případě významným faktorem. Z 90 % se jedná o svobodné matky nízkého věku, často nezaměstnané a žijící v neutěšených sociálních podmínkách. I tyto aspekty mohou mít za následek psychickou deprivaci a opožděný vývoj dítěte. Provedené klinické studie tento výsledek potvrdily, drogově závislé matky zanedbávají péči o své děti, ať už v průběhu těhotenství nebo po porodu (Holubová a Šlamberová 2017, Smith *et al.* 2015, Vavřínková *et al.* 2001). Zneužívání MA bylo také významně spojeno se zvýšením depresivních symptomů u matky a rodičovským stresem (Liles *et al.* 2012).

### **1.1.6.2. Preklinické studie**

Preklinické studie na laboratorních potkanech potvrdily, že prenatální expozice MA vyvolává opožděný senzomotorický vývoj ovlivněných mláďat (Acuff-Smith *et al.* 1996, Holubová a Šlamberová 2017, Martin *et al.* 1976, Šlamberová *et al.* 2006). Míra poškození však závisí na velikosti podané dávky této drogy. Podávaná dávka MA, která koresponduje s koncentrací drogy u plodů drogově závislých matek u lidí, je obvykle v dávce 5 mg/kg (Malinová-Ševčíková *et al.* 2014, Šlamberová *et al.* 2006). Opakovaná vysoká dávka s.c. (50 mg/kg) může vést u březích samic k abortu či úmrtí matky a také k vývojovým vadám očí, jako jsou anoftalmie, mikroftalmie a odchlíplá sítnice (Acuff-Smith *et al.* 1992, Acuff-Smith *et al.* 1996, Holubová a Šlamberová 2017). Potkaní matky s aplikací MA (5 mg/kg) v průběhu

březosti mají kratší dobu gestace, nižší přírůstek hmotnosti za celé období gestace a menší počet potomků ve srovnání s kontrolami (Martin *et al.* 1976). Další preklinické studie ale některé z těchto účinků jako je předčasný porod či snížený počet potomků ve vrhu neprokázaly (Holubová a Šlamberová 2017, Malinová-Ševčíková *et al.* 2014, Šlamberová *et al.* 2006). Porodní hmotnost mláďat a přírůstek hmotnosti v období laktace je u matek i jejich potomků menší než u kontrol, což může být vysvětleno anorektickým účinkem MA (Acuff-Smith *et al.* 1996, Holubová a Šlamberová 2017, Malinová-Ševčíková *et al.* 2014, Šlamberová *et al.* 2006).

Chronická aplikace MA v průběhu gestace může mít dlouhodobé následky na potomky a další generace (Šlamberová 2019, Šlamberová *et al.* 2006). V průběhu posledních patnácti let bylo provedeno několik preklinických studií hodnotících senzomotorický vývoj prenatalně ovlivněných mláďat. Z těchto studií bylo zjištěno, že prenatalně užívaný MA vyvolává opožděný postnatální vývoj jedince, který je pozorován zpomalením posturálních reflexů, lokomoce a opožděným otevíráním očí. Studie zabývající se touto problematikou zjistily opožděný vývoj pomocí testu Vzpřimovací reflex na podložce (Acuff-Smith *et al.* 1996, Malinová-Ševčíková *et al.* 2014, Šlamberová *et al.* 2006), testu Negativní geotaxe hodnotící vestibulární a proprioreceptivní funkce (Hrubá *et al.* 2009), Rotarod (Hrubá *et al.* 2009, Pometlová *et al.* 2009) a Hrazdička (Šlamberová *et al.* 2006) hodnotící vývoj koordinace mozečku na konci období laktace (Holubová a Šlamberová 2017). Zároveň mláďata prenatalně ovlivněná MA otevírala oči později než kontrolní zvířata (Hrubá *et al.* 2009, Šlamberová *et al.* 2006).

Díky preklinickým studiím bylo dále zjištěno, že vliv prenatalního MA může trvat až do dospělosti (Šlamberová 2019). Dlouhodobá prenatalní expozice MA může ovlivnit neurologický vývoj potomků a může tak způsobit změny v chování, kognitivních funkcí, nocicepci a může ovlivňovat citlivost k epileptickým záchvatům (Acuff-Smith *et al.* 1996, Holubová a Šlamberová 2017, Schutová *et al.* 2009a, Šlamberová 2005, Yamamotová *et al.* 2011). Užívání drogy v raném věku může také zvýšit citlivost k té samé (MA) či jiné droze (amfetamin, MDMA, kokain) se stejným mechanismem účinku (Macúchová *et al.* 2016, Šlamberová *et al.* 2011). Zkřížená senzitivace po akutním podání MDMA a kokainu se však ukázala jen u samic laboratorního potkana (Šlamberová *et al.* 2013), což naznačuje rozdíly mezi pohlavím. Senzitivaci po aplikaci MA *in utero* potvrdila i studie Bubeníková-Valešová *et al.* (2009), kde byla pozorována zvýšená lokomoce po akutní aplikaci té samé drogy v dospělosti. Tento účinek koreloval se zvýšenou hladinou DA

v nucleus accumbens (Bubeníková-Valešová *et al.* 2009). Zdá se tedy, že prenatální expozice MA zvyšuje citlivost k drogové závislosti u dospělých jedinců (Holubová a Šlamberová 2017, Šlamberová *et al.* 2013). Nicméně zkřížená senzitivace k drogám s podobným mechanismem účinku je u MA slabší než senzitivizační účinek prenatální expozice kokainu (Estelles *et al.* 2006, Šlamberová 2019).

Nepříznivé účinky dlouhodobé prenatální expozice MA lze pravděpodobně částečně zlepšit kvalitní postnatální péčí, přičemž tento pozitivní efekt může ovlivnit vývoj potomka až do dospělosti (Holubová a Šlamberová 2017, Hrubá *et al.* 2009). Preklinické studie nicméně prokazující negativní vliv drogy aplikované během gestace na mateřské chování a zájem matky o mláďata. Ovlivněné matky vykazují horší mateřskou péči ve srovnání s kontrolami. Místo kvalitní mateřské péče pečují daleko více o sebe a více odpočívají mimo hnízdo. Také latence, se kterou navrací krátkodobě odloučená mláďata do hnízda, je mnohem delší než u kontrol (Holubová a Šlamberová 2017, Malinová-Ševčíková *et al.* 2014, Šlamberová *et al.* 2005a). Existuje tedy riziko, že potomci drogově závislých matek jsou více zanedbáváni a vystaveni dlouhodobému postnatálnímu stresu (Holubová a Šlamberová 2017, Rokyta *et al.* 2008, Šlamberová *et al.* 2005a).

## 1.2. Stres

Původní definice stresu říká, že stres je nespecifická reakce organismu na jakýkoliv škodlivý stimulus (Selye 1950). Později se začaly rozlišovat pojmy jako stresor a stresová odpověď organismu. Stresor může být například definován jako požadavek prostředí, který přesáhne fyziologické možnosti regulace organismu (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017). Profesor Selye již v polovině 20 století označil tzv. obecný syndrom adaptace za základní fyziologickou reakci organismu na podnět vyvolávající stres. Tento syndrom pak rozdělil na tři po sobě jdoucí fáze: poplašnou reakci, rezistenci a vyčerpání. Většina příznaků poplašné fáze vymizí během fáze rezistence, ale ve fázi vyčerpání se opět objeví. To naznačuje, že schopnost adaptace na změny má své hranice (Selye 1950). Adaptace na změněné podmínky prostředí představuje nepřetržitý proces, který je nezbytný pro přežití a udržení zdraví (Babicola *et al.* 2021).

### 1.2.1. Mechanismus účinku

Fyziologický mechanismus stresové odpovědi závisí na intenzitě a trvání daného stresoru. První fáze je charakterizována okamžitou odpovědí organismu na významné odchylky od homeostáze a zahrnuje rychlou aktivaci autonomního nervového systému (ANS) přes sympato-adreno-medulární osu (SAM). O trochu pomalejší je pak aktivace osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA). Tyto systémy zajišťují neurobehaviorální reakce na dané podněty a poskytují tak schopnost vyrovnat se s potenciálními život ohrožujícími stimuly. SAM osa zahrnuje propojení nervových a endokrinních funkcí, které vedou k aktivaci sympatiku. Vyplavení kortikoliberinu (CRH) jako neurotransmiteru v locus coeruleus (LC) vede k aktivaci medulárních center v nadledvinách. Jejich aktivací pak dochází k vyplavení katecholaminů, adrenalinu (A) a NA, do cirkulace, kde dále ovlivňují orgány přes specifické adrenergní receptory (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017). HPA osa je aktivována prostřednictvím CRH v paraventriculárním jádře hypotalamu (PVN). CRH působí na adenohipofýzu, kde stimuluje sekreci kortikotropinu (ACTH), který následně spouští sekreci glukokortikoidů z kůry nadledvin do oběhu. Glukokortikoidy jako kortizol (u lidí) a kortikosteron (u hlodavců) se zaměřují na glukokortikoidní (GR) a mineralokortikoidní (MR) receptory exprimované v různých limbických strukturách. Regulace nastává po obsazení určitého množství těchto receptorů aktivací negativní zpětné vazby. Afinita kortizolu k MR je vyšší než pro GR. Je možné, že MR zprostředkovává inhibiční funkce HPA osy v průběhu odpočinku a nestresových situacích. Oproti tomu GR pravděpodobně vyvolává kortizolovou regulaci stresem aktivované HPA osy (de Kloet *et al.* 2005, Holubová a Šlamberová 2017). Hipokampus, amygdala a dále i PFC vlastní oba typy receptorů (MR a GR), což z nich dělá vhodný cíl působení těchto hormonů. Tyto limbické oblasti hrají hlavní roli v modulaci osy HPA (Obr.3.) (Antonelli *et al.* 2017, Herman *et al.* 2003, Holubová a Šlamberová 2017). Interakce s podmiňujícími stimuly na základě paměti nebo druhově specifických predispozic mohou generovat inhibiční nebo excitační glukokortikoidní reakce. Hipokampus se účastní procesů učení, ukládání paměti a vyvolání paměti a je důležitý regulátor inhibičních mechanismů. Amygdala pak hraje důležitou roli kontroly emocionální a autonomní odpovědi na stres (Antonelli *et al.* 2017, Babicola *et al.* 2021, Holubová a Šlamberová 2017). Během stresu se tak zvyšuje míra pozornosti směřující k okolnímu prostředí na úkor pozornosti na jednotlivé úkoly, které nejsou pro přežití nezbytné. Kapacita epizodické paměti se během stresu snižuje a zlepšuje se učení a paměť pro emocionálně významné události. Nicméně chronická aktivace

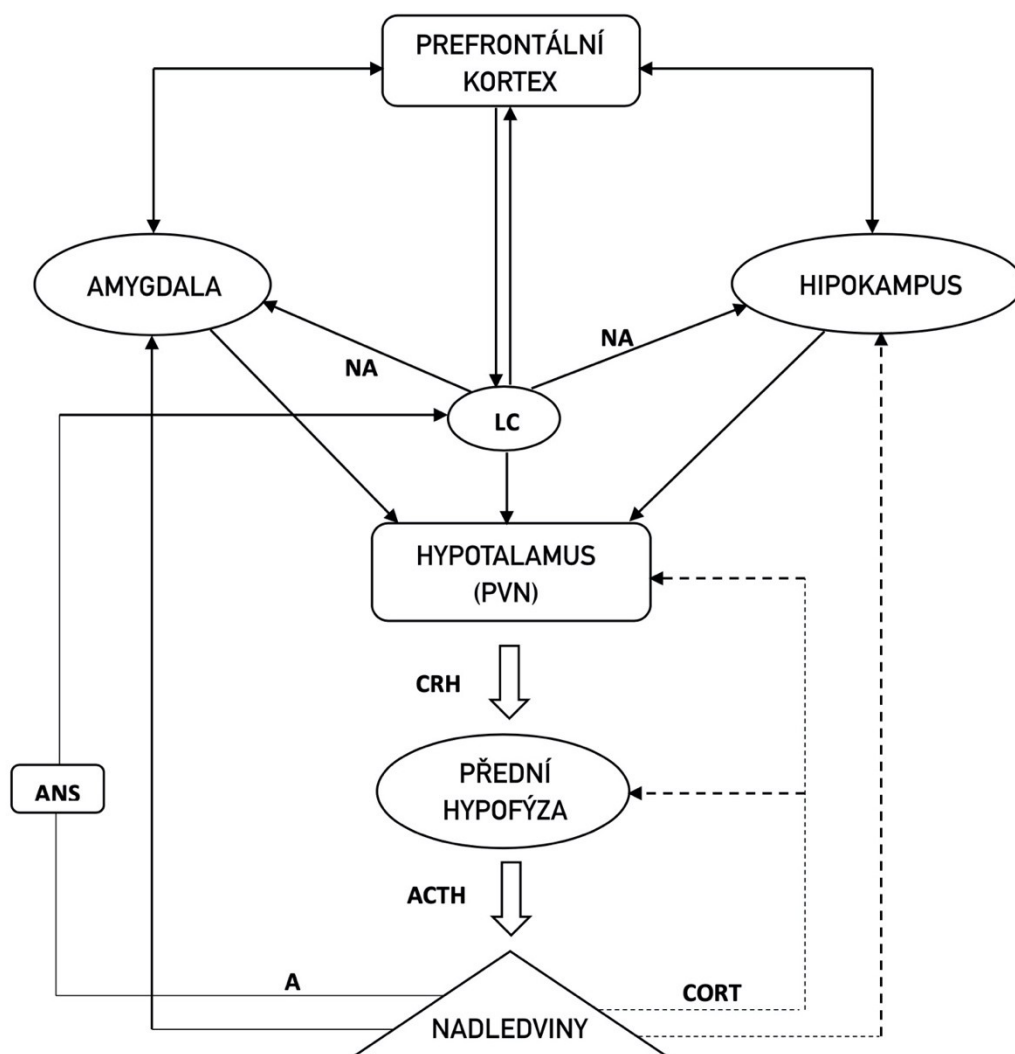
daných struktur může podporovat vznik specifických forem kognitivních poruch, stavu úzkosti, dysforie a poruch spánku (Meaney 2001). Spojení s amygdalou je tak asociováno zejména se zvýšenou úzkostí v průběhu stresu a spojení s hipokampem se zhoršeným učením, pamětí a dlouhodobou potenciací (LTP) (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017). Některé oblasti mozku modulují odpověď osy HPA prostřednictvím uvolňování neuropeptidů jako je neuropeptid Y, hormon stimulující  $\alpha$ -melanocyty, peptid podobný glukagonu, enkefalin, somatostatin a melanin nebo neurotransmitery jako je gamaaminomáselná kyselina (GABA), glutamát (Glu), 5-HT a DA (Babicola *et al.* 2021).

Velká část změn spojených se stresem je spojena s postižením dopaminergního systému, který reguluje různé typy chování a kognitivních funkcí. Bylo zjištěno, že prenatální stres zvyšuje hustotu DA receptorů téměř výhradně v limbických strukturách a Glu receptorů v limbických i motorických oblastech. Stres dále snižuje uvolňování DA v kortexu, postihuje expresi specifických DA transkripčních faktorů a narušuje tak rovnováhu mezi DA a Glu. Porucha těchto systémů je pak často spojována s psychiatrickými poruchami jako jsou psychózy a mánie, schizofrenie či ADHD (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017). Zvýšená sekrece glukokortikoidů také souvisí se změnami v aktivitě mezolimbické dopaminergní dráhy, která zahrnuje systém odměny. Její deregulace je popisována u psychopatologií závislosti a deprese (Oswald *et al.* 2005, Wand *et al.* 2007). Stres je také spojován s poruchou serotoninergního systému, jenž může přispět k úzkostným a depresivním poruchám daného jedince. Prenatální i chronický postnatální stres vyvolává různé změny v aktivitě 5-HT a enzymu tryptofan hydroxyláza 2 v dorzálním rafeálním jádře, hipokampu a PFC (Holubová a Šlamberová 2017, Van den Hove *et al.* 2014).

Kromě toho bylo prokázáno, že stresové zážitky, zejména během raného věku, jsou významnými rizikovými faktory pro rozvoj poruch vyvolaných stresem v dospělosti. Časné postnatální období představuje citlivé období pro dozrávání mozku, během kterého dochází k rozsáhlé neuronální plasticitě a remodelačním aktivitám, což umožňuje vývoj okruhů potřebných k reakci na budoucí podněty. Vystavení časné postnatálnímu stresu a jeho interakce s genetickými faktory tak mohou kriticky řídit vývoj mozkových okruhů a vyvolat širokou škálu dlouhodobých účinků, jako jsou změny neuroendokrinní signalizace, neuronální morfologie a plasticity. Stresové události z raného období tedy mohou zvýšit citlivost na stres a ovlivnit emocionální a sociální fungování jedince v dospělosti (Babicola *et al.* 2021).

Účinky stresu lze do jisté míry chápat jako soubor adaptivních reakcí vyvolaných stresory. Zvýšené sympatoadrenální uvolňování katecholaminů, především A a NA, stejně

jako adrenálních glukokortikoidů, řídí posun ke katabolismu, mobilizaci lipidových a glukózových rezerv a k inzulinovému antagonismu. Zvýšení cirkulujících hladin katecholaminů a glukokortikoidů také podporuje zvýšený kardiovaskulární tonus. Tyto akce slouží ke zvýšení dostupnosti a distribuce energetických substrátů. Ačkoli tyto reakce slouží ke splnění metabolických požadavků kladených stresem, dlouhodobé vystavení zvýšeným hladinám těchto stresových hormonů může podporovat inzulinovou rezistenci, hypertenzi, hyperlipidémii, hypercholesterolémii, zvýšené riziko arteriálního poškození a zvýšené riziko onemocnění srdce (Meaney 2001). Stres je tedy rizikovým faktorem pro velkou řadu poruch a onemocnění.



**Obr.3. Schéma propojení osy HPA s limbickým systémem.** Plné čáry znamenají stimulační efekt, přerušované čáry naopak efekt inhibiční. CRH – kortikoliberin, ACTH – kortikotropin, CORT – kortikosteron/kortizol, LC – locus coeruleus, NA – noradrenalin, A – adrenalin, ANS – autonomní nervový systém.

## 1.2.2. Prenatální stres

### 1.2.2.1. Klinické studie

Normální funkce ANS je základem pro regulaci stresové odpovědi v průběhu těhotenství. Porucha adaptace matky na hemodynamické změny v průběhu těhotenství může ovlivnit uteroplacentární oběh a vývoj plodu. Těhotné ženy mají přirozeně zvýšenou hladinu kortizolu, zejména po 21. týdnu těhotenství a jeho hladina převyšuje více jak dvakrát hladinu kortizolu u žen mimo těhotenství. Hladina kortizolu u plodu lineárně koreluje s hladinou kortizolu u matky. Plod je však před zvýšenou hladinou tohoto hormonu matky do jisté míry chráněn placentárním enzymem (11beta-hydroxysteroid-dehydrogenáza typ 2), který konvertuje kortizol na neaktivní kortizon. Ačkoliv bylo prokázáno, že osa HPA je s postupujícím těhotenstvím méně citlivá, silný stresový zážitek může vyvolat celou řadu vývojových postižení (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017). Prenatální stres tedy může přispět k nízké porodní hmotnosti, intrauterinní růstové retardaci a zvýšit pravděpodobnost vrozených vývojových vad (Michael a Papageorghiou 2008). Jak již bylo zmíněno výše, chronický stres může vyvolat změny zejména v limbickém systému (hipokampus, amygdala) a PFC. Tyto oblasti jsou spojeny s emočními, kognitivními procesy a s osobností jedince. U dětí je perinatální stres spojen se změnami v učení a paměti, v chování, s fyzickými a emocionální problémy, stejně jako s autismem a syndromem ADHD. U dospělých, je pak perinatální stres spojen s depresí a vznikem schizofrenie (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017).

### 1.2.2.2. Preklinické studie

Preklinické studie na potkanech prokázaly, že stres u matky během těhotenství zvyšuje nejen hladinu jejího vlastního cirkulujícího glukokortikoidu (u zvířat především kortikosteronu), ale také snižuje expresi a aktivitu protektivního enzymu v placentě, takže je plod méně chráněný. Snížení aktivity tohoto enzymu může vyvolat sníženou hmotnost potomků s vyšší hladinou glukokortikoidů a redukováným počtem MR a GR (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017). Prenatální stres může také vyvolat zvýšenou sekreci CRH a ACTH a může způsobit trvalé změny v obsahu NA v hypotalamu s možným anorektickým účinkem (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017). Dalším důležitým faktorem může být prenatálním stresem indukovaná redukce sekrece růstového hormonu (GH), která může z dlouhodobého hlediska způsobit opožděný růst (Jahn



*et al.* 1993). Prenatální stres může být tedy považován za model pro retardaci intrauterinního růstu. Zvířata vystavená prenatalnímu stresu vykazovala opožděný výskyt všech neonatálních reflexů a v dospělosti zvýšenou imobilitu a sníženou retenci v testu pasivního vyhýbání. Prenatální léčba diazepamem zcela potlačila dané nežádoucí účinky stresu (Drago *et al.* 1999). Také test nuceného plavání (Porsoltův test) ukázal zvýšenou imobilitu u dospělých samců laboratorního potkana, kteří byli prenatalně ovlivněni imobilizací matky (Alonso *et al.* 1991). Není jasné, zda toto chování souvisí s motorickou poruchou, ale jelikož se dá tato imobilita alespoň částečně zvrátit pomocí aplikovaných antidepresiv, můžeme hovořit o depresivním chování u dospělých potomků prenatalně vystavených silnému stresoru (Holubová a Šlamberová 2017). Je tedy pravděpodobné, že po expozici dlouhodobému prenatalnímu stresu dochází v mozku ke změnám hladin DA a NA, jenž souvisí s procesy paměti a deprese (Drago *et al.* 1999). I další experimentální studie na zvířatech prokázaly sníženou porodní hmotnost, deficit v učení a pozornosti, behaviorální změny, poruchy adaptability na stresové stimuly, snížení sociální interakce a další psychiatrické poruchy zahrnující například neuronální změny charakteristické pro schizofrenii (Antonelli *et al.* 2017, Holubová a Šlamberová 2017, Šlamberová *et al.* 2002). Imobilita matky a samotné injekční podání (s.c.) v období gestace vyvolala u dospělých samců zvýšenou lokomoci, vztyčování se na zadní nohy (tzv. „rearing“) a trávení více času v rozích otevřené arény (OF). Ve vyvýšeném křížovém bludišti (EPM) trávili samci méně času v otevřených ramenech než kontroly. Tyto změny v chování ovlivněných zvířat jsou považovány za anxiogenní chování (Vallee *et al.* 1997). Prenatální stres u dospělých potkanů tedy může vést k podobnému chování jako je úzkost a deprese (Holubová a Šlamberová 2017).

Některé preklinické studie poukázaly, že již samotné subkutánní injekční podání (s.c.) bez ohledu na charakter aplikované látky (MA/morfin/SA) může vyvolat významné změny v chování (anxiogenní, depresivní) a ve schopnosti reagovat na stres přetrvávající až do dospělosti (Holubová a Šlamberová 2017, Šlamberová *et al.* 2005a, Šlamberová *et al.* 2002). Zajímavé také je, že skupina zvířat s prenatalním injekčním podáním se oproti kontrolám v dospělosti nedokázala adaptovat na jiný chronický stres (Šlamberová *et al.* 2002). Injekční aplikace tak může hrát velmi významnou roli prenatalního stresoru, který může neblaze ovlivňovat funkční vývoj potomků. Vliv a rozsah účinku chronické injekční aplikace v období gestace nebyl prozatím dostatečně prostudován (Holubová a Šlamberová 2017).

### 1.2.3. Časně postnatální stres a stres matky

Ačkoli mnoho studií naznačilo, že PVN vykazuje maximální vývoj prenatálně (van Bodegom *et al.* 2017), i časně postnatální stres může vyvolat funkční a strukturální reorganizaci PVN. Při zprostředkování těchto změn hraje klíčovou roli zejména rodičovské chování. Tato raná forma sociální interakce může vyvolat funkční a strukturální modifikace během neuronálního vývoje PVN a způsobit jak snížené, tak i přehnané behaviorální a neuroendokrinní reakce na stres v dospělosti (Babicola *et al.* 2021). Některé studie prokázaly, že právě mateřská separace může vyvolat morfologickou reorganizaci PVN, zvyšující jak objem, tak počet neuronů obsahující vasopresin, což má za následek zvýšenou stresovou citlivost a anxiogenní reakce (Zhang *et al.* 2012). Expozice časně postnatálnímu stresu může také přeprogramovat nastavenou hodnotu osy HPA indukcí změn v expresi mRNA CRH, které mohou přetrvávat i po odstranění daného stresoru. Je zajímavé, že studie, které byly provedeny na myších a potkanech, ukázaly, že tyto změny jsou úzce spojeny s typem stresu a kvalitou mateřské péče (Bolton *et al.* 2019). Účinky stresu se zdají být silné a dlouhodobé, pokud je vztah matky a mláďete narušen během prvních dvou postnatálních týdnů, tj. během tzv. hyporesponzivního období, které tlumí vliv mateřských stresových hormonů (Babicola *et al.* 2021).

#### 1.2.3.1. Klinické studie

Koncept časně postnatálního stresu je široký a zahrnuje různé faktory, jako je ztráta rodičů, odloučení, dětské nemoci a násilí (Juruena *et al.* 2020). Jeden z nejtraumatičtějších zážitků však zahrnuje změny vazby na rodiče jako odloučení od matky (Driscoll a Barr 2016). Klinické studie prokázaly, že expozice tomuto stresoru může vyvolat dlouhodobé změny v odpovědi osy HPA a v mozkových okruzích zapojených do adaptace na stres, což vede ke změněným emocionálním a motivačním reakcím (Heim a Nemeroff 2002, Juruena *et al.* 2020). Tento stres je u dětí spojen se změnami ve struktuře a funkci hipokampu, nerovnováhou mezi GR a MR, což má za následek deregulaci osy HPA, zvýšenou citlivost vůči poruchám nálady v dospělosti a vyšší riziko rozvoje těžké deprese (Baes *et al.* 2014). Stres v raném věku je také spojen s vyšší pravděpodobností užívání návykových látek, urychluje přechod k pravidelnému užívání a zvyšuje riziko závislosti a relapsu v dospělosti (Babicola *et al.* 2021, Lijffijt *et al.* 2014).

Ke kvalitnímu vztahu matky a novorozence přispívá mnoho faktorů, zdá se však, že nejvíce je korelována míra úzkosti žen. Matky, které se cítily depresivně a úzkostně, měly ke svým dětem méně příznivý vztah (Field 1998, Meaney 2001). Bylo také zjištěno, že rodičovské vazby k dítěti koreluje s autonomními, HPA a mezolimbickými reakcemi DA na stres potomků (Meaney 2001). Klinické studie zaměřující se na vliv časné postnatálního stresu zjistily zvýšené riziko vývoje depresivního chování, post-traumatické stresové poruchy, ADHD a dalších dlouhotrvajících změn v chování (Abrines *et al.* 2012, Heim a Nemeroff 2001). U dětských obětí fyzického či sexuálního zneužívání je v dospělosti zvýšené riziko psychických poruch, obezity, diabetu a srdečních onemocnění. Srovnatelnou úroveň poruch po zneužívání je však možné pozorovat i po emocionálním zanedbávání a rodinných konfliktech vedoucích k poruchám růstu, intelektuálního vývoje, zvýšenému riziku obezity u dospělých lidí, depresím a úzkostným poruchám (Meaney 2001). Vysokoškolští studenti, kteří hodnotili své vztahy s rodiči jako odtažitě, měli čtyřikrát vyšší riziko chronických onemocnění, včetně depresí a alkoholismu, stejně jako srdečních chorob a diabetu (Russak a Schwartz 1997). Podobně i mladí dospělí, kteří popisovali chladné vztahy se svými rodiči, vykazovali zvýšené glukokortikoidní a kardiovaskulární reakce na stres, stejně jako zvýšené uvolňování DA ve ventrálním striatu (Meaney 2001, Pruessner *et al.* 2004). Naopak bylo zjištěno, že kvalitní vztah v pečující rodině může zvyšovat odolnost vůči chronickému stresu a snižovat tak riziko výskytu různých onemocnění (Meaney 2001, Smith a Prior 1995). Zdá se tedy, že vztah mezi stresem v raném věku a zdravím v dospělosti je částečně zprostředkován rodičovskými vlivy na vývoj nervového systému potomka, které jsou základem pro projev behaviorálních a endokrinních reakcí na stres (Meaney 2001).

Klinická studie Liles *et al.* (2012) ukázala, že matky, které užívaly MA během těhotenství (n=75 žen), uváděly více rodičovského stresu a více depresivních symptomů než kontrolní skupina bez užívání drog (n=137 žen). Vysoká úroveň rodičovského stresu byla u rodičů spojena s užíváním návykových látek, depresí a vnímanými problémy s chováním dětí (Kelley 1998, Liles *et al.* 2012). Rodičovský stres ve 4. měsíci věku dítěte významně predikoval externalizující chování dítěte ve 36. měsíci. Tyto vztahy však v dané studii nebyly ovlivněny expozicí drogy (kokain), což může také naznačovat, že vztah mezi rodičovským stresem a výsledkem chování existuje u vysoce rizikových dětí bez ohledu na vystavení droze (Bagner *et al.* 2009).

### 1.2.3.2. Preklinické studie

Normální funkce osy HPA je důležitá pro udržení homeostázy během stresu, zatímco neustálé uvolňování stresových hormonů, vyvolané opakovaným stresem, je charakteristickým znakem různých patologií (Babicola *et al.* 2021, Marais *et al.* 2008). Zajímavé je, že stres může mít pozitivní i negativní vliv na různé funkce. Expozice časné postnatálnímu stresu může mít za následek náchylnost nebo odolnost vůči psychickým poruchám v dospělosti, a to v závislosti na daných podnětech (Babicola *et al.* 2021, Daskalakis *et al.* 2013, Di Segni *et al.* 2016, Grissom a Bhatnagar 2009). Časně postnatální stres tedy může v určitých případech zvýšit jeho odolnost vůči pozdějším environmentálním stimulům (Babicola *et al.* 2021, Daskalakis *et al.* 2013, Di Segni *et al.* 2019, Fuentes *et al.* 2018, Grissom a Bhatnagar 2009, Holubová *et al.* 2016). Hlavním faktorem takových variací může být intenzita nebo kvalitativní rozdíly mezi jednotlivými stresory (Branchi *et al.* 2013, Moore *et al.* 2013). Stresory lze obvykle rozdělit na psychosociální a fyzikální stresory. Většina stresorů studovaných na zvířatech je však jejich kombinací (Grissom a Bhatnagar 2009). V naší práci jsme použili metodiky pro vytvoření sociálního stresoru představovaného mateřskou separací mláďat od matek (Lajud *et al.* 2012, Plotsky *et al.* 2005), fyzikálního stresoru matek prostřednictvím plavání ve studené vodě (Drago *et al.* 1999, Šlamberová *et al.* 2002) a kombinací obou těchto stresorů.

#### 1.2.3.2.1. Sociální stres

Jedním z animálních modelů časné postnatálního stresu je mateřská separace. Tento sociální stresor je založen na dlouhodobě opakované separaci mláďat od matek, která může vést ke zhoršení mateřského chování a následně ke změnám v chování ovlivněných potomků (Aisa *et al.* 2007, Holubová a Šlamberová 2017). I mláďata laboratorního potkana procházejí fyziologicky v prvních dvou týdnech po narození hyporesponsivním obdobím, které je charakterizováno nízkou bazální aktivitou osy HPA a resistencí vůči běžným stresorům. Mateřská separace silně ovlivňuje a aktivuje odpověď osy HPA i přes toto hyporesponsivní období (Holubová a Šlamberová 2017, Lajud *et al.* 2012). Chronické zvýšení glukokortikoidů po dlouhodobé mateřské separaci může postihnout především struktury s vysokou hustotou MR a GR (Huot *et al.* 2002). Vystavení tomuto typu neonatálního stresoru tak může dlouhodobě zvýšit aktivitu osy HPA a vyvolat opožděný vývoj mláďat (Mesquita *et al.* 2007), změny v jejich chování a může vést ke zneužívání drog v dospělosti (Holubová a Šlamberová

2017, Plotsky *et al.* 2005). Studie na zvířatech také prokázaly, že tento postnatální stres může vést k úzkostnému chování (Aisa *et al.* 2007, Heim a Nemeroff 2001, Holubová a Šlamberová 2017, Yang *et al.* 2017). Studie Aisa *et al.* (2007) hodnotila míru anxiety v EPM. Expozice tomuto chronickému stresu zvýšila míru anxiogenního chování ovlivněných zvířat v porovnání s kontrolami (Aisa *et al.* 2007, Holubová a Šlamberová 2017). I v dalších testech pro hodnocení daného chování, například v OF, byl prokázán vliv mateřské separace. Potkani trávili méně času v centru OF a více času péčí o sebe sama (olizováním, mytím) (Yang *et al.* 2017). Jak již bylo řečeno, chronický časné postnatální stres (Aisa *et al.* 2007), stejně jako déletrvající stres aplikovaný jednorázově (Eagle *et al.* 2013), může vést k závažným zdravotním potížím zahrnující i poruchy kognitivních funkcí (Holubová a Šlamberová 2017). Studie Eagle *et al.* (2013) zjistila, že i déletrvající jednorázová expozice stresovému zážitku snižuje zájem o jinak vyhledávaný objekt. Výsledky studie Llorente *et al.* (2011) ukazují, že chronická mateřská deprivace vyvolává persistentní deficit paměti u postnatálně ovlivněných zvířat. Vystavení chronickému stresoru v období laktace u matky může vést také k horší mateřské péči s poruchou kojení, které opět může vést k dlouhodobým změnám ve vývoji, chování a kognici potomstva (Holubová a Šlamberová 2017, Nephew a Murgatroyd 2013).

U dospělých zvířat, které byly časné postnatálně ovlivněny krátké 3-15minutové manipulaci (tzv. „handling“), byla zjištěna utlumená reakce osy HPA na stres. Oproti tomu dlouhodobý stres prostřednictvím mateřské separace během prvních 2 týdnů života vede ke zvýšené odpovědi této osy v dospělosti. Tyto účinky na osu HPA jsou částečně zprostředkovány změnou expresí GR v oblastech mozku, které zprostředkovávají glukokortikoidní negativní zpětnovazební regulaci (Liu *et al.* 2000, Meaney *et al.* 1989, Viau *et al.* 1993). Dlouhodobá manipulace se zvířaty („handling“) zvyšuje expresi GR v hipokampu a PFC, zatímco mateřská separace je spojena se sníženou hladinou GR v hypotalamu, hipokampu a PFC (Bhatnagar a Meaney 1995, Liu *et al.* 2000, Meaney *et al.* 1996). Mateřská separace tedy snižuje citlivost negativní zpětné vazby, zatímco manipulace se zvířaty tuto citlivost zvyšuje (Meaney *et al.* 1996). Mateřská separace také zvyšuje odpověď NA na „restrain“ stres v PVN ve srovnání s kontrolami; stejný vzorec byl pozorován také u odpovědi plazmatického ACTH na stres. Na druhou stranu, po opakované manipulaci typu „handling“ byl u zvířat významně zvýšený počet vazebných míst  $\alpha 2$ -receptoru v noradrenergických buněčných oblastech těla LC a n. tractus solitarius. Tyto  $\alpha 2$ -receptory jsou umístěny hlavně na noradrenergických neuronech a inhibují uvolňování

NA v terminálních místech. Účinky na hustotu  $\alpha 2$ -receptorů by tak mohly sloužit jako mechanismus pro rozdíly ve hladinách NA vyvolaných po expozici stresu v PVN a v aktivitě osy HPA mezi zvířaty s manipulací a mateřskou separací (Liu *et al.* 2000).

#### 1.2.3.2.2. Fyzikální stres

Dalším z animálních modelů stresu je plavání matek ve studené vodě. Plavání ve studené vodě je velmi stresující fyziologický stav (Knechtle *et al.* 2020). Předchozí preklinické studie používaly daný stresor, buď v průběhu březosti zvířat (Drago *et al.* 1999), anebo přímo na dospělá zvířata (Šlamberová *et al.* 2002). Zvířata vystavená tomuto stresu *in utero* vykazovala opožděný vývoj neonatálních reflexů, zvýšenou imobilitu v Porsoltově testu nuceného plavání a depresivní chování v dospělosti (Drago *et al.* 1999). Fyzikální stres prostřednictvím plavání ve studené vodě u dospělých zvířat prenatálně ovlivněných jiným stresem (injekční podání) zvýšil anxiogenní chování (Šlamberová *et al.* 2002). Opakované plavání potkanů ve studené vodě v dospělosti však nevyvolalo v následném testu OF předpokládané snížení lokomoce či „rearingu“, nebyl ovlivněn ani parametr čistění sama sebe („grooming“). Dané výsledky mohou být vysvětleny možnou habituací dospělých potkanů na opakovanou (2-týdenní) expozici stresoru, a to i přes rozdílnou dobu expozice tomuto stresoru v průběhu dne (Šlamberová *et al.* 2002). Stresor přestává být stresující, jakmile zvíře daný stresor očekává (Dhabhar *et al.* 1997). Nicméně potkani ovlivnění opakovanou prenatální aplikací fyziologickým roztokem (SA, s.c.) se neadaptovali na plavání ve studené vodě jako kontrolní zvířata. Tato zjištění tedy naznačují, že prenatální stresory, jako je injekční aplikace matce, zhoršují schopnost potomstva adaptovat se na chronický fyzikální stresor v dospělosti (Šlamberová *et al.* 2002). Zda tento fyzikální stres ovlivňuje mladého jedince, pokud je aplikovaný časně postnatálně skrz jeho matku, není doposud prozkoumáno.

Jiný fyzikální stres, který způsobuje omezení pohybu („restrain“ stres), není pro potkany oproti psychosociálnímu stresu tolik významný (McEwen 2001). Při první expozici tomuto fyzikálnímu stresu dochází k určitým potížím a velkému zvýšení glukokortikoidů v krvi. S opakováním tohoto stresu ale v průběhu několika dnů dochází k habituaci odpovědi osy HPA na stres, jenž je charakterizovaná počátečním rychlým zvýšením uvolnění kortikosteronu, které je však postupně ukončováno dříve s každým opakováním daného stresu (McEwen 2001). Nicméně 21 dní po opakované expozici „restrain“ stresu byla i navzdory habituaci odpovědi osy HPA zjištěna suprese neurogeneze v gyrus dentatus (McEwen 2001, Pham *et al.* 2003). Potkani po této době dlouhodobého

stresu vykazovali také zvýšený strach v OF a zvýšenou agresi ke svému společníkovi v domácí kleci (McEwen 2001). Studie Jin *et al.* (2013) zjistila, že chronický „restrain“ stres v raném věku může zvýšit citlivost hipokampu potkanů vůči následnému stresu nuceného plavání ve studené vodě v dospělosti, což vede k deficitu pracovní paměti u dospělých potkanů a snižuje strukturální plasticitu samotného hipokampu (Jin *et al.* 2013).

## 2. Hypotézy

Metodiky užívané v laboratoři Ústavu fyziologie 3.LF UK jsou experimentálními modely pro výzkum drogové závislosti a dlouhodobých účinků prenatální expozice MA na morfologický a funkční vývoj laboratorního potkana. Nicméně kombinace prenatální aplikace MA a perinatálního stresu mláďat není doposud prozkoumána. Pojem perinatální stres v této práci zahrnuje injekční (s.c.) aplikaci SA gravidním samicím a časně postnatální expozici sociálnímu a fyzikálnímu stresu. Konkrétněji, faktor prenatálního stresu byl sledován právě prostřednictvím skupiny s prenatální aplikací (s.c.) SA a faktor časně postnatálního stresu pak pomocí sociálního (S)/fyzikálního (W) stresu či jejich kombinací (SW). Pro sociální stres (S, SW) byla vybrána metoda mateřské separace a pro fyzikální stres (W, SW) metoda plavání matek ve studené vodě (pro detailní popis viz bod 4.4.).

Tato práce vychází z našich hypotéz, že prenatální MA/stres i časně postnatální stres:

- naruší mateřské chování matek v období laktace,
- negativně naruší vývoj mláďat v období laktace,
- zhorší sociální chování s neznámým vrstevníkem v juvenilním věku samic i samců,
- sníží plazmatické hladiny oxytocinu u juvenilních samic,
- zvýší míru úzkosti u dospělých samců,
- negativně naruší kognitivní funkce u dospělých samců laboratorního potkana.



### 3. Cíle

Na základě výše zmíněných hypotéz jsme stanovili následující cíle, a to zjistit vliv sledovaných perinatálních faktorů na:

- mateřské chování v období laktace,
- vývoj sensorimotoriky mláďat,
- sociální chování v juvenilním období mláďat,
- hladinu oxytocinu v juvenilním období samic,
- anxieta a další sledované chování zvířat v dospělosti,
- kognitivní funkce exponovaných zvířat v dospělosti.

U všech behaviorálních testů potomstva a stanovení hladin oxytocinu jsme také sledovali možnou senzitivizaci téže drogy v pozdějším období, tedy vliv akutního podání MA v nižší dávce 1 mg/kg 45 min před testem.

Součástí výzkumu bylo sledování matek a jejich chování vůči mláďatům v období laktace. Mateřské chování jsme sledovali dlouhodobě v období laktace pomocí těchto testů:

- Observační test
- „Retrieval“ test

Mláďata (samci i samice) jsme testovali na sensorimotorický vývoj za pomoci těchto behaviorálních testů:

- Vzprímovací reflex na podložce
- Negativní geotaxe
- Vzprímovací reflex ve vzduchu
- Hrazdička
- Rotarod

Juvenilní potomky jsme testovali v behaviorálním testu:

- Sociální hra („Social play“ test), což je test na pozorování sociálního chování, tedy reakce zvířat v případě kontaktu s neznámým zvířetem.

Dále jsme provedli biochemické stanovení hladiny periferního plazmatického oxytocinu u juvenilních samic laboratorního potkana:

- Odběr krve následoval ihned po behaviorálním testu Sociální hra.

Dospělé potomstvo jsme také testovali za pomoci následujících behaviorálních testů:

- Otevřená aréna (OF)
- Vyvýšené křížové bludiště (EPM)
- Morrisovo vodní bludiště (MWM)

Výsledky naší práce prohloubí znalosti v oblasti drogové závislosti, jejího vzniku, mechanismu účinku MA a jejích následků ve spojení s perinatálním stresem.

## 4. Materiál a metodika

### 4.1. Péče o laboratorního potkana a fertilizace

Dospělé samice laboratorního potkana kmene Wistar, jejichž hmotnost byla v rozmezí 250-300 g pocházely z chovu Charles River Laboratories International, Inc. a dodány byly chovnou stanicí Anlab, s.r.o. (Praha, Česká republika). Od stejného chovatele pocházeli i samci ve váhovém rozmezí mezi 350 a 400 g. Zvířata byla ustájena po skupinách v počtu 4 zvířat na klec (dle pohlaví) v chovných nádobách o rozměrech 45 cm x 30 cm x 20 cm (š. x h. x v.). Zvířata byla ponechána v klidu a nerušena po dobu jednoho týdne od dodání v místnostech s kontrolovanou teplotou 22-24 °C, s dostatečným množstvím jídla a pití (*ad libitum*). V místnostech byl standartní světelný režim, tedy cyklus 12 h světlo/12 h tma se začátkem světelné fáze v 6:00 h ráno. Po aklimatizaci byl zahájen proces připouštění. Samice byly denně váženy a pomocí vaginálního výplachu byla u nich ze vzorku pod mikroskopem stanovena fáze estrálního cyklu (metestrus, diestrus, proestrus či estrus). Samice, které byly vyhodnoceny v plodné fázi reprodukčního cyklu (proestrus-estrus), byly ustájeny přes noc s dospělým samcem (vždy 1 samice a 1 samec v 1 kleci). Následující den jsme u samic na základě přítomnosti spermií v novém vaginální výplachu určili, zda došlo k fertilizaci. Tento den byl pak označen jako první den gestace. Poté byly samice vráceny do svých původních klecí a denně váženy po celou dobu gestace.

### 4.2. Prenatální aplikace

Samice byly po fertilizaci náhodně rozděleny do tří skupin podle subkutánní (s.c.) aplikace denně po celou dobu březosti: (1) MA v dávce 5 mg/kg, (2) SA v dávce 1 ml/kg, a (3) kontrola (C) bez injekční aplikace. MA jako D-metamfetamin HCl byl dodán firmou Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Dávka 5 mg/kg byla zvolena na základě předešlých zjištění, že koncentrace v mozku zvířat odpovídá hodnotám naměřeným u plodu drogově závislých matek (Acuff-Smith *et al.* 1996, Rambousek *et al.* 2014). Aplikace této látky v dané dávce březím samicím laboratorního potkana je dlouhodobě používaný experimentální model pro stanovení účinků a dopadů této drogy *in utero* na potomstvo. Konkrétně je tento experimentální model používán v naší laboratoři od roku 2002. Všechny tři skupiny matek byly každý den váženy. Každá samice byla 20. den gestace umístěna do své vlastní

„mateřské“ klece. Pravidelnou aplikaci látek ukončil den porodu, který byl vůči mládřatům označen jako postnatální den (PD) 0.

### **4.3. Postnatální "cross-fostering"**

V PD 1 jsme mládřata označili dle prenatální expozice látek intradermální aplikací tetovacího inkoustu: MA skupina mládřat byla označena na levé zadní noze, SA skupina byla označena na pravé zadní noze. Kontrolní skupina mládřat bez prenatální aplikace látky nebyla označena vůbec. Pro eliminaci vlivu rozdílného mateřského chování a péče způsobené podáváním drogy či injekcí (Holson a Pearce 1992, Šlamberová *et al.* 2005a) byla některá mládřata přidělena k matkám z jiných skupin. Tento způsob rozdělení mládřat se označuje jako „cross-fostering“ a byl proveden tak, aby každá matka vychovávala 4 MA, 4 SA a 4 C mládřata. Každý vrh byl tedy složen dohromady ze 12 mládřat a byla snaha o stejný počet samců a samic dle prenatálních skupin.

### **4.4. Postnatální stres**

Dané vrhy mládřat byly poté rozděleny do čtyř skupin dle postnatální aplikace stresu: 1. sociální stresor prostřednictvím mateřské separace (S), 2. fyzikální stresor prostřednictvím plavání matek ve studené vodě (W), 3. sociální i fyzikální stresor (SW), 4. nestresovaná kontrola (N). Expozice stresu byla prováděna jednou denně od PD 1 do PD 21. V PD 21 byla mládřata odstavena od matek a přeložena do jiných klecí.

#### **4.4.1. Sociální stres**

Sociální stres byl aplikován prostřednictvím mateřské separace v průběhu období laktace, tedy denně od PD 1 do PD 21. Mládřata byla vystavena mateřské separaci denně na 3 hodiny mezi 10:00-13:00 (Lajud *et al.* 2012, Plotsky *et al.* 2005). Všechna mládřata z odpovídajících experimentálních skupin (S a SW) byla jemně odebrána z mateřské klece a vložena do separační klece v jiné místnosti tak, abychom zabránili jejich kontaktu s matkou pomocí vokalizace. Separační klec byla postavena na hřejivé podložce kvůli udržení běžné teploty mládřat a předejití jejich prochladnutí. Po třech hodinách separace matek a mládřat, byla mládřata vložena zpět do mateřské klece k matce.

#### 4.4.2. Fyzikální stres matek

Fyzikální stres byl aplikován prostřednictvím plavání matky ve studené vodě (Drago *et al.* 1999, Šlamberová *et al.* 2002) denně v průběhu období laktace (PD 1-21). Potkaní matky byly nuceny plavat v bazénu o průměru 40 cm ve studené vodě o teplotě 5° C po dobu 5 minut s hloubkou vody 25 cm. Každá matka z odpovídající experimentální skupiny (W a SW) byla jednotlivě vložena do studené vody a po uplynutí 5 minut vytažena. Ihned poté jsme danou matku usušili ručníkem a zahřáli pod lampou do doby než byla téměř suchá. Poté jsme ji dali zpět do její mateřské klece. Voda v bazénu byla vyčištěna po každém zvířeti.

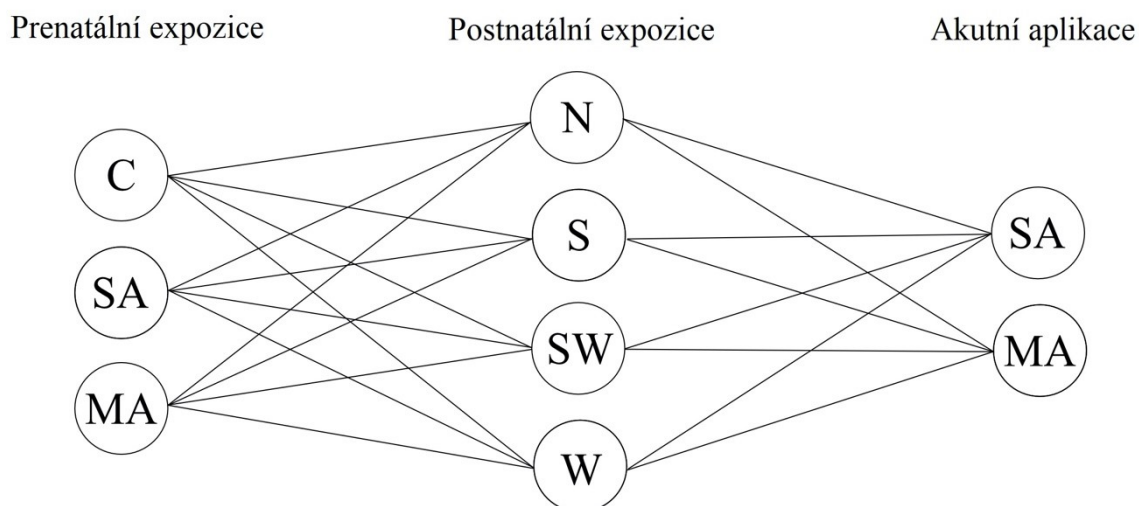
#### 4.5. Aplikace drogy v dospělosti

Pro stanovení citlivosti potomků na stejnou drogu v pozdějším životě, jsme před každým behaviorálním testem po odstavení mláďat rozdělili všechny skupiny zvířat na polovinu tak, abychom mohli jedné polovině aplikovat (s.c.) MA v dávce 1 mg/kg a druhé stejným způsobem (s.c.) SA (1 ml/kg). Dávka MA 1 mg/kg na rozdíl od vyšších dávek nezpůsobuje stereotypní chování a nenarušuje tak průběh testu (Schutová *et al.* 2010). Drogu jsme podávali 45 minut před behaviorálním testem, jelikož v tomto časovém odstupu dochází při subkutánnímu podání k maximální koncentraci MA v mozku a účinek je tak nejlépe pozorovatelný (Rambousek *et al.* 2014). Pouze v případě dvanáctidenního testu MWM jsme zvířatům podali MA/SA každý den po skončení testu (vyjma posledního dne) a dále i ve dnech mezi jednotlivými fázemi testů (Schutová *et al.* 2010).

#### 4.6. Experimentální skupiny

Potomci (samci/samice) byly rozděleny do skupin na základě několika hodnocených faktorů. Na základě prenatální expozice (injekční s.c. aplikace matce denně po celou dobu březosti) byly testovány 3 skupiny zvířat prenatálně vystavených: MA (5 mg/kg), SA (stres z injekční aplikace) a kontroly (C) bez injekční aplikace. Každou z těchto skupin jsme dále rozdělili dle aplikace různých stresorů v průběhu postnatální periody PD 1-21: sociální stres prostřednictvím mateřské separace 3h denně (S), fyzikální stres prostřednictvím nuceného plavání matek ve studené vodě po dobu 5 minut denně (W), kombinace obou těchto stresorů (SW), nestresované kontroly (N), čímž jsme získali 12 skupin (MA-S, SA-S, C-S, MA-W, SA-W, C-W, MA-SW, SA-SW, C-SW, MA-N, SA-N, C-N). Pro určení případné senzitivace

u behaviorálních testů po odstavení mláďat jsme těchto dvanáct skupin dále rozdělili na polovinu podle aplikace látky 45 minut před testem, buď 1 mg/kg MA nebo 1 ml/kg SA, čímž jsme finálně získali 24 testovaných skupiny (n=8-10 zvířat do skupiny a pro test Sociální hra n=8 párů za skupinu) na jeden typ behaviorálního testu (Obr.4.).



**Obr.4. Schéma experimentálních skupin.** Prenatální expozice: C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. Postnatální expozice: N – nestresovaná kontrola, S – sociální stres prostřednictvím mateřské separace, W – fyzikální stres prostřednictvím plavání matek ve studené vodě, SW – kombinace sociálního a fyzikálního stresoru. Akutní aplikace: SA – akutní podání fyziologického roztoku 45 min před testem, MA – akutní podání metamfetaminu 45 min před testem.

#### 4.7. Aplikované testy a odběry

Senzorimotorický vývoj mláďat, samců i samic, byl testován pomocí po sobě jdoucích testů. Ve stejné časové periodě (laktace) jsme sledovali i mateřské chování matek vůči potomkům. Sociální hra byla pak testována u juvenilních mláďat obou pohlaví, a to v PD 30. Ostatní behaviorální testy (OF, EPM, MWM) byly testovány v dospělosti mezi PD 60-90, a to pouze u samců. Sledování samic v dospělosti by bylo časově nad rámec této práce, jelikož samice je třeba v dospělosti rozdělit do dalších dvou skupin dle jejich estrálního cyklu (metestrus/diestrus a proestrus/estrus) v den testu.

## **4.7.1. Vývoj mlád'at**

### **4.7.1.1. Parametry mlád'at**

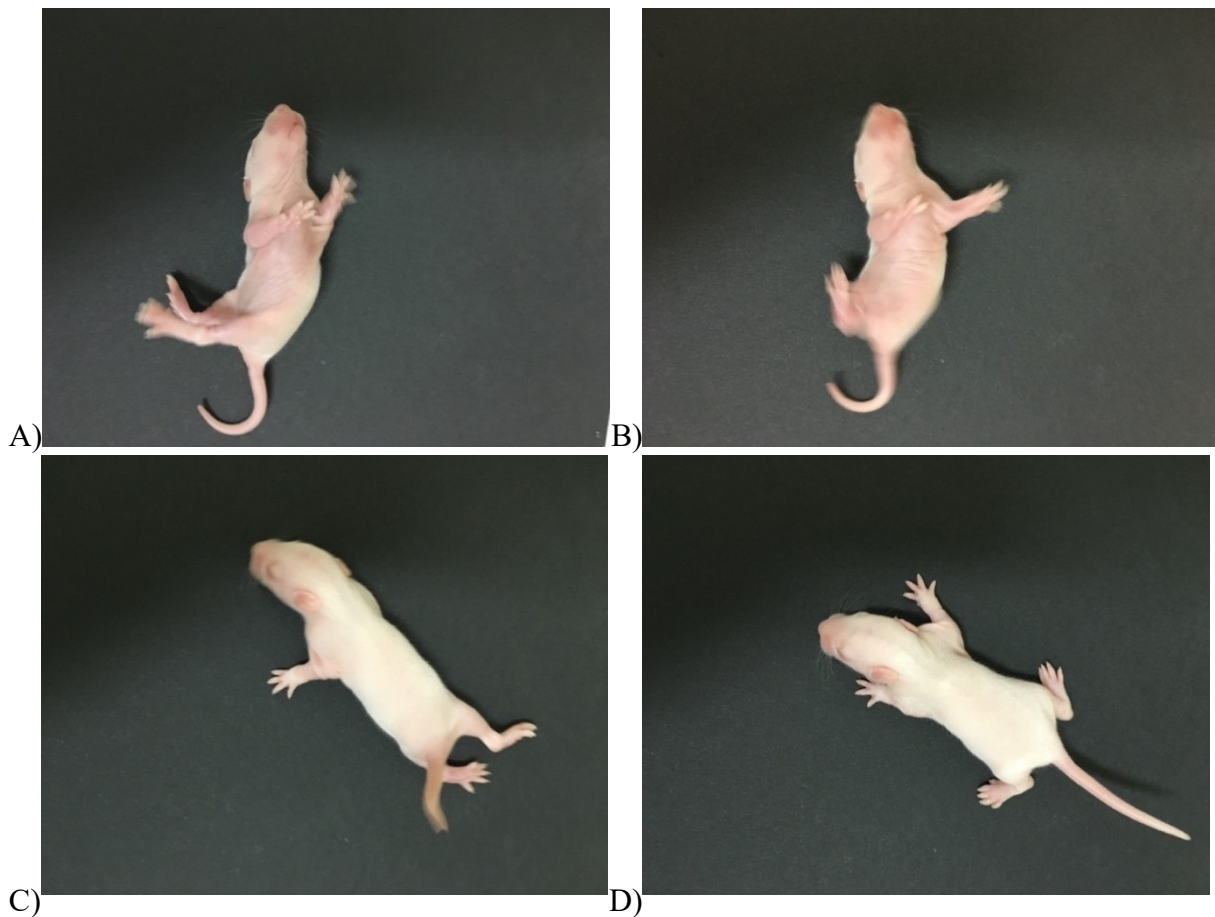
Den po porodu, v PD 1, byl spočítán celkový počet mlád'at a poměr samců a samic v jednom hnízdě. Dále byla všechna mlád'ata zvážena a tato hmotnost byla označena jako porodní. Hmotnostní přírůstek byl pak zaznamenáván v průběhu celého období laktace od PD 1 do PD 21. Mlád'ata byla podrobena "cross-fosteringu" (popsáno výše).

### **4.7.1.2. Baterie testů hodnotící senzomotorický vývoj mlád'at**

Pro provedení těchto testů jsme použili podobný protokol, který je popsán v člancích vědecké skupiny Altman a Sudarshan (1975), Šlamberová *et al.* (2006) a Malinová-Ševčíková *et al.* (2014).

#### **4.7.1.2.1. Vzpřimovací reflex na podložce**

Vzpřimovací reflex na podložce byl prováděn denně od PD 1 do PD 12 (Obr.5), a to po aplikaci postnatálních stresorů. Každé mládě bylo položeno na záda a byla zaznamenávána doba latence od puštění mláděte do jeho samostatného přetočení na všechny čtyři končetiny. Horní limit byl stanoven na 60 s, pokud se mládě do tohoto limitu nevzpřímilo, byl mu započítán právě maximální čas 60 s.

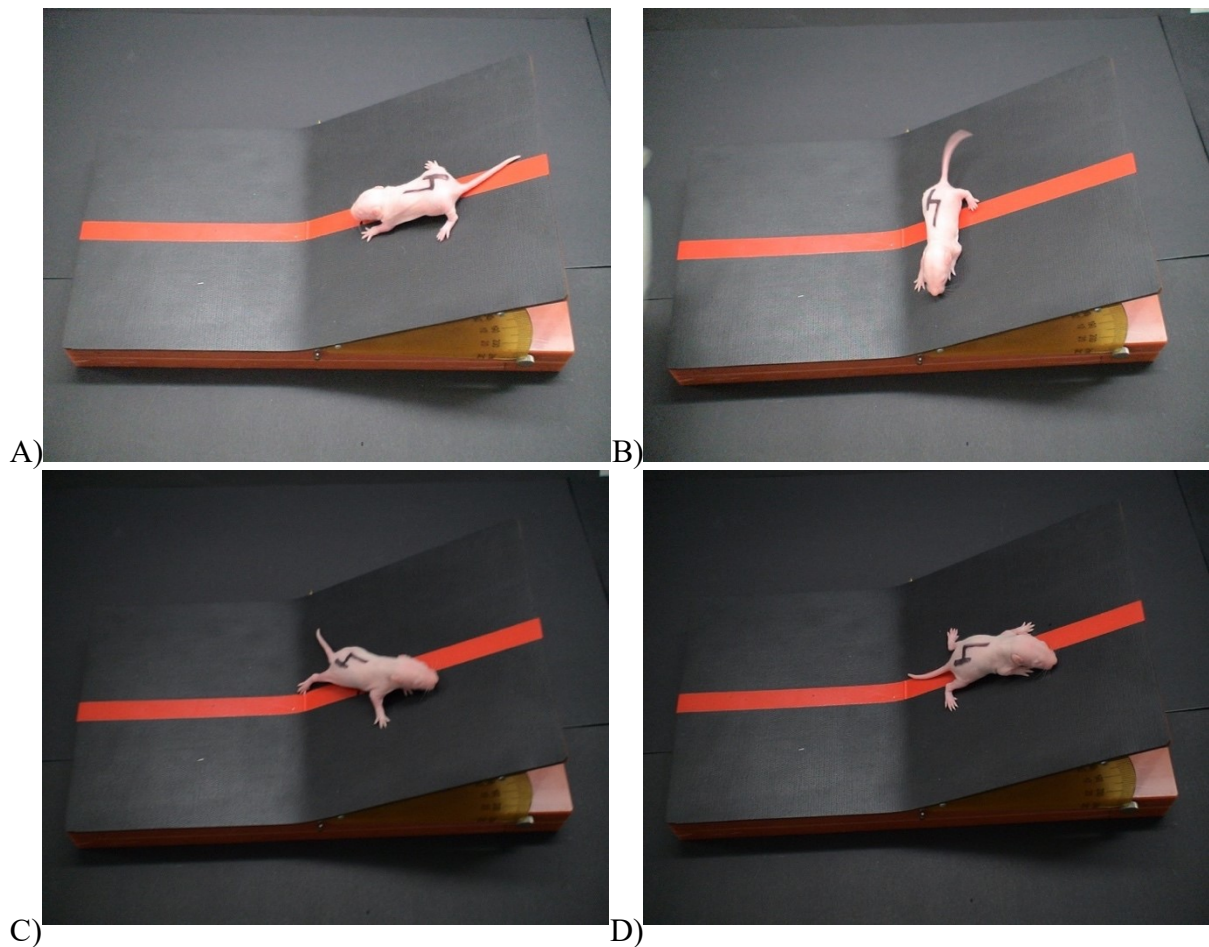


**Obr.5. Ukázka vzpřimovacího reflexu na podložce mláděte laboratorního potkana.**  
Postupné kroky A) - D) na sebe navazují.

#### 4.7.1.2.2. Negativní geotaxe

Negativní geotaxe byla provedena jednorázově v PD 9 (Obr.6.). Každé mládě bylo položeno na polohovanou podložku v úhlu 30 °, a to hlavou dolů. Doba latence od puštění mláděte do jeho samostatného otočení na podložce hlavou nahoru byla měřena 3krát po sobě. Každý potkan měl tedy 3 pokusy. Započítán byl pak nejlepší čas. Horní limit pro tento úkon byl 15 s.





**Obr.6. Ukázka úkonu negativní geotaxe mláděte laboratorního potkana v PD 9.**  
Postupné kroky A) - D) na sebe navazují.

#### **4.7.1.2.3. Vzpřimovací reflex ve vzduchu**

Vzpřimovací reflex ve vzduchu jsme testovali jednorázově v PD 17. Každé mládě bylo podrženo břichem nahoru ve výšce 40 cm nad měkkou podložkou a po puštění mláděte bylo sledováno, v jaké pozici dopadlo na měkkou podložku. Pokud mládě dopadlo na všechny 4 končetiny, tedy se v letu otočilo o 180 °, bylo hodnoceno hodnotou „1“. Pokud se tak nestalo, bylo ohodnoceno hodnotou „0“.

#### **4.7.1.2.4. Hrazdička**

Udržení rovnováhy na rovné hrazdičce bylo pozorováno v PD 23 (Obr.7.). Tento test zjišťuje funkci vestibulárního systému a sensorimotorické koordinace. Hrazdička je 40 cm dlouhá, rovná tyč s průměrem 1 cm, vyvýšená 80 cm nad měkkou podložkou. Mláďata byla jednotlivě umístěna na hrazdičku tak, aby se byla schopna po puštění na hrazdce udržet,

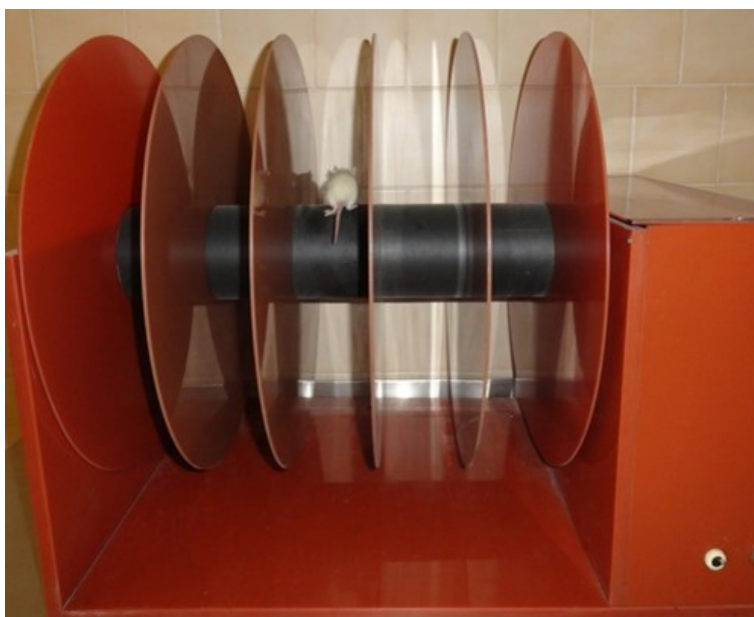
tedy hřbetem nahoře a končetinami na hrazdičce. Po umístění mláděte na hrazdičku byl měřen čas, po který se jedinec na hrazdě udržel. Horní limit pro dobu měření byl stanoven na 120 s. Každé mládě bylo vystaveno třem pokusům.



**Obr.7. Ukázka testu Hrazdička.**

#### **4.7.1.2.5. Rotarod**

Pro další stanovení senzomotorické koordinace a reakce na změnu polohy těla nutné pro udržení rovnováhy byl v PD 23 proveden test Rotarod (Obr.8.). Rotarod je válec s průměrem 11,5 cm, točící se stálou rychlostí 6 rpm. Mláďata byla na rotarod umístěna jednotlivě, tak aby na sebe neviděla, čelem proti směru pohybu rotarodu. Pro udržení rovnováhy na rotarodu byl tedy vyžadován jejich pohyb kupředu. Pro vyhodnocení výsledku byl u každého jedince měřen čas udržení na rotarodu s horním limitem 120 s. Každé mládě bylo vystaveno třem pokusům.



**Obr.8. Ukázka testu Rotarod.**

## **4.7.2. Mateřské chování**

Mateřské chování matek vůči vychovávaným mláďatům bylo sledováno denně od 8:00 do 10:00, a to v domácím prostředí matek a jejich mláďat (Šlamberová *et al.* 2005a, Malinová-Ševčíková *et al.* 2014). Matky jsme hodnotili tzv. Observačním testem a dále pak „Retrieval“ testem, které jsou popsány dále.

### **4.7.2.1. Observační test**

Observační test probíhal denně po celou dobu laktace, tedy od PD 1 do PD 21. Během tohoto testu byla každá matka sledována 10krát po dobu 5 s v 5minutových intervalech, celkově byla tedy každá matka s vrhem sledována 210krát (21 dní x 10 pozorování). Při tom jsme sledovali aktivitu matky a pozici při kojení, takto jsem získali informace o 11 různých aktivit matek a o 3 jejich pozicích při kojení. Tyto sledované aktivity jsme si rozdělili na mateřské a „nemateřské“ aktivity. Do mateřských aktivit jsme zahrnuli: přítomnost matky v hnízdě, kontakt s mláďaty, mytí mláďat, nošení mláďat a manipulaci s hnízdem. Do „nemateřských“ aktivit, které nejsou spojeny s rolí matky, jsme dále zahrnuli: mytí sama sebe, jedení, pití, odpočívání se zavřenými očmi, stavění se na zadní nohy („rearing“) a čichání.

Dále jsme také rozeznávali tři pozice při laktaci, a to: aktivní pozici s hřbetem do oblouku, aktivní pozici se zalehnutím mláďat (bez oblouku) a pasivní pozici, kdy matka ležela bokem nebo na zádech. Pokud byla daná pozice či aktivita pozorována, zapsala se jako „1“, pokud nebyla, zaznamenalo se „0“.

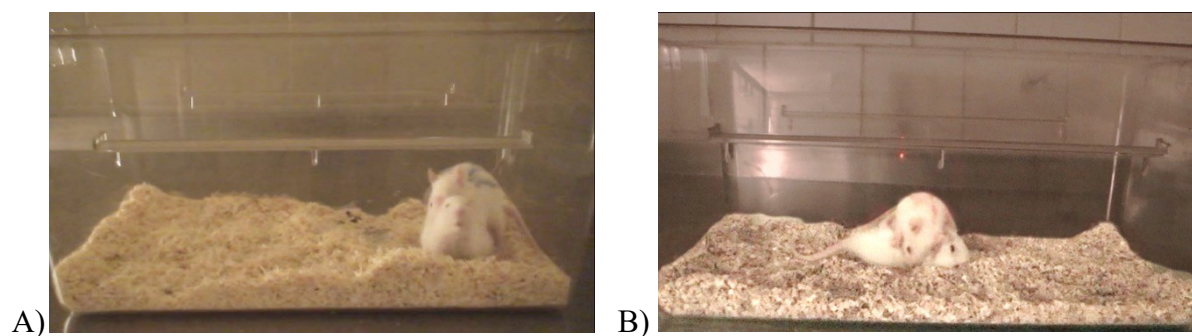
#### 4.7.2.2. „Retrieval“ test

„Retrieval“ test následoval po ranním Observačním testu, a to denně mezi PD 1 a PD 12. Při tomto testu jsme z mateřské klece vyjmuli všechna mláďata a přesunuli je do jiné separační klece na dobu 5 minut. Separační klec byla položena na hřející podložce, aby si mláďata udržela jejich běžnou teplotu těla. Po 5 minutách byla všechna mláďata vrácena k matce tak, že byla rozptýlena jednotlivě po celé ploše mateřské klece. Od tohoto okamžiku byl měřen čas pro tři různé parametry chování každé matky: 1) doba latence pro uchopení prvního mláděte, 2) doba latence pro přinesení prvního mláděte do hnízda a 3) doba latence pro přinesení všech mláďat do hnízda. Horní limit pro tyto aktivity byl 10 min.

#### 4.7.3. Sociální hra

Behaviorální test Sociální hra byl proveden dle předchozích publikací či prací v naší laboratoři (Vanderschuren *et al.* 1997, Vanderschuren *et al.* 2008, Achterberg *et al.* 2014, Ševčíková *et al.* 2020). Dva týdny před samotným testem byl juvenilním potkanům (samcům i samicím) v jejich místnosti otočen světelný cyklus se světlem od 18:00 do 6:00. V PD 28 a 29 bylo každé zvíře vždy individuálně habituováno po dobu 10 min v testovací kleci a místnosti. V PD 29 pak byla zvířata na noc umístěna po jednom do klece, tedy izolována od kontaktu s jiným zvířetem tak, aby exprese sociálního chování v dalším dni byla usnadněna. Samotný behaviorální test Sociální hra proběhl v PD 30 v transparentní kleci z plexiskla o rozměrech 43 x 26,5 x 18 cm se dnem pokrytým pilinami a v testovací místnosti s tlumeným osvětlením. Vždy dvě zvířata stejného věku, pohlaví a ze stejné sledované skupiny (totožná prenatalní, postnatalní i akutní expozice) byla umístěna do testovací klece na dobu 15 min. Sledovaná zvířata v páru byla podobné hmotnosti a navzájem se neznala (nebyla ze stejné společné klece, ve které zvířata vyrůstala). Chování v testu Sociální hra bylo nahráváno na kameru a videa byla později analyzována za použití ODLog systému (Macropod Software). Sledovali jsme následující parametry: 1) frekvenci chování „pouncing“ – tj. jedno zvíře se snaží skočit na druhé zvíře a kousnout ho do šije (Obr.9.A), 2) frekvenci

chování „pinning“ – tj. jedno zvíře leží na zádech a druhé stojí nad ním (Obr.9.B). Tato dvě chování jsou hlavními parametry Sociální hry (Vanderschuren *et al.* 1997) dále doplněné o 3) frekvenci chování „boxing“ – tj. podoba zápasu boxu předními končetinami. Zároveň jsme sledovali i 4) sociální exploraci (s) - tedy celkovou dobu sociální interakce zvířat jako očíhávání a olizování druhého zvířete („non-playful“ chování).



**Obr.9. Sociální chování v rámci testu Sociální hra.** A) „Pouncing“ – útok na šíji společníka, B) „Pinning“ – jedno zvíře leží na zádech a druhé stojí nad ním.

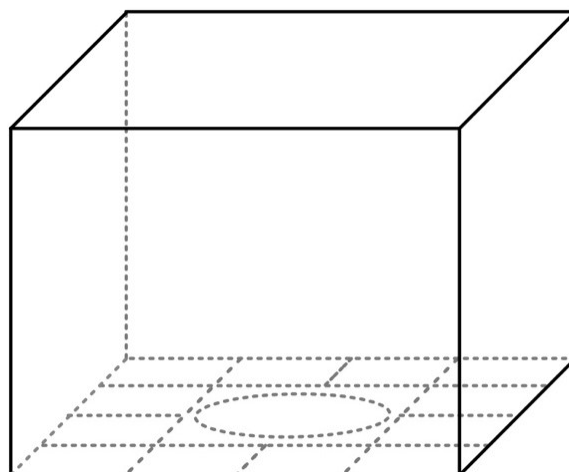
#### 4.7.4. Stanovení hladiny oxytocinu

Stanovení hladiny periferního oxytocinu bylo provedeno u juvenilních samic starých 30 dní (PD 30). Počet zvířat ve skupině bylo 10-12 samic. Odběry krve byly provedeny ihned po behaviorálním experimentu Sociální hra. Zvířata byla před odběrem utrácena dekapitací. Z jejich trupu pak byla odebrána krev, v objemu zhruba 2 ml krve, do připravených předchlazených plastových zkumavek obsahujících 1 000 KIU (500 KIU/ml) aprotininu (SIGMA). Z krve ve zkumavce jsme v centrifuze oddělili plazmu a z ní pak vyextrahovali oxytocin dle metodiky kolektivu autorů Szeto *et al.* (2011). Extrakce z pevné fáze byla provedena na C18Sep-Pak kolonách, které byly nejdříve ekvilibrovány 3 ml acetonitrilu a poté dvakrát promyty 3 ml 0,1% trifluoroctové kyseliny. Vzorky s 1 ml plazmy byly smíchány vždy s 1 ml 0,1% trifluoroctové kyseliny a vloženy do centrifugy při 14 000 g na dobu 20 min a při teplotě 4 °C. Vyčištěná, okyselená plazma z centrifugy pak byla aplikována na kolonu. Část vzorku, která protekla kolonou byla vyražena a kolona byla promyta 3 ml 0,1% trifluoroctové kyseliny a dvakrát 3 ml deionizované vody. Oxytocin byl poté z kolony vymyt 3 ml 60% acetonitrilu a vysušené vzorky byly uloženy při -70 °C až do stanovení množství oxytocinu ve vzorku. Samotné stanovení oxytocinu pak bylo provedeno s použitím kitu Oxytocin ELISA (Enzo) podle pokynů výrobce. Účinnost extrakce

byla 88 %. Intra-variace byla menší než 11 % a inter-variace byla menší než 16 %, což splňuje rozmezí uvedené v pokynech od výrobce.

#### 4.7.5. Otevřená aréna

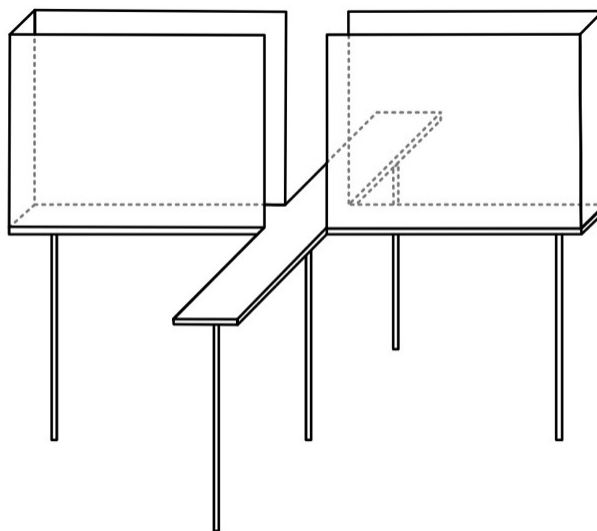
Dospělí samci byli testováni na úzkostné chování v OF v průběhu PD 60-90 (Schutová *et al.* 2010). Zvířata byla v den testu ponechána v testovací místnosti po dobu cca 30 minut ve své kleci, aby se aklimatizovala na danou místnost. Prostor OF je velký zhruba 45 x 45 x 30 cm se třemi neprůhlednými stěnami a jednou transparentní (přední) stěnou, přes kterou bylo chování samců natáčeno (Obr.10.). Podlaha této arény byla rozdělena několika nakreslenými liniemi a uprostřed arény byl vyznačen centrální kruh s průměrem 20 cm. V této aréně zvířata nikdy před testem nebyla, byla tedy v průběhu testu vystavena neznámému prostředí. Chování potkanů bylo v den testu nahráváno na video po dobu 10 minut. Poté byla zvířata vyjmuta a vložena do svých původních klecí. Po každém zvířeti jsme podlahu i stěny otevřené arény umyli dezinfekčním roztokem (Ajatin) a usušili, aby nebylo další zvíře ovlivněno pachovou stopou toho předchozího. Výsledná videa byla analyzována manuálně pomocí ODLog softwaru. Hodnoceny byly následující parametry: 1) čas strávený v centrálním kruhu, 2) čas strávený v rozích arény, 3) čas strávený pečováním o sebe (čistění se), 4) čas strávený v nehybné pozici (imobilita), 5) lokomoce, tj. celkový počet přejitých linií, 6) čas strávený čicháním a 7) čas strávený v pozici na zadních nohou („rearing“).



**Obr.10. Aparatura OF.**

#### 4.7.6. Vyvýšené křížové bludiště

Dospělí samci (PD 60-90) byli na úzkostné chování testováni také v EPM (Schutová *et al.* 2010). Zvířata byla v den testu ponechána v testovací místnosti po dobu cca 30 minut ve své kleci, aby se aklimatizovala na danou místnost. Toto bludiště se skládá ze čtyř ramen, která jsou uprostřed spojená a jsou 50 cm nad zemí (Obr.11.). Dvě protilehlá ramena jsou uzavřená neprůhlednými stěnami a zbylá dvě protilehlá ramena jsou naopak otevřená, beze stěn. Díky centrálnímu otevřenému spojení všech ramen se mohla zvířata volně pohybovat mezi všemi rameny. Zvířata byla v průběhu testu v bludišti vystavena opět neznámému prostředí a jejich chování bylo nahráváno na video po dobu 5 minut. Poté byla zvířata vyjmuta a vložena do svých původních klecí. Po každém zvířeti jsme podlahy ramen i jejich stěny umyli dezinfekčním roztokem (Ajtain) a usušili, aby nebylo další zvíře ovlivněno pachovou stopou toho předchozího. Výsledná videa byla analyzována manuálně pomocí ODLLog softwaru. Hodnoceny byly následující parametry: 1) čas strávený v uzavřených ramenech, 2) čas strávený v otevřených ramenech, 3) čas strávený v pozici, kdy hlava a ramena zvířete byly nataženy do otevřené části bludiště, ale nohy zvířete zůstaly v uzavřeném rameni („stretched attend posture“, SAP), 4) čas strávený čicháním, 5) čas strávený v pozici na zadních nohou a (6) četnost vstupů do všech otevřených i uzavřených ramen.



Obr.11. Aparatura EPM.

#### 4.7.7. Morrisovo vodní bludiště

Pro zhodnocení kognitivních funkcí v dospělosti byli testováni pouze dospělí samci laboratorního potkana ve věku PD 60-90 (Schutová *et al.* 2009a). Po dobu 12 dní byli samci sledováni v jednotlivých úkonech zaměřující se na učení a paměť v MWM (Morris 1984, Stuchlík 2003). MWM zahrnuje tři po sobě jdoucí specifické testy: 1) Učení, 2) „Probe“ test a 3) Test paměti (viz Tab.1.). MWM je kulaté vodní bludiště typu bazénu s průměrem 2 metry s vodou o teplotě  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Uvnitř bludiště je dle typu testu umístěn skrytý ostrůvek (transparentní, 13 cm v průměru) dosahující 1,5 cm pod hladinou vody a po okraji bazénu jsou vyznačeny čtyři startovní pozice (sever, jih, východ a západ), které rozdělují vodní bludiště na pomyslné 4 kvadranty. Na zdech kolem bazénu je ve viditelné výšce pro zvířata umístěno několik různých obrazců tak, aby si zvíře snadněji zapamatovalo polohu ostrůvku a vytvořilo si prostorovou mapu pro hledání. Pro tento experiment byl použit kamerový systém EthoVision XT 10 (Noldus Information Technology, Holandsko) zachycující a měřící jednotlivé úkony potkanů.

TEST	UČENÍ							„PROBE“ TEST				PAMĚŤ
DEN	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*	12

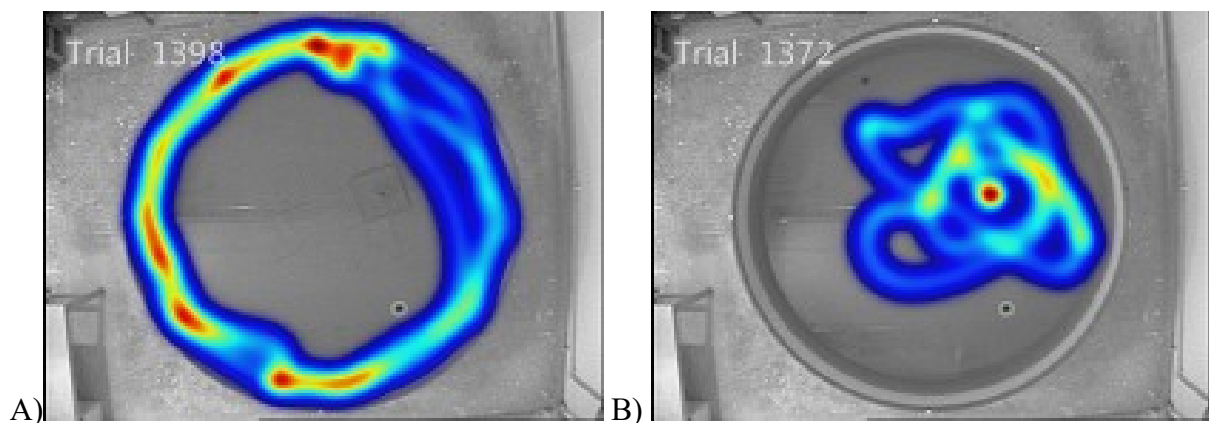
**Tab.1. Jednotlivé fáze kognitivního testu MWM.** Učení (1. – 6. den), „Probe“ test (8. den) a Test paměti (12. den). \* aplikace látky (akutní MA/SA v dospělosti).

##### 4.7.7.1. Učení

Během prvních 6 dní MWM byla zvířata cvičena k nalezení skrytého ostrůvku. Daný jedinec byl do bludiště vypouštěn ve dvou cyklech ze čtyř různých míst kolem bludiště v tomto pořadí: sever, jih, východ a západ. Každé zvíře tedy podniklo 8 pokusů o nalezení ostrůvku za den. Skrytý ostrůvek pod hladinou vody byl stále na jednom místě. Pokud zvíře ve vodě ostrůvek nenalezlo během 60 s, bylo jemně navedeno na místo skrytého ostrůvku manuálně. Na konci každého pokusu bylo zvíře ponecháno 30 s na ostrůvku, aby si dané místo zapamatovalo a odpočalo si před dalším pokusem z jiného místa. Po 8 pokusech



v daném dni byl každý jedinec usušen ručníkem a vrácen do své domácí klece. Měřeny byly následující parametry: 1) „Search error“ (chyba v hledání) - vzdálenost od ostrůvku (cm), tj. neschopnost zvířete plavat v relativně přímé dráze ze startovní pozice do místa skrytého ostrůvku, 2) vzdálenost (cm) – celková vzdálenost uplavaná v bludišti, 3) latence – doba nalezení ostrůvku (s), a 4) rychlost plavání (cm/s). Dále byla hodnocena strategie hledání skrytého ostrůvku, kterou lze rozdělit na tigmataxi či skenování prostoru (Macúchová *et al.* 2017, Schutová *et al.* 2009a). Tigmataxe je definována jako plavání okolo bludiště v rozmezí 30 cm od okraje bazénu, zatímco skenování je definováno jako plavání s průměrem 1 m od místa ostrůvku (Obr.12.). U obou strategií byl měřen celkový čas věnující se dané strategii (s), vyjádřený také v procentech (%).



**Obr.12. Strategie hledání skrytého ostrůvku v MWM. A) Tigmataxe. B) Skenování.**

#### 4.7.7.2. „Probe test“

„Probe test“ byl proveden 8. den experimentu v MWM bludišti. Ostrůvek byl tento den odstraněn z bludiště a zvířata byla zkoušena, zda si pamatují pozici dříve umístěného skrytého ostrůvku. Samci potkana byli jednotlivě pouštěni vždy jen z jednoho místa v bludišti (bylo vybráno startovací místo ze severu) a v bazénu byli sledováni po dobu 60 s. Měřeny pak byly následující parametry: 1. uplavaná vzdálenost (cm) a 2. rychlost plavání (cm/s). Dále byly sledovány obě strategie plavání, tj. tigmataxe a skenování.

### 4.7.7.3. Test paměti

Test paměti proběhl 12. den experimentu. Úkolem potkanů bylo najít skrytý ostrůvek, který byl znovu umístěn na stejném místě jako v průběhu prvních šesti dní učení. Každé zvíře podniklo 8 pokusů o nalezení ostrůvku trvající maximálně 60 s, a to opět ze čtyř různých startovacích míst (proběhly dvě kola). Parametry sledované v této části experimentu byly totožné jako v první fázi MWM, tj. v testu Učení.

## 4.8. Statistická analýza dat

Všechna data nejdříve prošla testem tzv. normality, stanovili jsme tedy zda došlo k normálnímu Gaussovskému rozložení a rozptylu dat. Pro danou analýzu jsme použili testy D'Agostino-Pearson omnibus normality test a Shapiro-Wilk normality test. V našich datech při těchto testech nebyl nalezen signifikantní výsledek, což ukazuje na normální rozložení dat. Data byla dále analyzována pomocí parametrického testu, k čemuž jsme použili vyhodnocení pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Bonferonni *post-hoc* test byl využit u všech sensorimotorických a behaviorálních testů. Stanovení hladiny oxytocinu bylo hodnoceno pomocí Fisherova *post-hoc* testu. Četnost výskytu jevu byla porovnávána pomocí  $\chi^2$  testu. Za signifikantní byl vždy považován rozdíl, pokud  $p < 0,05$ . Data byla poté zobrazena v grafech jako průměr  $\pm$  střední chyba průměru (SEM).

Výsledky dat byly prezentovány ve formátu  $[F(N-1, n-N) = xx,xx; p < 0,0x]$ , kde F je hodnota testovaného kritéria, N-1 stupeň volnosti skupin, n-N stupeň volnosti jednotlivého subjektu, x je daný výsledek a p hladina významnosti. Data  $\chi^2$  testu byla prezentována jako  $\chi^2 = xx,xx, p < 0,0x$ , kde  $\chi^2$  je testovací kritérium, x je daný výsledek a p je opět hladina významnosti.

Konkrétněji, **celkový počet mlád'at, poměr samců a samic** v jednom vrhu a **porodní hmotnost** byly analyzovány pomocí 2-faktorového testu ANOVA (*Prenatální expozice x Pohlaví*). **Hmotnostní přírůstek** byl pak hodnocen pomocí 3-faktorového testu ANOVA (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Pohlaví*). Pro mnohonásobné porovnání jsme použili Bonferonni *post-hoc* test.

V baterii testů pro vývoj mlád'at jsme postupovali následovně:

**Vzpřimovací reflex na podložce** jsme hodnotili 3-faktorovým testem ANOVA (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Pohlaví*) s opakovaným měřením (Dny). Test

**Negativní geotaxe** jsme analyzovali 3-faktorovým testem ANOVA (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Pohlaví*). U testu **Vzpřimovacího reflexu ve vzduchu** jsme posuzovali četnost správného dopadu na podložku, což bylo dále porovnáváno pomocí  $\chi^2$  testu. Pro pozdější testy **Hrazdička** a **Rotarod** jsme použili 3-faktorový test ANOVA (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Pohlaví*) s opakovaným měřením (Pokusy). Bonferonni *post-hoc* test byl použit pro mnohonásobné porovnávání.

Analýza mateřského chování, **Observační test** a „**Retrieval test**“ u matek, zahrnovala 2-faktorový test ANOVA (*Prenatální expozice x Postnatální expozice*) s opakovaným měřením (*Dny*) a dále Bonferonni *post-hoc* test.

V testu **Sociální hra** jsme získaná data porovnávali 4-faktorovým ANOVA testem (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Aplikace v dospělosti x Pohlaví*). Pro mnohonásobné porovnání jsme použili Bonferonni *post-hoc* test.

Statická analýza dat **hladiny oxytocinu** u juvenilních samic, která následovala ihned po testu Sociální hra, zahrnovala 3-faktorový test ANOVA (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Aplikace v dospělosti*) a Fisher *post-hoc* test pro mnohonásobné porovnávání.

V obou testech **OF** a **EPM** jsme získaná data hodnotili podobně, tj. 3-faktorovým ANOVA testem (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Aplikace v dospělosti*) a dále jsme použili Bonferonni *post-hoc* test pro mnohonásobné porovnávání.

V testu **MWM – Učení** jsme použili na statickou analýzu 3-faktorový ANOVA test (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Aplikace v dospělosti*) s víceúrovňovým opakovaným měřením (*Dny x Pokusy*). Druhou fází testu „**Probe**“ jsme opět vyhodnocovali 3-faktorovým ANOVA testem (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Aplikace v dospělosti*). A pro vyhodnocení poslední fáze testu, tj. **Paměti** jsme použili 3-faktorový ANOVA test (*Prenatální expozice x Postnatální expozice x Aplikace v dospělosti*) s víceúrovňovým opakovaným měřením (Pokusy). Pro mnohonásobné porovnání jsme použili opět Bonferonni *post-hoc* test.

## 5. Výsledky

### 5.1. Mateřské chování

#### 5.1.1. Vliv expozice MA/stresu v průběhu gestace

Vliv podaných látek v průběhu gestace byl po statické analýze patrný u parametru čištění mláďat [ $F_{(2,88)}=4,02$ ;  $p<0,05$ ], kdy matky ovlivněné MA aplikací čistily svá mláďata významně méně než kontrolní matky C ( $p<0,05$ ). Potkaní matky s aplikací MA v průběhu březosti potřebovaly také delší dobu pro přenos všech mláďat zpět do hnízda v „Retrieval“ testu ve srovnání s matkami s aplikací SA [ $F_{(2,81)}=4,01$ ;  $p<0,05$ ]. V jiných parametrech se významné rozdíly mezi prenatálními skupinami neukázaly.

#### 5.1.2. Vliv expozice stresu v průběhu období laktace

Statistická analýza ukázala rozdíly v pasivním typu kojení [ $F_{(3,82)}=19,28$ ;  $p<0,01$ ] u skupin matek ovlivněných v průběhu období laktace různými stresory. Všechny stresované skupiny matek S ( $p<0,01$ ), SW ( $p<0,01$ ) a W ( $p<0,01$ ) věnovaly kojení v pasivním postoji daleko více času než matky nestresované N. Rozdíly v aktivním typu kojení se mezi skupinami neprokázaly. Všechny skupiny matek kojily s postupujícím obdobím laktace v obou aktivních pozicích méně, zatímco pasivní kojení se s postupující sledovanou periodou prodlužovalo, a to bez ohledu na sledované perinatální faktory.

Stres v průběhu období laktace ovlivnil také kontakt matek s mláďaty [ $F_{(3,80)}=7,46$ ;  $p<0,05$ ]. Stresované matky S ( $p<0,05$ ), SW ( $p<0,05$ ) a W ( $p<0,05$ ) byly se svými mláďaty oproti nestresovaným kontrolám N více v kontaktu. Žádný významný rozdíl se v ostatních mateřských aktivitách (přítomnost matky v hnízdě, čištění mláďat, manipulace s hnízdem) neukázal. Matky mláďata v pozorovaný čas téměř nenosily, statistická analýza tohoto parametru tak nešla provést. S postupujícím obdobím laktace trávily všechny skupiny matek méně času v hnízdě a v kontaktu s mláďaty.

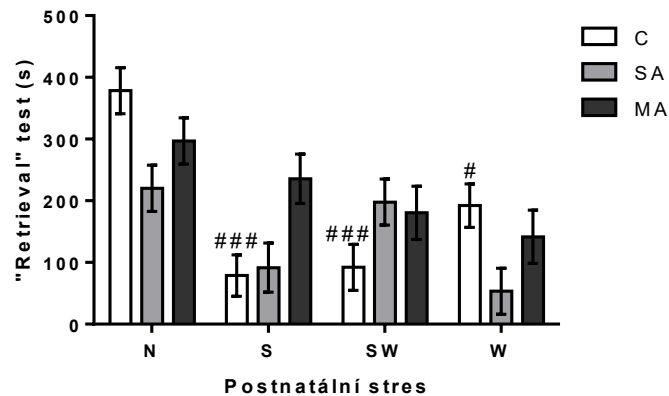
Co se týče „nemateřských“ aktivit, které nejsou spojeny s rolí matky, pak nestresované matky N odpočívaly se zavřenými očima [ $F_{(3,82)}=13,40$ ;  $p<0,001$ ] významně méně než matky vystavené stresu v období laktace. Tento efekt byl dle analýzy dat prokázán pouze mezi kontrolními matkami C, kterým nebyla v průběhu gestace aplikována žádná substance. Rozdíl ( $p<0,05$ ) vyšel u všech stresovaných skupin S, SW a W v porovnání s nestresovanou

skupinou N. Další rozdíl u „nemateřských aktivit“ (čištění sama sebe, jedení, pití, stavění se na zadní nohy a čichání) se neukázal (Tab.2.). S postupujícím obdobím laktace všechny skupiny matek více jedly, pily a spaly. Parametr čištění sama sebe kolísal během období laktace a byl nejvyšší v první polovině této periody.

	S			SW			W		
	C	SA	MA	C	SA	MA	C	SA	MA
Aktivní kojení s obloukem	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aktivní kojení bez oblouku	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pasivní kojení	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
V hnízdě	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V kontaktu	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Mytí mláďat	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nošení mláďat	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Manipulace s hnízdem	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mytí sama sebe	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Jedení	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pití	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Odpočívání	↑	0	0	↑	0	0	↑	0	0
„Rearing“	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Čichání	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tab.2. Mateřského chování.** C – kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Výsledky jsou prezentovány jako rozdíl v dané skupině ku své postnatální kontrole N. ↑ - četnost tohoto chování se oproti kontrolní skupině N významně zvýšila. NA – četnost byla tak nízká, že nešlo provést statistickou analýzu („not aplicable“).

Postnatální stres dále ovlivnil „Retrieval“ test v parametru navrácení všech mláďat do hnízda [ $F_{(3,81)}=13,04$ ;  $p<0,001$ ]. Tento efekt byl prokázán pouze u matek bez jakékoliv aplikace v průběhu gestace (C). Kontrolní C-matky stresované v období laktace různými typy stresoru, tj. S ( $p<0,001$ ), SW ( $p<0,001$ ) a W ( $p<0,05$ ), přenesly svá mláďata do hnízda rychleji než C-matky z nestresované skupiny N. U matek ovlivněných MA či SA v průběhu gestace se tento efekt neprokázal (Obr.13.).



**Obr.13. Navrácení všech mláďat do hnízda v rámci „Retrieval“ testu.** Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± střední chyba průměru (SEM). C – prenatalní kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatální nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. #  $p<0,05$ , ###  $p<0,001$  významný rozdíl mezi danými skupinami a jejich postnatální kontrolou (N).

## 5.2. Vývoj mlád'at

### 5.2.1. Parametry mlád'at

#### 5.2.1.1. Vliv prenatalní expozice MA/stresu

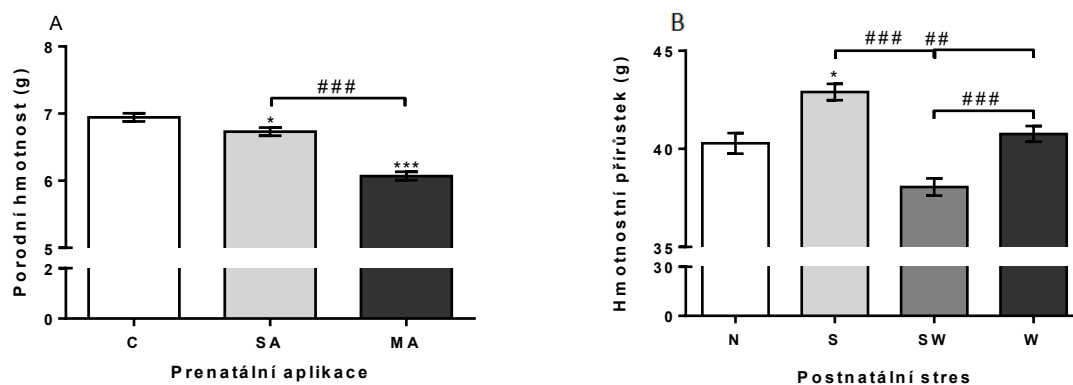
Statistická analýza ukázala významný rozdíl v parametru porodní hmotnosti mlád'at [ $F_{(2,352)}=53,69$ ;  $p<0,001$ ], kdy prenatalně ovlivněná mlád'ata (MA/SA) vážila výrazně méně než kontroly (C), a to bez ohledu na pohlaví. Dle Bonferonni *post-hoc* testu vážila nejméně mlád'ata ve skupině prenatalně ovlivněných MA ( $p<0,001$ ), u skupiny SA to bylo ( $p<0,05$ ) oproti skupině kontrol. Mlád'ata prenatalně ovlivněná MA ( $p<0,001$ ) vážila také daleko méně než mlád'ata s prenatalní expozicí SA (Obr.14.). Aplikace látek v průběhu gestace matek neovlivnily ani sledovanou délku gestace potkaních matek, ani počet narozených mlád'at.

#### 5.2.1.2. Vliv postnatální expozice stresu

V rámci hmotnostního přírůstku vyšel významný rozdíl u skupin postnatálně ovlivněných stresem [ $F_{(3,380)}=22,41$ ;  $p<0,001$ ]. Bonferonni *post-hoc* test ukázal, že skupina mlád'at vystavená mateřské separaci (S) měla největší hmotnostní přírůstek, významný oproti všem ostatním skupinám, tj. N ( $p<0,05$ ), SW ( $p<0,001$ ) a W ( $p<0,01$ ). Také hmotnostní přírůstek skupiny W byl dostatečný na to, aby ukázal signifikantní rozdíl oproti skupině SW ( $p<0,001$ ) s nejnižší nabytou hmotností (Obr.14.).

#### 5.2.1.3. Vliv pohlaví

Statistická analýza také neodhalila žádný významný rozdíl v počtu narozených samic a samců ve vrhu, zastoupení obou pohlaví ve vrhu bylo tedy podobné.



**Obr.14. Porodní hmotnost (A) a hmotnostní přírůstek (B) mlád'at za období laktace.** Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM. C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatální nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její kontrolou (C). ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi skupinami propojenými čarou.

## 5.2.2. Baterie testů hodnotící senzomotorický vývoj mlád'at

### 5.2.2.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu

Statistická analýza odhalila rozdíly v parametru Vzpřimovací reflex na podložce v PD 1 [ $F_{(2,425)}=24,10$ ;  $p < 0,001$ ] a v PD 2 [ $F_{(2,425)}=10,47$ ;  $p < 0,001$ ]. V PD1, mlád'ata vystavená MA *in utero* byla výrazně pomalejší ve vzpřimovacím reflexu než prenatální kontrola C ( $p < 0,05$  ve skupinách N, S, SW a  $p < 0,01$  ve skupině SW). Významný rozdíl byl také patrný u prenatálně ovlivněných skupin SA oproti kontrolám C ( $p < 0,05$  ve skupině W a  $p < 0,01$  ve skupině S) (Obr.15.A). V PD 2 přetrvával rozdíl mezi prenatální skupinou MA a kontrolami C ve skupině SW ( $p < 0,01$ ) a N ( $p < 0,05$ ). Ve skupině N byl také patrný rozdíl mezi prenatální skupinou MA a SA ( $p < 0,05$ ) (Obr.15.B). Všechna zvířata bez rozdílu se dále s opakovanými pokusy zlepšovala a zkracovala dobu latence pro vzpřimovací reflex. Také v parametru Negativní geotaxe [ $F_{(2,356)}=8,41$ ;  $p < 0,001$ ] v PD 9 byl naměřen rozdíl mezi prenatálními skupinami. Skupina samic s prenatálním MA byla pomalejší ve splnění tohoto úkonu oproti samicím ze skupiny s prenatálním SA ( $p < 0,001$ ) nebo kontrol C ( $p < 0,05$ ) (Obr.15.C). Mlád'ata vystavená MA ( $p < 0,05$ ) a SA ( $p < 0,01$ ) *in utero* vydržela také kratší



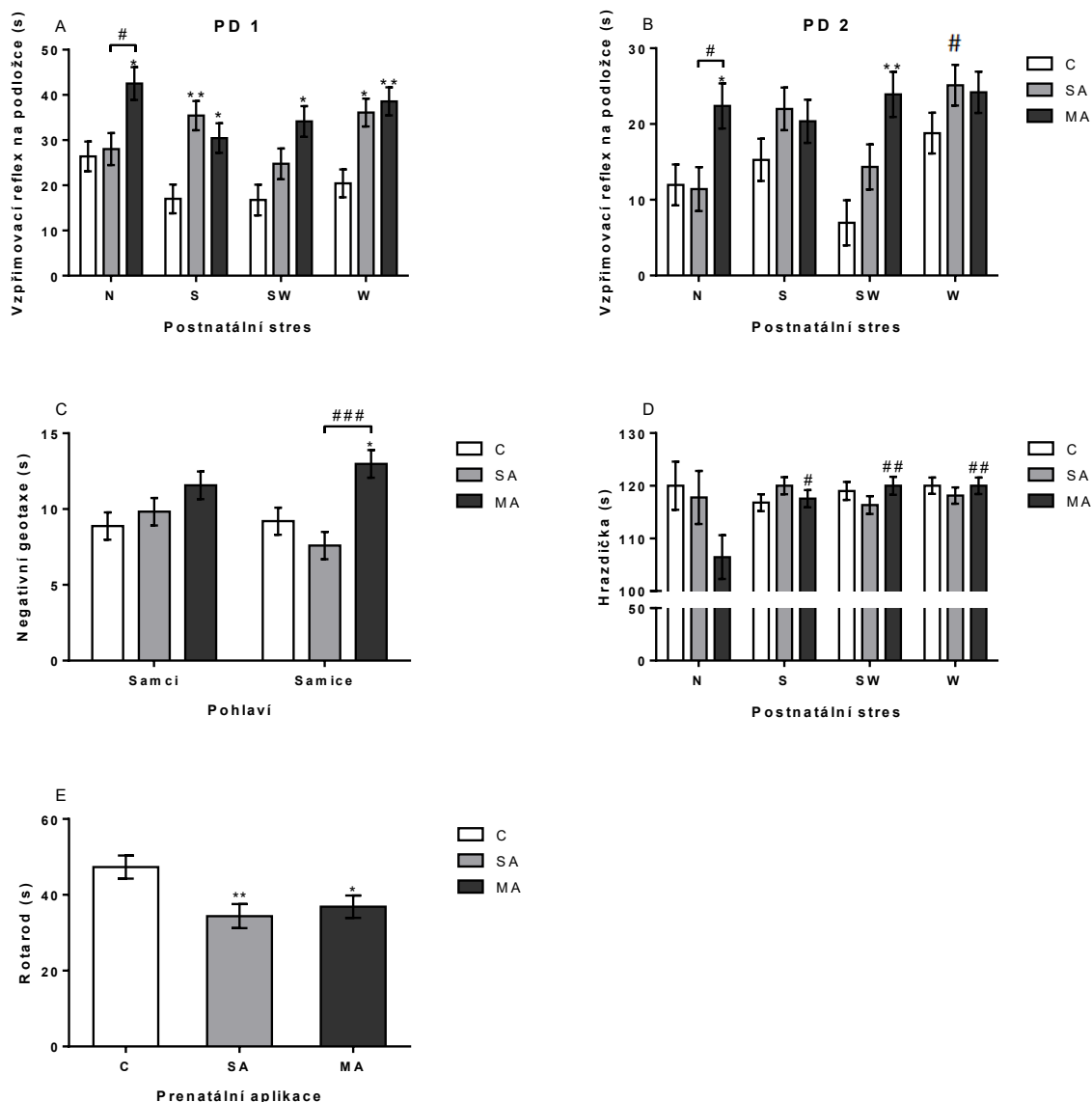
dobu na Rotarodu [ $F_{(2,401)}=5,08$ ;  $p<0,01$ ] v PD 23 v porovnání s kontrolami C, a to bez ohledu na postnatální expozici či pohlaví (Obr.15.E). Všechna zvířata bez rozdílu se dále s opakovanými pokusy zlepšovala. Analýza dat parametrů Vzpřimovací reflex ve vzduchu v PD 17 a Hrazdička neodhalila žádné významné rozdíly mezi sledovanými skupinami mláďat.

### **5.2.2.2. Vliv postnatální expozice stresu**

Analýza dat ukázala signifikantní rozdíly mezi postnatálně ovlivněnými zvířaty pouze v testu Hrazdička [ $F_{(6,394)}=3,74$ ;  $p<0,01$ ], který se konal v PD 23. U nestresovaných mláďat ze skupiny N byl v prvním pokusu tohoto testu naměřen rozdíl oproti ostatním postnatálně ovlivněným skupinám S, SW a W. Konkrétně to byla nestresovaná (N) skupina prenatalně ovlivněných MA mláďat, která vydržela kratší dobu na hrazdičce než prenatalně ovlivněné skupiny MA v kombinaci s postnatálním stresem S ( $p<0,05$ ), SW ( $p<0,01$ ) a W ( $p<0,01$ ) (Obr.15.D). U vzpřimovacího reflexu na podložce v PD 2 [ $F_{(2,425)}=10,47$ ;  $p<0,001$ ] byl významný rozdíl u skupiny ovlivněné prenatalně SA a postnatálně fyzikálním stresem W ve srovnání s postnatální skupinou N ( $p<0,05$ ) a SW ( $p<0,05$ ) (Obr.15.B).

### **5.2.2.3. Vliv pohlaví**

Statistická analýza ve sledovaných parametrech neodhalila významné rozdíly mezi samci a samicemi.



**Obr.15. Baterie testů hodnotící sensorimotorický vývoj mláďat.** A) Vzpřimovací reflex na podložce PD 1, B) Vzpřimovací reflex na podložce PD2, C) Negativní geotaxe, D) Hrazdička, E) Rotarod. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatální nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její prenatální kontrolou (C). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi skupinami označenými čarou, v případě testu Hrazdička je to významný rozdíl mezi skupinami MA a jejich postnatální kontrolou (N).

### 5.3. Sociální hra

#### 5.3.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu

Statistická analýza neodhalila významné rozdíly související s prenatální expozicí MA či aplikací SA jako prenatálního stresu.

#### 5.3.2. Vliv postnatální expozice stresu

Podobně jako u prenatální expozice, ani postnatální vystavení stresu nevyvolalo významný rozdíl mezi sledovanými skupinami.

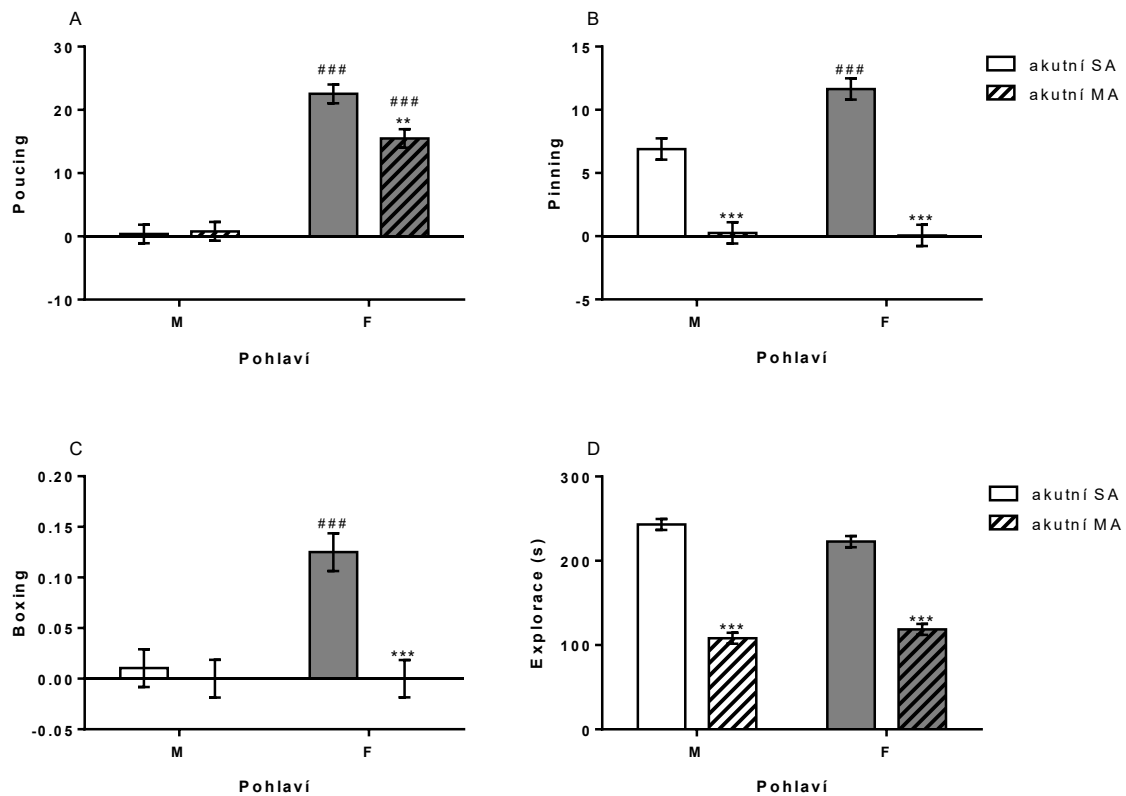
#### 5.3.3. Vliv akutní aplikace MA

Statistická analýza ukázala signifikantní rozdíly mezi akutní aplikací drogy a fyziologického roztoku u všech sledovaných parametrů. Konkrétněji, v parametru „pouncing“ [ $F_{(1,381)}=5,07$ ;  $p<0,05$ ] vyvolala akutní aplikace MA snížení výskytu ( $p<0,01$ ) daného chování (tj. útok z vrchu na zátylek druhého zvířete) u samic v porovnání s kontrolami s akutní SA aplikací (Obr.16.A). Při pokračování sociální hry a prokazování dominance zvířat může nastat situace, kdy jedno zvíře leží na zádech a druhé stojí nad ním. Akutní droga snížila toto chování, tj. „pinning“ [ $F_{(1,381)}=117,1$ ;  $p<0,001$ ], téměř k nule ( $p<0,001$ ) bez ohledu na jiné faktory (Obr.16.B). V parametru „boxing“ [ $F_{(1, 381)}=13,36$ ;  $p<0,001$ ] snížila akutně podaná droga výskyt daného chování u samic laboratorního potkana na nulu ( $p<0,001$ ) (Obr.16.C). Jednorázově podaný MA před testem také utlumil exploraci druhého zvířete [ $F_{(1,381)}=337,1$ ;  $p<0,001$ ] ( $p<0,001$ ) v porovnání s kontrolami a bez ohledu na jiné faktory (Obr.16.D).

#### 5.3.4. Vliv pohlaví

Dle statistické analýzy dat byl vliv pohlaví významný ve všech parametrech testu Sociální hra. Samice byly oproti samcům aktivnější v parametru „pouncing“ [ $F_{(1,381)}=156,0$ ;  $p<0,001$ ], a to jak ve skupině s akutní aplikací SA ( $p<0,001$ ), tak ve skupině s akutní aplikací MA ( $p<0,001$ ) (Obr.16.A). Stejně tak i v parametru „pinning“ [ $F_{(1,381)}=7,31$ ;  $p<0,01$ ] ve skupině s akutní aplikací SA ( $p<0,001$ ) se samice chovali aktivněji než samci (Obr.16.B). V parametru „boxing“ [ $F_{(1,381)}=9,57$ ;  $p<0,01$ ] to bylo u skupiny s akutní aplikací SA obdobně

( $p < 0,001$ ) (Obr.16.C). Analýza jiného sledovaného chování související se sociální interakcí, tedy explorací druhého zvířete, neukázala významné rozdíly mezi pohlavím (Obr.16.D).



**Obr.16. Sociální hra.** A) „Pouncing“, B) „Pinning“, C) „Boxing“, D) Explorace. Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM. M – samci, F – samice. Akutní SA – jednorázové podání fyziologického roztoku 45 min před testem. Akutní MA – jednorázové podání metamfetaminu 45 min před testem. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi skupinou s akutním MA a její kontrolou (akutní SA). ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi skupinami v rámci pohlaví.

## 5.4. Stanovení hladiny oxytocinu

### 5.4.1. Vliv prenatalní expozice MA/stresu

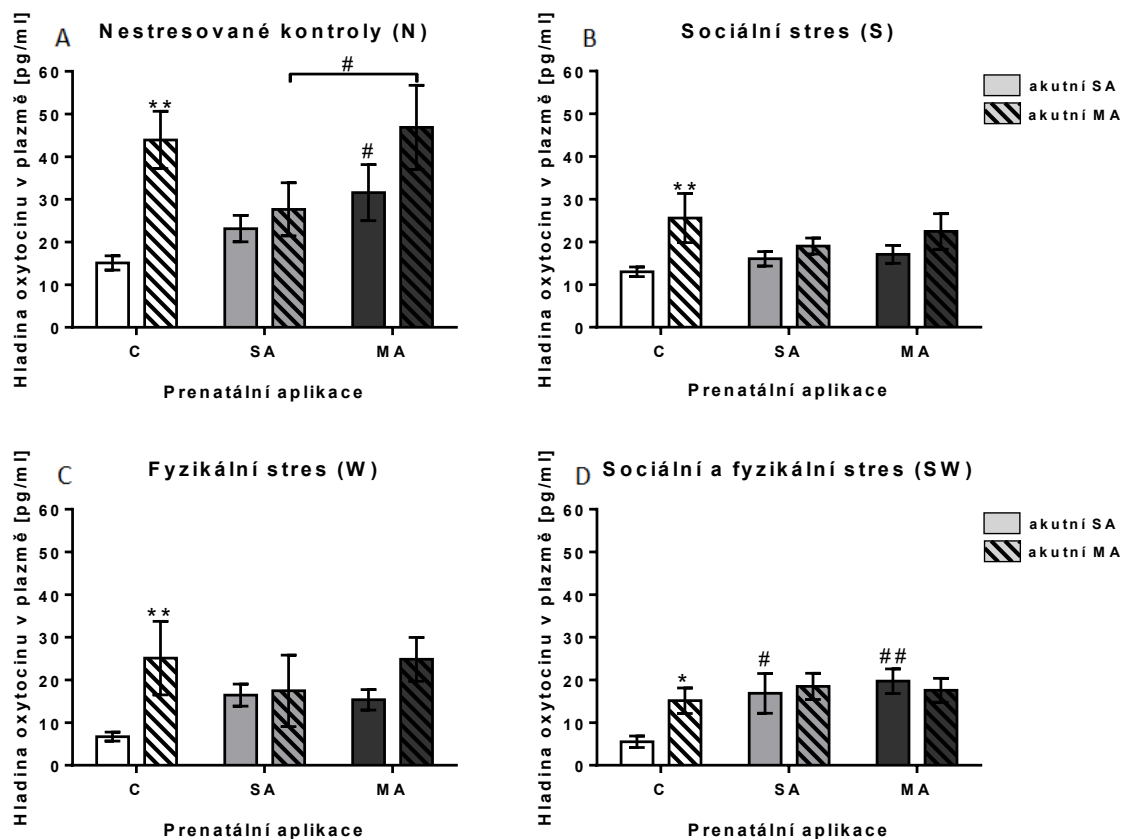
Statistická analýza ukázala významné zvýšení hladiny oxytocinu u skupin prenatalně vystavených MA ve srovnání s intaktní kontrolou C v rámci akutní SA aplikace. Ve skupině postnatálně nestresovaných kontrol N [ $F_{(2,65)}=1,97$ ;  $p<0,05$ ] byl daný rozdíl ( $p<0,05$ ). V rámci postnatálních kontrol N s akutní MA aplikací byla odpověď oxytocinu zvýšena ( $p<0,05$ ) také u skupiny samic prenatalně exponovaných MA v porovnání s prenatalně ovlivněnými SA samicemi (Obr.17.A). Ve skupině SW, u prenatalních SA samic [ $F_{(2,60)}=1,73$ ;  $p<0,05$ ] po akutní SA aplikaci byla naměřena významně vyšší hladina oxytocinu ( $p<0,05$ ) v porovnání s prenatalní kontrolou C. Podobný efekt ( $p<0,01$ ) ve skupině SW jsme pozorovali i u prenatalně ovlivněných MA zvířat (Obr.17.D).

### 5.4.2. Vliv postnatální expozice stresu

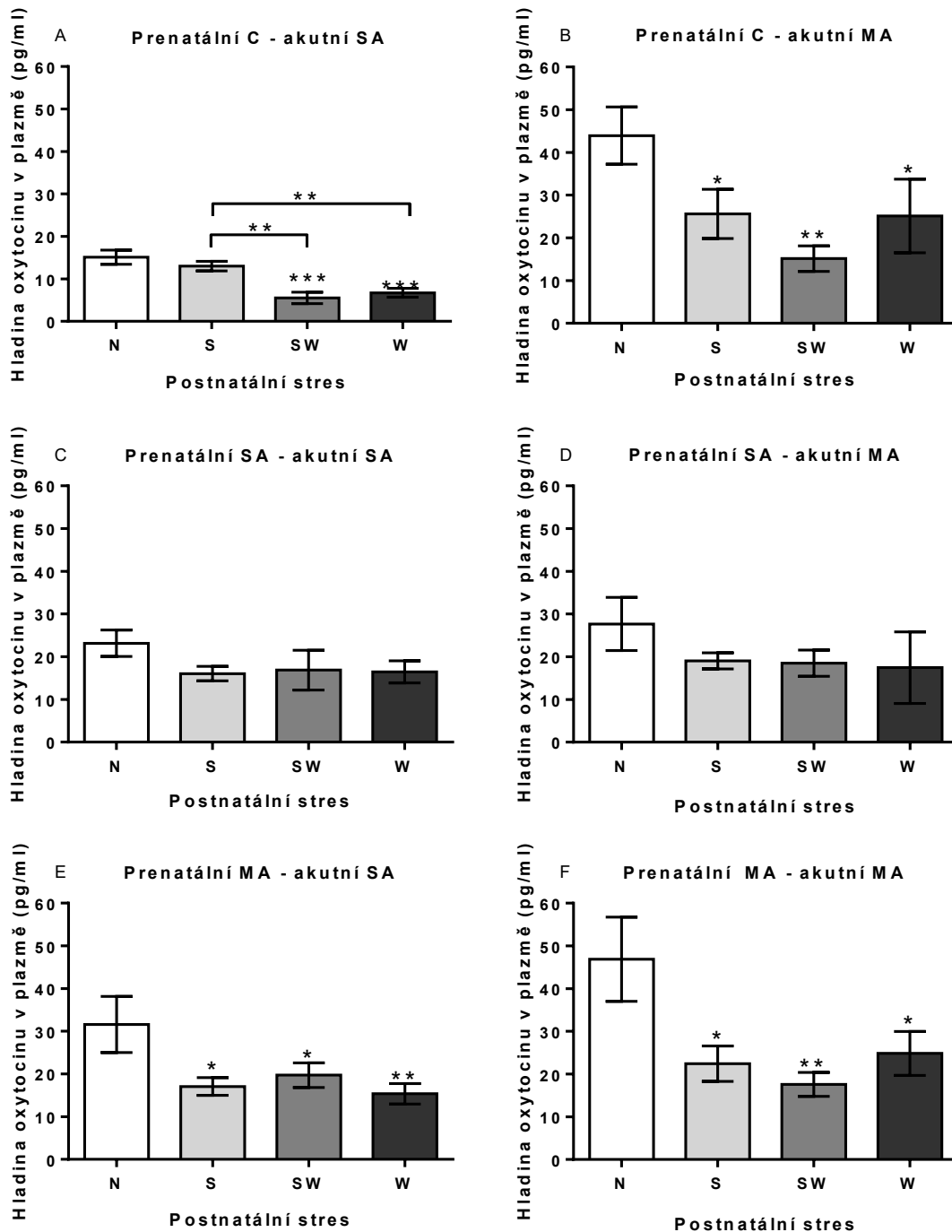
Vliv postnatální expozice stresu se prokázal u skupin s prenatalním aplikací MA a C v kombinaci s akutní aplikací MA i SA. Konkrétněji, postnatální stres typu W ( $p<0,001$ ) a SW ( $p<0,001$ ) významně snížil hladinu oxytocinu u skupiny prenatalních kontrol C s akutní aplikací SA oproti nestresovaným kontrolám N (Obr.18.A). Tento efekt byl také pozorován vůči skupině ovlivněné mateřskou separací S ( $p<0,01$ ), kde se hladina oxytocinu nelišila od hladiny u nestresovaných kontrol N. Významně snížená hladina oxytocinu byla naměřena také u všech postnatálně stresovaných skupin, tj. S ( $p<0,05$ ), W ( $p<0,05$ ) a SW ( $p<0,01$ ), ve skupině prenatalních kontrol (C) po akutní aplikaci MA (Obr.18.B). Podobně také u skupin prenatalně vystavených MA byla hladina oxytocinu snížena u všech postnatálně stresovaných skupin. Po akutní aplikaci SA byl rozdíl mezi skupinou N a postnatálními skupinami následující: S ( $p<0,05$ ), SW ( $p<0,05$ ) a W ( $p<0,01$ ) (Obr.18.E). Po akutní aplikaci MA to bylo: S ( $p<0,05$ ), SW ( $p<0,01$ ) a W ( $p<0,05$ ) (Obr.18.F). U juvenilních samic prenatalně ovlivněných stresem (SA) se významné rozdíly mezi postnatálně ovlivněnými skupinami, bez ohledu na akutní aplikaci, neukázaly (Obr.18.C, D).

### 5.4.3. Vliv akutní aplikace MA

Akutní aplikace MA 1 h před odběrem signifikantně zvýšila hladinu plazmatického oxytocinu pouze u prenatalní skupiny C. Tento efekt byl pozorován různou měrou u všech postnatálně ovlivněných skupin ve srovnání s akutní SA kontrolou. U skupiny N [ $F_{(2,65)}=1,97$ ;  $p<0,05$ ] to bylo s rozdílem ( $p<0,01$ ), u skupiny S [ $F_{(2,62)}=1,39$ ;  $p<0,05$ ] s rozdílem ( $p<0,01$ ), u skupiny W [ $F_{(2,63)}=5,83$ ;  $p<0,05$ ] s rozdílem ( $p<0,01$ ) a u skupiny SW [ $F_{(2,60)}=1,73$ ;  $p<0,05$ ] to bylo s rozdílem ( $p<0,05$ ) (Obr.17.).



**Obr.17. Vliv prenatalní expozice MA/stresu a akutní aplikace MA na hladinu plazmatického oxytocinu.** A) nestresované kontroly N, B) skupina se sociálním stresem S, C) skupina s fyzikálním stresem W, D) kombinace stresorů SW. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. C – prenatalní kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatální nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA – jednorázové podání fyziologického roztoku. Akutní MA – jednorázové podání metamfetaminu. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její kontrolou (akutní SA). #  $p<0,05$ , ##  $p<0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její prenatalní kontrolou (C).



**Obr.18. Vliv postnatálního stresu na hladinu plazmatického oxytocinu.** A) prenatální kontroly C po akutní aplikaci SA, B) prenatální kontroly C po akutní aplikaci MA, C) prenatálně ovlivněná skupina SA po akutní aplikaci SA, D) prenatálně ovlivněná skupina SA po akutní aplikaci MA, E) prenatálně ovlivněná skupina MA po akutní aplikaci SA, F) prenatálně ovlivněná skupina MA po akutní aplikaci MA. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatální nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené

vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA – jednorázové podání fyziologického roztoku 45 min před testem. Akutní MA – jednorázové podání metamfetaminu 45 min před testem. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její kontrolou (N) či mezi skupinami propojenými čarou.

## 5.5. Otevřená aréna

### 5.5.1. Vliv prenatalní expozice MA/stresu

Statistická analýza ukázala, že prenatalní expozice drogy či stresu nemá vliv na úzkostné chování hodnocené v testu OF. Statistická analýza ukázala pouze významnou interakci mezi prenatalní a postnatalní expozicí [ $F_{(6,188)}=2,78$ ;  $p < 0,05$ ] u parametru čichání. U prenatalně ovlivněných zvířat MA byl naměřen delší celkový čas strávený očicháváním arény ( $p < 0,01$ ) v porovnání s prenatalní kontrolou C. Tento efekt byl naměřen pouze v rámci postnatalně nestresované skupiny N (Obr.20.B). U postnatalně stresovaných skupin nebyl tento efekt patrný.

### 5.5.2. Vliv postnatalní expozice stresu

Časně postnatalní stres ovlivnil většinu sledovaných parametrů. V parametru „čas strávený v centrálním kruhu“ zvýšil postnatalní stres [ $F_{(3,192)}=57,23$ ;  $p < 0,001$ ] dobu strávenou uprostřed otevřené arény v porovnání s nestresovanou kontrolou N (a akutní SA v dospělosti). Co se týče různých typů časně postnatalního stresoru, pak největší rozdíl byl naměřen u skupiny S ovlivněné mateřskou separací ( $p < 0,001$ ), dále u SW ( $p < 0,05$ ) a W ( $p < 0,05$ ) (Obr.19.A). Významné rozdíly se projevily také v interakci postnatalního stresu s akutní drogou. Postnatalně stresované skupiny ovlivněné akutně podaným MA významně prodloužily své působení v centrálním kruhu [ $F_{(3,192)}=57,23$ ;  $p < 0,001$ ] oproti nestresované kontrole N s akutně podaným MA, tedy S ( $p < 0,001$ ), SW ( $p < 0,01$ ) a W ( $p < 0,01$ ) (Obr.19.A). Na druhou stranu, u všech zvířat ovlivněných časně postnatalním stresem (bez ohledu na typ stresoru) se v porovnání s N skupinou snížila doba strávená v rozích arény [ $F_{(3,192)}=39,55$ ;  $p < 0,001$ ], tj. S ( $p < 0,001$ ), SW ( $p < 0,001$ ) a W ( $p < 0,001$ ) (Obr.19.B).

Postnatalní stress [ $F_{(3,192)}=13,39$ ;  $p < 0,001$ ] zároveň významně zkrátil dobu immobility, a to bez ohledu na typ stresoru, tj. S ( $p < 0,001$ ), SW ( $p < 0,001$ ) a W ( $p < 0,001$ ) v porovnání s N kontrolou (Obr.19.C). Vliv mateřské separace byl patrný také v péči o sebe sama



$[F_{(3,192)}=4,59; p<0,05]$ , kdy jediná skupina S ( $p<0,05$ ) zvýšila tuto činnost v porovnání s N skupinou (Obr.19.D). U parametru lokomoce  $[F_{(3,192)}=39,15; p<0,001]$  pak postnatální stres významně snížil vliv akutního MA u všech postnatálně ovlivněných skupin, tj. S ( $p<0,001$ ), SW ( $p<0,001$ ) a W ( $p<0,001$ ) v porovnání s N kontrolou (Obr.19.E).

Postnatální stres  $[F_{(3,192)}=42,25; p<0,001]$  významně zvýšil čas strávený očicháváním u všech postnatálně ovlivněných skupin ( $p<0,001$ ) v porovnání s nestresovanými kontrolami (Obr.20.B).

### 5.5.3. Vliv akutní aplikace MA

Stejně jako časně postnatální stres, i akutní MA, který byl podaný 45 min před testem, ovlivnil většinu sledovaných parametrů. Konkrétněji, akutní podání MA  $[F_{(1,192)}=50,91; p<0,001]$  prodloužilo dobu strávenou v centrálním kruhu u sledovaných skupin v porovnání s SA kontrolami, N ( $p<0,05$ ) a SW ( $p<0,05$ ), a W ( $p<0,01$ ). U postnatální skupiny S ale nebyl nalezen žádný významný rozdíl v tomto parametru (Obr.19.A). U dalšího parametru, tj. “čas strávený v rozích arény”, snížila akutní aplikace MA  $[F_{(1,192)}=232,70; p<0,001]$  čas strávený v rozích arény s ohledem na typ postnatálního ovlivnění, N ( $p<0,001$ ), SW ( $p<0,001$ ) a W ( $p<0,001$ ). U postnatální skupiny S opět nebyl nalezen žádný významný rozdíl (Obr.19.B).

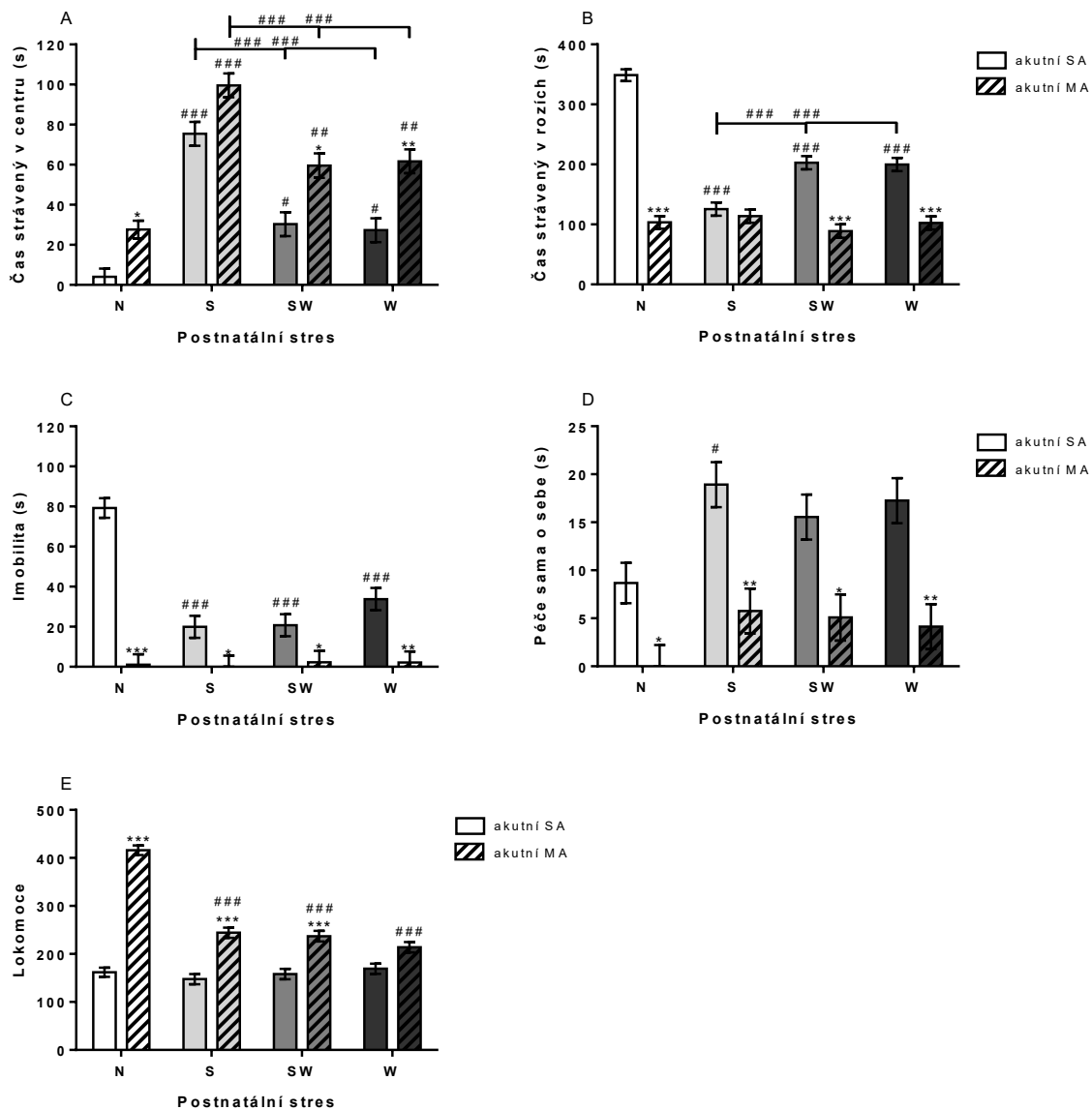
Akutně podaný MA v dospělosti dále výrazně snížil čas strávený v nehybné pozici (imobilitě)  $[F_{(1,192)}=93,54; p<0,001]$ , a to u všech sledovaných skupin, tj. N ( $p<0,001$ ), S ( $p<0,05$ ), SW ( $p<0,05$ ) a W ( $p<0,01$ ) (Obr.19.C). Na druhou stranu péče sama o sebe byla po podání jednorázového MA také snížena  $[F_{(1,192)}=48,41; p<0,001]$  s ohledem na dané skupiny, tj. N ( $p<0,05$ ) a SW ( $p<0,05$ ), S ( $p<0,01$ ) a W ( $p<0,01$ ) (Obr.19.D). Vše v porovnání s kontrolami, kterým byl aplikován jednorázový (akutní) SA 45 min před testem.

Významné rozdíly pro skupiny ovlivněné jednorázově podaným MA v dospělosti byly naměřeny také v parametru lokomoce  $[F_{(1,192)}=255; p<0,001]$ . Potkani v postnatálních skupinách s akutní drogou, tj. N ( $p<0,001$ ), S ( $p<0,001$ ) a SW ( $p<0,001$ ), přešli více čar než zvířata ve skupinách s akutním SA (Obr.19.E).

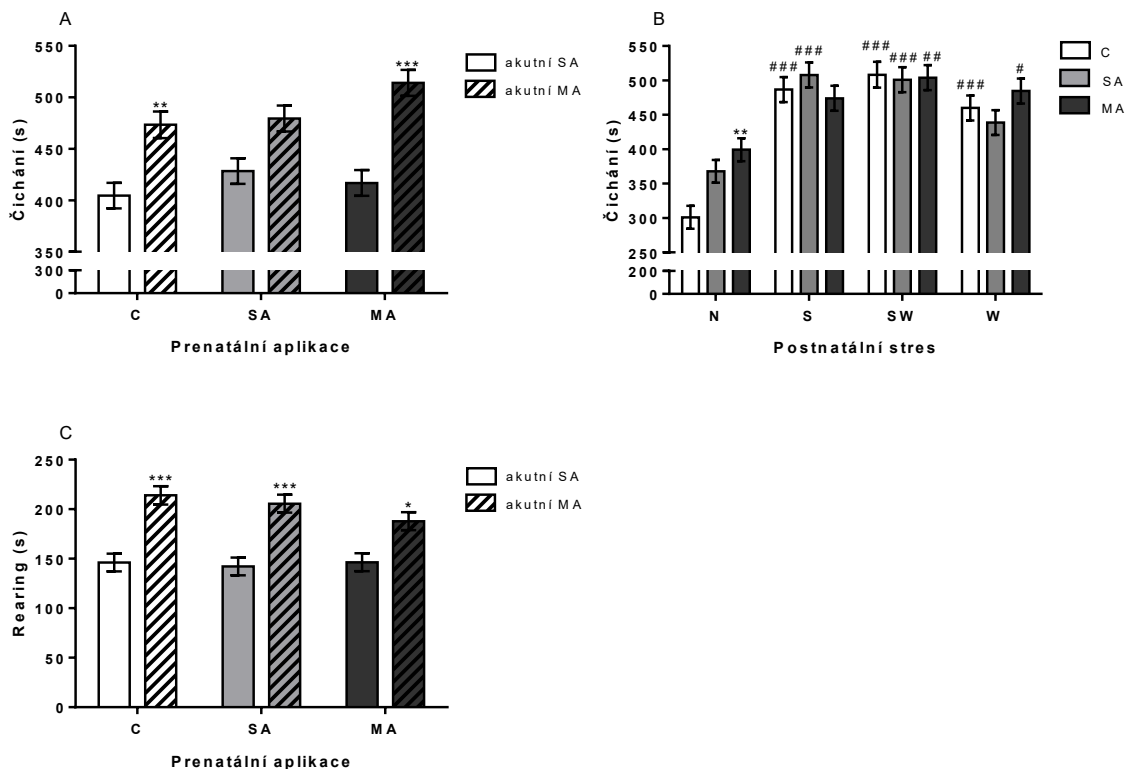
Akutně podaný MA v dospělosti zvýšil čas strávený očicháváním  $[F_{(1,194)}=49,40; p<0,001]$  u prenatalních kontrol ( $p<0,01$ ) a skupiny s prenatalním MA ( $p<0,001$ ) v porovnání s jejich kontrolami. Zároveň akutní MA zvýšil celkový čas čichání  $[F_{(1,192)}=49,41; p<0,001]$  i u postnatálně ovlivněných skupin, tj. S ( $p<0,001$ ) a W ( $p<0,001$ ) (Obr.20.A). U nestresované

skupiny N a u skupiny s oběma typy stresoru SW nebyl zjištěn žádný významný rozdíl mezi skupinami s různou akutní aplikací.

Vliv akutního MA se projevil také v parametru „rearing“, tedy stání na zadních dvou končetinách [ $F_{(1,194)}=60,44$ ;  $p<0,001$ ], kde oproti kontrolám s akutním SA všechny prenatalní skupiny zvýšily tuto aktivitu následovně, tj. C ( $p<0,001$ ), SA ( $p<0,001$ ) a MA ( $p<0,05$ ). Tento efekt se projevil pouze v rámci postnatálně nestresovaných zvířat N (Obr.20.C).



**Obr.19.** Vliv postnatálního stresu a akutní aplikace MA v dospělosti na úzkostné chování laboratorního potkana v OF. A) čas strávený v centru kruhu, B) čas strávený v rozích arény, C) imobilita – čas strávený v imobilitě, D) čas strávený péčí sama o sebe a E) lokomoce. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. N – nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA – jednorázové podání fyziologického roztoku 45 min před testem. Akutní MA – jednorázové podání metamfetaminu 45 min před testem. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její kontrolou (akutní SA). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou (N).



**Obr.20. Vliv prenatalní expozice/postnatálního stresu a akutní aplikace MA na čichání a „rearing“ v OF.** A) čichání (Postnatální expozice x Akutní aplikace), B) čichání (Postnatální expozice x Prenatální expozice) a C) „rearing“. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. C – prenatalní kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatální nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA – jednorázové podání fyziologického roztoku 45 min před testem. Akutní MA – jednorázové podání metamfetaminu 45 min před testem. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její kontrolou (akutní SA u grafu A a C, prenatalní kontrola u grafu B). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou N.

## 5.6. Vyvýšené křížové bludiště

### 5.6.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu

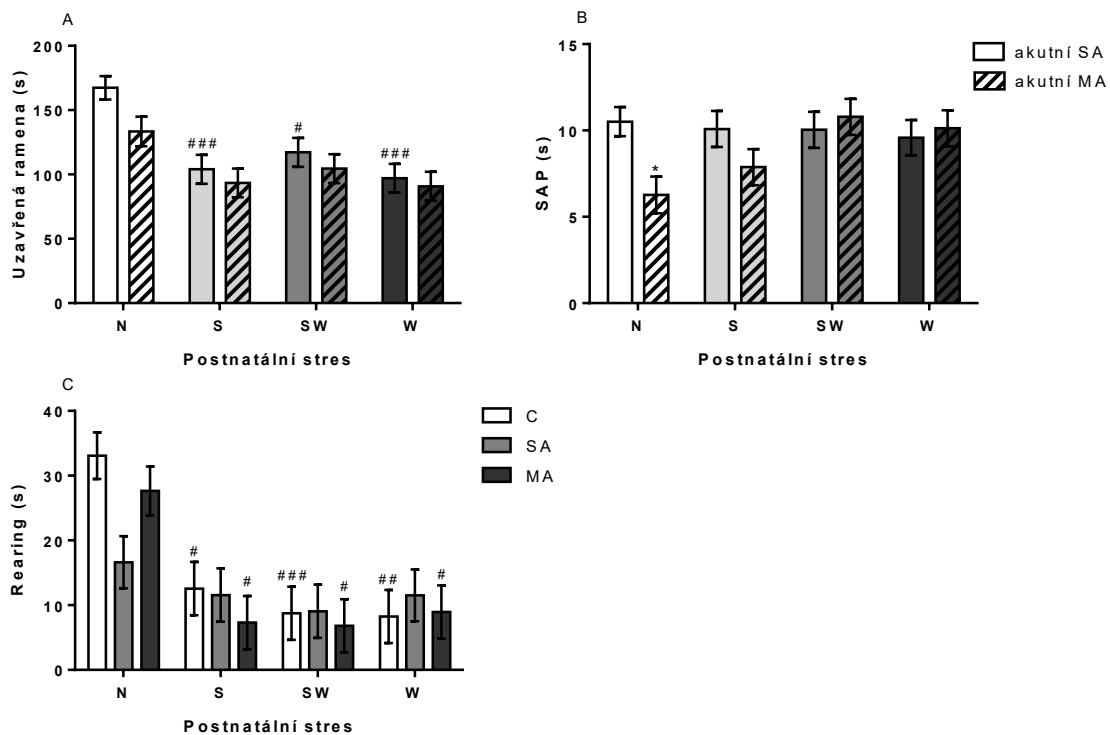
Statistická analýza neodhalila významný rozdíl mezi skupinami s odlišnou prenatální expozicí (MA, SA, C).

### 5.6.2. Vliv postnatální expozice stresu

Postnatální stres [ $F_{(3,197)}=10,81$ ;  $p<0,001$ ] významně zkrátil čas strávený v uzavřených ramenech. Ve srovnání s nestresovanou kontrolou N to ukázal Bonferonni *post-hoc* test, konkrétně u skupiny S to bylo ( $p<0,001$ ), u SW ( $p<0,05$ ) a u W ( $p<0,001$ ) (Obr.21.A). Analýza dat naměřených v otevřených ramenech neukázala žádné významné rozdíly. Postnatální stres také signifikantně snížil čas strávený na zadních končetinách („rearing“) [ $F_{(3,198)}=12,10$ ;  $p<0,001$ ], a to jak u skupin s akutním podáním SA, tj. S ( $p<0,05$ ) a SW ( $p<0,05$ ), tak u skupin s akutním podáním MA, tj. S ( $p<0,05$ ), SW ( $p<0,01$ ) a W ( $p<0,01$ ) v porovnání vůči nestresovaným kontrolám N. Postnatální stres [ $F_{(3,194)}=12,46$ ;  $p<0,001$ ] také snížil tento parametr u prenatálně ovlivněných skupin odlišně. Změna nastala pouze u skupin prenatálních kontrol C a skupin prenatálně vystavených MA a to v daném pořadí: u S skupiny (obojí  $p<0,05$ ), u SW skupiny ( $p<0,001$  a  $p<0,05$ ) a u W skupiny ( $p<0,01$  a  $p<0,05$ ) (Obr.21.C). Zajímavé tedy je, že u skupin prenatálně vystavených stresu (SA) nebyl efekt postnatálního stresu pozorován.

### 5.6.3. Vliv akutní aplikace MA

Významná interakce se objevila mezi akutní aplikací drogy a postnatální expozicí stresu [ $F_{(3,198)}=2,73$ ;  $p<0,05$ ] v hodnoceném parametru SAP. Jednorázově podaný MA před testem snížil frekvenci SAP pouze v rámci skupiny nestresovaných kontrol N ( $p<0,05$ ) (oproti kontrolám s akutním SA). U skupin ovlivněných časně postnatálním stresem tento efekt nebyl pozorován (Obr.21.B). Postnatální stres tedy utlumil efekt akutní drogy v tomto parametru. U jiných parametrů statistická analýza neobjevila významné rozdíly.



**Obr.21. Vliv postnatálního stresu a akutní aplikace MA na sledované parametry v EPM.**

A) čas strávený v uzavřeném rameni, B) čas strávený v pozici SAP a C) „rearing“ (Postnatální expozice x Prenatální expozice). Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatální nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA – jednorázové podání fyziologického roztoku 45 min před testem. Akutní MA – jednorázové podání metamfetaminu 45 min před testem. \*  $p < 0,05$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její kontrolou (akutní SA). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou (N).

## 5.7. Morrisovo vodní bludiště

### 5.7.1. Učení

#### 5.7.1.1. Vliv prenatalní expozice MA/stresu

Hlavní efekt byl pozorován v parametru rychlosti plavání [ $F_{(2,189)}=4,12$ ;  $p<0,05$ ], kdy prenatalně ovlivněná skupina potkanů plavala významně pomaleji ( $p<0,05$ ) než jejich prenatalní kontroly (C) (Obr.23.A). Při rozložení na podskupiny se významný rozdíl již neukázal. Významný rozdíl se neukázal ani v ostatních sledovaných parametrech, tj. chyba v hledání, doba latence a celková uplavaná vzdálenost. Strategie plavání taktéž neukázala žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami s různým prenatalním ovlivněním.

#### 5.7.1.2. Vliv postnatální expozice stresu

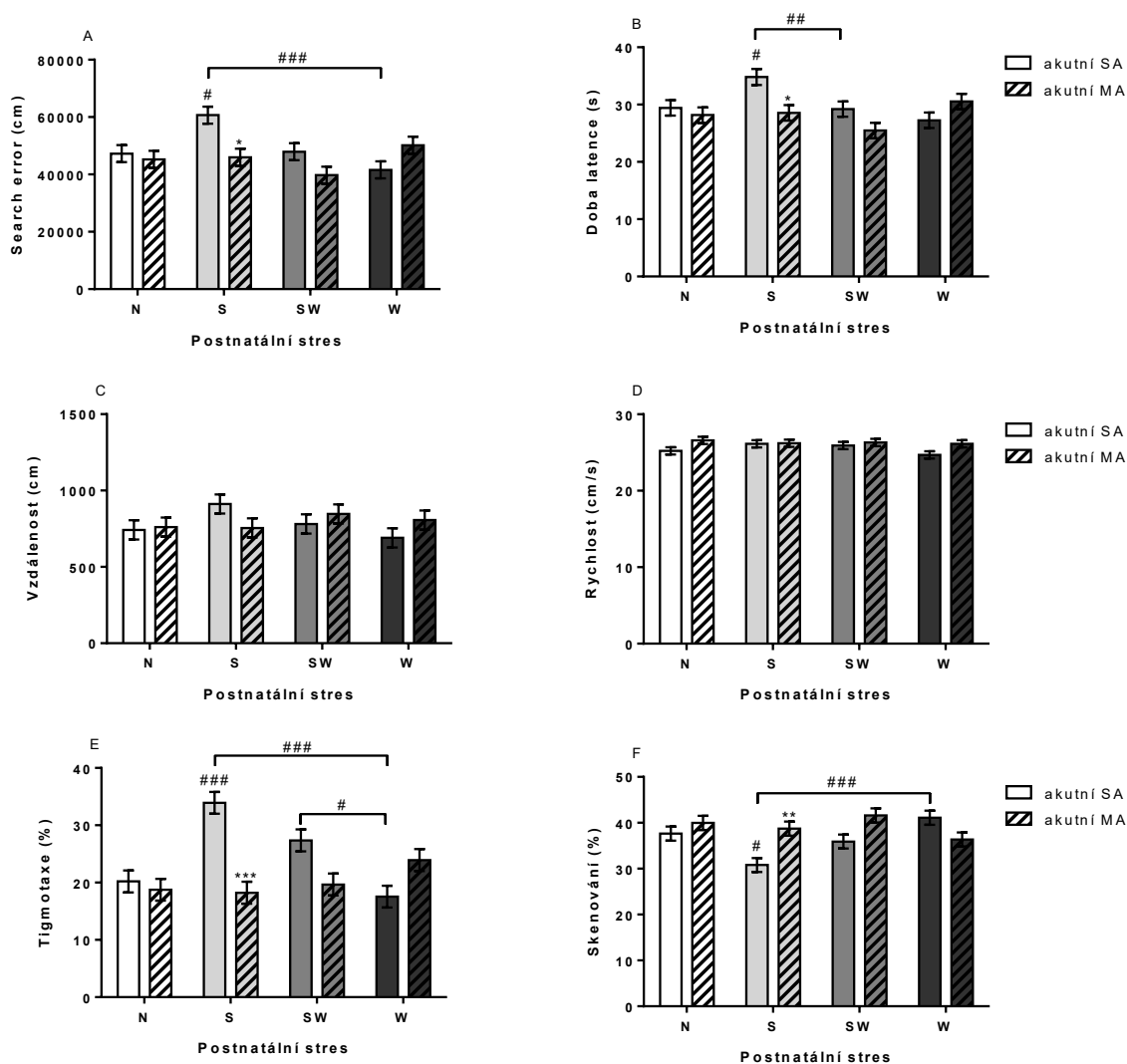
Statistická analýza odhalila významný rozdíl mezi postnatální skupinou ovlivněnou mateřskou separací (S) a nestresovanou kontrolou (N). Rozdíly byly patrné ve sledovaných parametrech chyba v hledání [ $F_{(3,182)}=3,89$ ;  $p < 0,01$ ] a doba latence [ $F_{(3,182)}=3,63$ ;  $p<0,01$ ] (Obr.22.A,B). Dospělí samci laboratorního potkana časně postnatálně ovlivnění mateřskou separací uplavalí daleko delší chybně uplavanou vzdálenost od ostrůvku ( $p<0,05$ ) s delší dobou nalezení ostrůvku ( $p<0,05$ ) ve srovnání s nestresovanou kontrolou. Postnatální stres mateřskou separací vykazoval tento efekt jako jediný ze sledovaných stresorů. Takto ovlivnění potkani (S) navíc plavali s daleko větší chybou v hledání ( $p<0,001$ ) i vůči potkanům postnatálně ovlivněných fyzikálním mateřským stresorem (W). Stejně tak oproti této skupině plavali daleko delší dobu ( $p<0,01$ ) než našli ostrůvek (Obr.22.A,B). Významně hůře si vedla skupina ovlivněná mateřskou separací (S) ve strategii plavání [ $F_{(3,184)}=4,76$ ;  $p<0,01$ ], kdy potkani hledali ostrůvek daleko častěji ( $p<0,001$ ) pomocí tigmataxe než nestresované kontroly (N) (Obr.22.E). Zároveň si v tomto parametru vedli daleko hůře ( $p<0,001$ ) než stresovaní jedinci ze skupin W. Potkani stresovaní kombinací obou mateřských stresorů SW vyhledávali ostrůvek tigmataxí daleko více ( $p<0,01$ ) než potkani ze skupiny W. Naproti tomu potkani ze skupiny S používali strategii skenování prostoru v blízkosti ostrůvku [ $F_{(3,184)}=3,42$ ;  $p<0,05$ ] významně méně ( $p<0,05$ ) než jejich nestresované kontroly (N) (Obr.22.F). Potkani ze skupiny W vyhledávali strategii skenování daleko více ( $p<0,001$ ) než zmiňovaná skupina potkanů ovlivněná mateřskou separací (S).

### 5.7.1.3. Vliv akutní aplikace MA

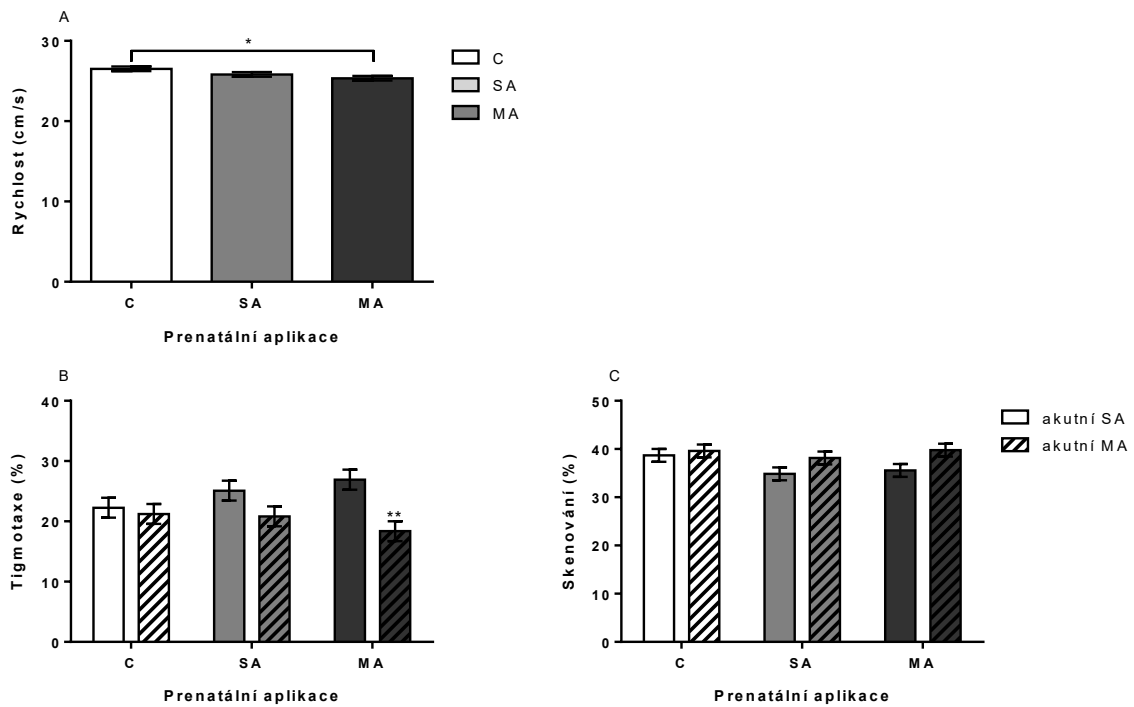
Co se týče vlivu drogy podávané v dospělosti v průběhu testování MWM, tj. každý den po plavání daného subjektu v dávce 1 mg/kg, statistická analýza odhalila významný rozdíl pouze ve skupině postnatálně ovlivněných mateřskou separací (S). Rozdíly byly patrné ve sledovaných parametrech chyba v hledání [ $F_{(1,184)}=3,76$ ;  $p<0,05$ ] a doba latence [ $F_{(1,182)}=4,34$ ;  $p<0,05$ ] (Obr.22.A,B). Samci laboratorního potkana z postnatální skupiny S s aplikací MA v dospělosti v průběhu testování plavali daleko nižší chybou v hledání ostrůvku ( $p<0,05$ ) s kratší dobou nalezení samotného ostrůvku ( $p<0,05$ ) ve srovnání s jejich kontrolou s aplikací SA v dospělosti. Postnatální stres mateřskou separací vykazoval tento efekt jako jediný ze sledovaných stresorů. Skupina s aplikací MA v dospělosti ovlivněná postnatálním stresem S také používala daleko méně ( $p<0,001$ ) tigmataxi [ $F_{(1,184)}=11,68$ ;  $p<0,001$ ] a daleko častěji ( $p<0,05$ ) strategii skenování [ $F_{(1,184)}=6,65$ ;  $p<0,01$ ] prostoru v blízkosti ostrůvku (Obr.22.E,F).

Významný rozdíl byl dále pozorován ve strategii plavání pomocí tigmataxe [ $F_{(1,186)}=11,68$ ;  $p<0,001$ ]. Prenatálně ovlivnění potkani po podání MA v průběhu testování v dospělosti (akutní MA) plavali pomocí tigmataxe méně ( $p<0,01$ ) nežli skupina prenatálně ovlivněných MA bez podávané drogy v dospělosti (akutní SA) (Obr.23.B). V opačné strategii plavání pomocí skenování prostoru s ostrůvkem [ $F_{(1,186)}=11,68$ ;  $p<0,001$ ] se však významný rozdíl v této skupině prenatální-MA/akutní-MA ( $p=0,405$ ) oproti své kontrole neukázal (Obr.23.C).





**Obr.22. Vliv postnatálního stresu a akutní aplikace MA na sledované parametry ve MWM v první fázi Učení.** A) vzdálenost od ostrůvku (chyba v hledání) (cm), B) doba latence (cm), C) (celková uplavaná) vzdálenost (cm), D) rychlost (cm/s), E) tigmotaxe (%) a F) skenování (%). Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. N – nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA –podání fyziologického roztoku každý den po plavání daného subjektu. Akutní MA –podání metamfetaminu každý den po plavání daného subjektu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou (šrafovaný sloupec) a její kontrolou (akutní SA, nešrafovaný sloupec). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou (N) či provázaným sloupcem (pouze mezi skupinami s akutní SA nebo jen mezi skupinami s akutní MA).



**Obr.23. Vliv prenatální aplikace MA/stresu a akutní aplikace MA na sledované parametry ve MWM v první fázi Učení.** A) rychlost (cm/s), B) tigmotaxe (%) a C) skenování (%). Výsledky jsou prezentovány jako průměr  $\pm$  SEM. C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. Akutní SA –podání fyziologického roztoku každý den po plavání daného subjektu. Akutní MA –podání metamfetaminu každý den po plavání daného subjektu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou (šrafovaný sloupec) a její kontrolou (akutní SA, nešrafovaný sloupec).

## 5.7.2. „Probe“ test

### 5.7.2.1. Vliv prenatalní expozice MA/stresu

Vliv prenatalní expozice SA/MA se ukázal ve sledovaném parametru celkově uplavené vzdálenosti [ $F_{(3,178)}=3,46$ ;  $p<0,05$ ] a rychlosti [ $F_{(3,178)}=3,17$ ;  $p<0,05$ ] bez vlivu akutní aplikace drogy v dospělosti (Obr.24.A,B). Potkani ovlivnění prenatalním MA ( $p<0,01$ ), stejně jako prenatalním SA ( $p<0,01$ ), uplavali kratší vzdálenost ve srovnání s prenatalní kontrolou C. Podobně obě tyto skupiny, tj. prenatalní MA ( $p<0,05$ ) a prenatalní SA ( $p<0,01$ ), plavaly pomalejší rychlostí ve srovnání s jejich kontrolou (C). Tento efekt byl však patrný pouze u postnatálně nestresovaných potkanů ze skupiny N. V ostatních postnatálně stresovaných skupinách podobný rozdíl mezi prenatalními skupinami nebyl pozorován.

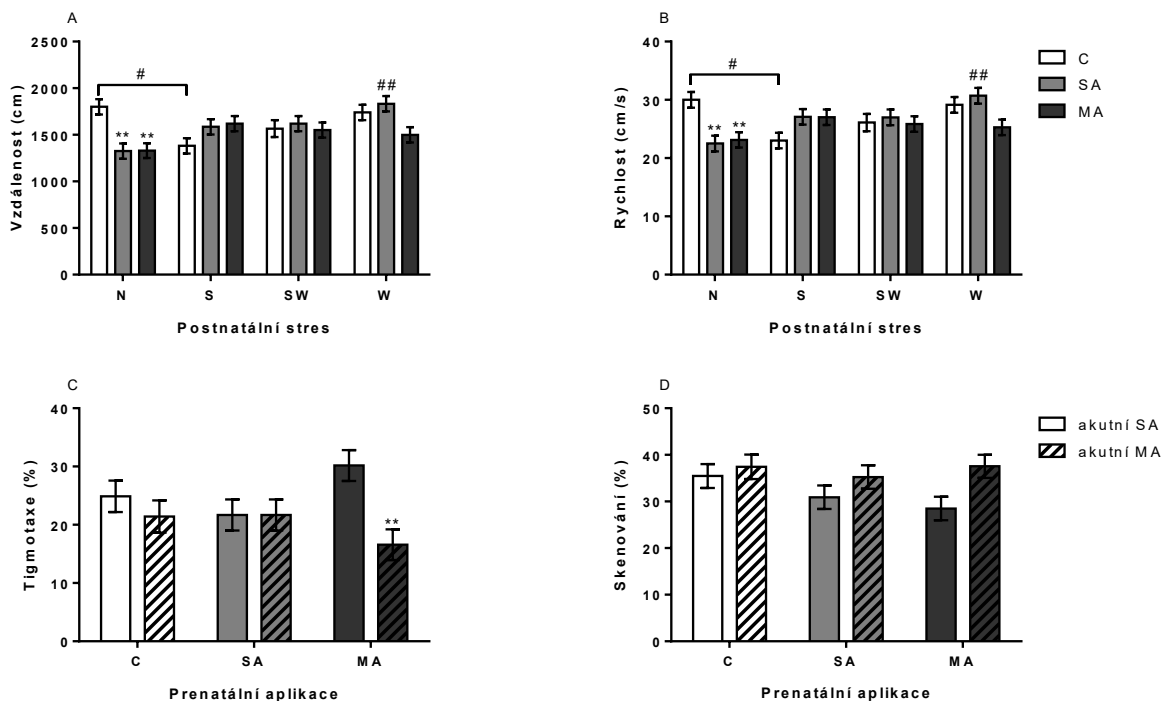
### 5.7.2.2. Vliv postnatální expozice stresu

Významný rozdíl mezi skupinami s různým postnatálním stresem byl pozorován v parametru vzdálenost [ $F_{(3,182)}=3,46$ ;  $p<0,05$ ], kde potkani ze skupiny W s akutní aplikací MA v dospělosti uplavali daleko delší trať ( $p<0,05$ ) ve srovnání s jejich nestresovanou kontrolou N (s akutním MA) (Obr.25.A). V tomto parametru celkově uplavené dráhy (vzdálenost) [ $F_{(3,178)}=3,46$ ;  $p<0,05$ ] se ve skupině W dále ukázal významný rozdíl ve skupině prenatalně ovlivněné stresem (SA), která uplavala daleko delší vzdálenost ( $p<0,01$ ) ve srovnání se svojí nestresovanou kontrolou N (prenatální SA) (Obr.24.A). V parametru rychlosti [ $F_{(3,178)}=3,17$ ;  $p<0,05$ ] plavání se ukázalo, že daná skupina prenatalní SA/postnatální W plavala výrazně rychleji ( $p<0,01$ ) než jejich nestresované kontroly prenatalní SA/postnatální N (Obr.25.B).

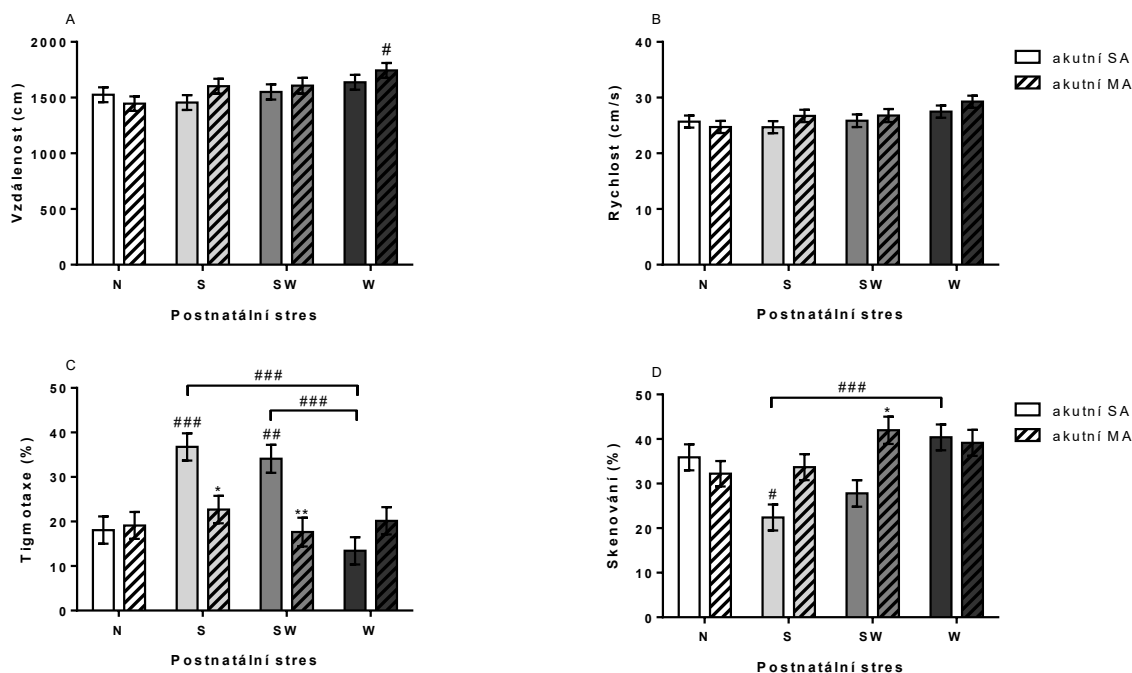
V rámci strategie plavání byl postnatální vliv pozorován u postnatálních skupin S a SW s akutní aplikací SA v dospělosti. Postnatální skupiny S ( $p<0,001$ ) a SW ( $p<0,01$ ) volily tigmotaxi [ $F_{(3,182)}=7,75$ ;  $p<0,001$ ] pro strategii k nalezení místa ostrůvku daleko častěji ve srovnání s jejich nestresovanou kontrolou N (Obr.25.C). Zároveň obě tyto skupiny, tj. S ( $p<0,001$ ) a SW ( $p<0,001$ ), používaly tigmotaxi častěji než postnatální skupina W. Podobně pak skupina S volila strategii skenování [ $F_{(3,182)}=5,38$ ;  $p<0,05$ ] v blízkosti místa ostrůvku významně méně ( $p<0,05$ ) než nestresované kontroly N (Obr.25.D). Naopak postnatální skupina W používala skenování výrazně častěji ( $p<0,001$ ) než postnatální skupina S.

### 5.7.2.3. Vliv akutní aplikace MA

Akutní aplikace MA v dospělosti, tj. každý den po plavání daného jedince v MWM dávkou 1 mg/kg, vyvolala významný rozdíl v parametru sledované strategie tigmataxe [ $F_{(1,184)}=6,77$ ;  $p=0,01$ ], a to ve skupině prenatalně exponovaných MA (Obr.24.C). Tato skupina, tj. prenatalní MA/akutní MA v dospělosti, využívala tuto strategii pro nalezení místa ostrůvku daleko méně ( $p<0,01$ ) než skupina s prenatalním MA/akutní SA v dospělosti. Ve strategii skenování se podobný efekt neukázal. Vliv akutního podání drogy v dospělosti se ukázal významný i ve skupině potkanů postnatálně vystavených mateřské separaci S ( $p<0,05$ ) a SW ( $p<0,01$ ), kde akutní aplikace MA v dospělosti snížila strategii plavání pomocí tigmataxe [ $F_{(1,182)}=7,75$ ;  $p<0,05$ ] (Obr.25.C). U postnatální skupiny SW ( $p<0,05$ ) pak akutní MA v dospělosti naopak výrazně zvýšila hledání ostrůvku pomocí strategie skenování [ $F_{(1,182)}=6,12$ ;  $p<0,05$ ] (Obr.25.D).



**Obr.24. Vliv prenatální aplikace MA/stresu, postnatálního stresu a akutní aplikace MA na sledované parametry ve MWM v druhé fázi „Probe“ testu.** A) vzdálenost (cm), B) rychlost (cm/s), C) tigmotaxe (%) a D) skenování (%). Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. N – postnatálně nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA – podání fyziologického roztoku každý den po plavání daného subjektu. Akutní MA – podání metamfetaminu každý den po plavání daného subjektu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou (šrafovaný sloupec) a její kontrolou (akutní SA, nešrafovaný sloupec). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou (N) či provázaným sloupcem (pouze mezi skupinami s akutní SA nebo jen mezi skupinami s akutní MA).



**Obr.25. Vliv postnatálního stresu a akutní aplikace MA na sledované parametry ve MWM v druhé fázi „Probe“ testu.** A) vzdálenost (cm), B) rychlost (cm/s), C) tigmotaxe (%) a D) skenování (%). Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. N – nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA – podání fyziologického roztoku každý den po plavání daného subjektu. Akutní MA – podání metamfetaminu každý den po plavání daného subjektu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  významný rozdíl mezi danou skupinou (šrafovaný sloupec) a její kontrolou (akutní SA, nešrafovaný sloupec). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou (N) či provázaným sloupcem (pouze mezi skupinami s akutní SA nebo jen mezi skupinami s akutní MA).

### 5.7.3. Test Paměti

#### 5.7.3.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu

Vliv prenatální expozice MA/SA nebyl v testu Paměti patrný, tj. žádný významný rozdíl se oproti prenatální kontrole C neukázal. Různé prenatální skupiny byly ovlivněny až aplikací MA v dospělosti (viz sekce 5.7.3.3. níže).

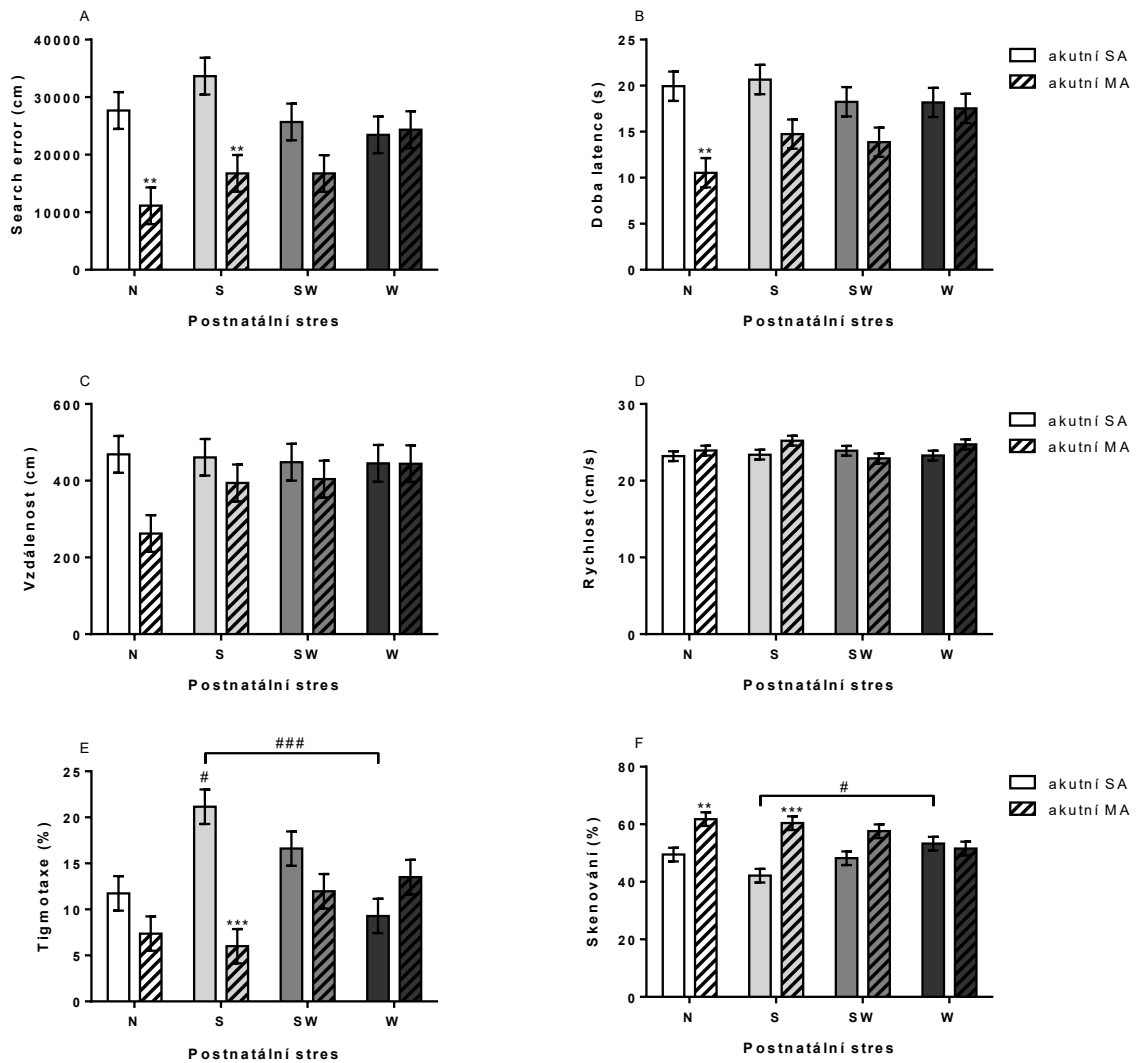
#### 5.7.3.2. Vliv postnatální expozice stresu

Vliv časně postnatálního stresu se projevil ve strategii plavání pro nalezení ostrůvku. Postnatálně ovlivněná skupina S plavala pomocí tigmataxe [ $F_{(3,184)}=8,98$ ;  $p<0,001$ ] významně více ( $p<0,05$ ) než nestresovaná kontrola N. Daný efekt se projevil pouze u skupin s akutní aplikací SA v dospělosti. Postnatální skupina S (s akutním SA) dále plavala pomocí tigmataxe také výrazně častěji ( $p<0,001$ ) než postnatální skupina W (s akutním SA). Podobně i skupina S (s akutním SA) hledala ostrůvek pomocí strategie skenování [ $F_{(3,184)}=1,21$ ;  $p=0,31$ ] daleko méně ( $p<0,05$ ) než skupina W (s akutním SA).

#### 5.7.3.3. Vliv akutní aplikace MA

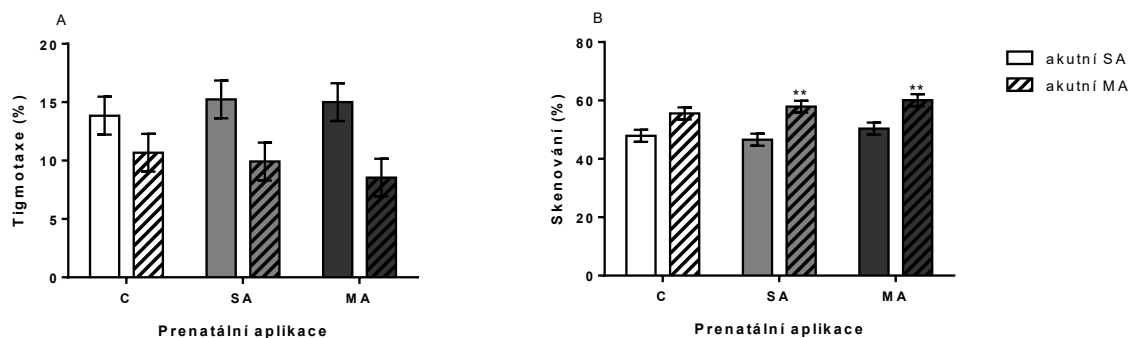
Akutní aplikace MA v dospělosti vyvolala významné rozdíly ve sledovaném parametru vzdálenost od ostrůvku [ $F_{(3,184)}=8,98$ ;  $p<0,001$ ], kde u postnatálních skupin N ( $p<0,01$ ) a S ( $p<0,01$ ) významně zkrátila vzdálenost od hledaného místa (Obr.26.A). Podobně i v parametru doba latence [ $F_{(3,184)}=8,98$ ;  $p<0,001$ ] se u postnatálně nestresované skupiny N výrazně zkrátila ( $p<0,01$ ) doba k objevení ostrůvku (Obr.26.B).

Akutní aplikace drogy také hrála významnou roli pro zvolení strategie plavání. Skupina potkanů postnatálně ovlivněných mateřskou separací S významně snížila ( $p<0,001$ ) využívání strategie pomocí tigmataxe [ $F_{(1,184)}=14,21$ ;  $p<0,001$ ] a naopak zvýšila ( $p<0,001$ ) hledání ostrůvku pomocí strategie skenování [ $F_{(1,184)}=32,58$ ;  $p<0,001$ ] (Obr.26.E,F). Také postnatálně nestresované kontroly N zvýšily ( $p<0,01$ ) po akutní aplikaci MA v dospělosti své hledání ostrůvku za pomoci strategie skenování. Hlavní efekt akutní aplikace MA v dospělosti se ukázal také významný v parametru skenování [ $F_{(1,186)}=32,58$ ;  $p<0,001$ ] ve skupině potkanů prenatálně ovlivněných SA a MA (Obr.27.B). Prenatálně exponovaní jedinci SA ( $p<0,01$ ) i MA ( $p<0,01$ ) po aplikaci MA v dospělosti výrazně zvýšili své hledání pomocí strategie skenování.



**Obr.26. Vliv postnatálního stresu a akutní aplikace MA na sledované parametry ve MWM ve třetí fázi v testování paměti.** A) vzdálenost od ostrůvku (cm), B) doba latence (cm), C) (celková uplavaná) vzdálenost (cm), D) rychlost (cm/s), E) tigmotaxe (%) a F) skenování (%). Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. N – nestresovaná kontrola, S – mateřská separace, W – plavání matek ve studené vodě, SW – mateřská separace a plavání matek ve studené vodě. Akutní SA –podání fyziologického roztoku každý den po plavání daného subjektu. Akutní MA –podání metamfetaminu každý den po plavání daného subjektu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou (šrafovaný sloupec) a její kontrolou (akutní SA, nešrafovaný sloupec). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou (N) či provázaným sloupcem (pouze mezi skupinami s akutní SA nebo jen mezi skupinami s akutní MA).





**Obr.27. Vliv prenatální aplikace a akutní aplikace MA na sledované parametry ve MWM ve třetí fázi v testování paměti.** A) tigmotaxe (%) a B) skenování (%). C – prenatální kontrola, SA – fyziologický roztok, MA – metamfetamin. Výsledky jsou prezentovány jako průměr ± SEM. Akutní SA –podání fyziologického roztoku každý den po plavání daného subjektu. Akutní MA –podání metamfetaminu každý den po plavání daného subjektu. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou (šrafovaný sloupec) a její kontrolou (akutní SA, nešrafovaný sloupec). #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  významný rozdíl mezi danou skupinou a její postnatální kontrolou (N) či provázaným sloupcem (pouze mezi skupinami s akutní SA nebo jen mezi skupinami s akutní MA).

## 6. Diskuse

Naším cílem bylo zjistit vliv různých perinatálních faktorů na sledované funkce a chování. Diskuse je tedy rozdělená v jednotlivých experimentech na vliv prenatální expozice MA/stresu, vliv postnatální expozice stresu a vliv akutní aplikace MA.

### 6.1. Mateřské chování

#### 6.1.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu

Matky ovlivněné v průběhu březosti účinkem MA věnují méně pozornosti svým mláďatům s ohledem na čištění svých potomků, což je ve shodě s našimi předešlymi studiemi (Šlamberová *et al.* 2005a). Toto chování také podporuje výsledek „Retrieval“ testu, kdy se kontrolní matky C (nevystavené v průběhu březosti žádné injekční aplikaci), které byly stresované po porodu (C-S, C-SW, C-W), snažily dostat své potomky do hnízda rychleji než nestresované kontroly (C-N). Výsledky tedy naznačují, že dlouhodobě podávaná droga (prenatální MA) či stres (prenatální SA) v průběhu gestace naopak zájem o mláďata v tomto testu utlumil. Matky ovlivněné MA byly také při nošení mláďat do hnízda výrazně pomalejší než ty ovlivněné SA. Tyto faktory v období březosti, zejména pak aplikace MA, tedy mohou významně narušovat chování matek po porodu (Šlamberová *et al.* 2005a;b, Holubová *et al.* 2017).

#### 6.1.2. Vliv postnatální expozice stresu

U stresovaných matek v období laktace (S, SW, W) byla pozorována vyšší frekvence kojení v pasivní pozici než u nestresovaných kontrol (N). Aktivní kojení proběhlo u všech skupin bez významného rozdílu. Zvýšené pasivní kojení lze vysvětlit větší potřebou stresovaných mláďat vyhledávat matku a mléko, což také může vysvětlovat to, že stresované matky trávily více času v kontaktu se svými mláďaty než matky nestresované (Holubová *et al.* 2017). Matky ovlivněné stresem v období laktace (S, SW, W) odpočívaly významně více než matky beze stresu (N). Tento účinek byl však pozorován pouze u skupiny kontrol C. Stres v období laktace tedy nevyvolal změnu v chování matek, které byly vystaveny MA/stresu v průběhu březosti. Dlouhodobý a opakovaný stres, zde prostřednictvím injekční aplikace látky (s.c.), pravděpodobně může připravit dané zvíře na jiný typ stresu v pozdějším

životě (Grissom a Bhatnagar 2009, Holubová *et al.* 2016). Výsledky studie autorů Rabasa *et al.* (2015) ukazují redukcí odpovědi HPA na opakovaný stres imobilizací u dospělých potkanů, která byla pozorována i po dvou měsících. Daným výsledkům nicméně odporují preklinické i klinické studie ukazující, že opakovaná mateřská separace vyvolává změny v chování matek, které narušují schopnost poskytovat adekvátní mateřskou péči (Huot *et al.* 2004, Ladd *et al.* 2004, Heim a Nemeroff 2002, Juruena *et al.* 2020). Rozhodujícím faktorem může být intenzita a kvalitativní rozdíly mezi jednotlivými aplikovanými stresory (Branchi *et al.* 2013, Moore *et al.* 2013).

## **6.2. Parametry mlád'at**

### **6.2.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu**

Sledovaná délka doby březosti byla v naší práci u všech skupin potkaních matek bez významného rozdílu. Naopak významný vliv tohoto faktoru ukazuje předchozí studie na laboratorních potkanech, kde aplikace MA v průběhu gestace prodloužila dobu březosti u MA matek ve srovnání s jinými skupinami (Šlamberová *et al.* 2005a). Nicméně existují i studie ukazující významně kratší dobu březosti u MA-matek laboratorního potkana (Martin 1975, Martin *et al.* 1976). Tento parametr zůstává tedy s nejasným závěrem pro hodnocení vlivu drogy (MA) *in utero*. Naše data dále ukázala, že sledované faktory (MA/stres) aplikované na matku laboratorního potkana v průběhu březosti nemají vliv na změnu hmotnosti ani na počet narozených mlád'at ve vrhu. Tyto výsledky jsou v souladu s přechozí studií z naší laboratoře (Šlamberová *et al.* 2006). Vliv prenatální drogy byl patrný u porodní hmotnosti, kdy potomci ovlivnění MA vážili významně méně než ostatní skupiny mlád'at (prenatální SA/C). Tento výsledek potvrzuje anorektický účinek MA (Bittner *et al.* 1981), který byl prokázán v několika předchozích preklinických (Martin *et al.* 1976, Šlamberová *et al.* 2006, Malinová-Ševčíková *et al.* 2014) a klinických studiích (Little *et al.* 1988, Smith *et al.* 2006) zaměřujících se na vliv prenatálního MA (Holubová *et al.* 2017).

### **6.2.2. Vliv postnatální expozice stresu**

Co se týče hmotnostního přírůstku, skupina potomků postnatálně ovlivněná výlučně mateřskou separací (S) měla významně větší nárůst hmotnosti v průběhu období laktace než ostatní skupiny, a to bez ohledu na prenatální expozici. Jedno z možných vysvětlení

tohoto účinku může být prokázána snížená hladina leptinu u potomků laboratorního potkana po opakované mateřské separaci v porovnání s kontrolní skupinou zvířat (Holubová *et al.* 2016, Salzmann *et al.* 2004, Smith *et al.* 2006, Walker *et al.* 2004). Snížená hladina leptinu fyziologicky zvyšuje chuť k jídlu (Friedman 2011), což by mohlo vysvětlit daný nárůst hmotnosti mláďat v období laktace. Dalším důvodem může být statisticky významně zvýšené kojení v pasivní pozici u stresovaných matek (S, SW, W) v porovnání s kontrolami (N). Celkově byla tedy postnatálně stresovaná mláďata krmena častěji než ta nestresovaná. To také potvrzují výsledky studie kolektivu autorů Mesquita *et al.* (2007), kde se mláďata stresovaná mateřskou separací krmila daleko déle než kontrolní zvířata, pravděpodobně aby kompenzovala předchozí absenci matky (Holubová *et al.* 2017, Mesquita *et al.* 2007). Na druhou stranu, naše výsledky ukázaly i na časté krmení ostatních postnatálně stresovaných skupin mláďat (W, SW), avšak tato mláďata přibrala významně méně než skupina S. Je tedy možné, že opakované plavání matek ve studené vodě během doby laktace může mít vliv na tvorbu mléka (Holubová *et al.* 2017). V naší práci jsme však tvorbu mléka u matek neměřili, stejně jako jsme neměřili ani příjem vody a jídla u mláďat. Pro lepší posouzení příčiny nárůstu hmotnosti potomků postnatálně stresovaných matek v období laktace by tedy bylo vhodné sledovat i tyto parametry v příštích projektech.

### **6.3. Vývoj mláďat**

#### **6.3.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu**

Senzorimotorický vývoj mláďat je negativně ovlivněn prenatálním působením MA, což prokázala řada preklinických studií (Acuff-Smith *et al.* 1996, Hrubá *et al.* 2009, Malinová-Ševčíková *et al.* 2014, Šlamberová *et al.* 2006). I v naší práci byla mláďata ovlivněná MA pomalejší ve vzpřimovacím reflexu na podložce, v testu Negativní geotaxe a Rotarodu. Prenatální droga zpomalila vzpřimovací reflex mláďat během prvních několika dní po porodu, a to tedy bez ohledu na teprve začínající aplikaci postnatálních stresorů. Prenatální stres (prenatální SA) v prvních dnech života zpomalil pouze postnatálně stresovaná mláďata (S, W). Je tedy možné, že ihned navazující časný postnatální stres umocňuje negativní vliv prenatálního stresu, který by v opačném případě nebyl tolik patrný (Holubová *et al.* 2017). Již v minulosti bylo potvrzeno, že prenatální stres dlouhodobě ovlivňuje schopnost dospělého organismu patřičně odpovědět na stresové situace (Peters 1986, Šlamberová *et al.* 2002). Prenatální stres v naší práci také významně zhoršil výkon již starších

mláďat (v PD 23) v testu Rotarod, a to bez ohledu na aplikaci postnatální stresorů. Tento výsledek tedy naznačuje dlouhodobou poruchu posturálních reakcí. Podobné výsledky potvrzuje i předchozí preklinická práce z naší laboratoře (Šlamberová *et al.* 2006, Holubová *et al.* 2017).

### 6.3.2. Vliv postnatální expozice stresu

Překvapující výsledek jsme získali porovnáním skupiny s kombinací prenatalního MA a postnatálním stresem (MA-S, MA-SW, MA-W) s jejich nestresovanými kontrolami (MA-N). První skupina mláďat, postnatálně stresovaná (MA-S, MA-SW, MA-W), měla významně lepší výkon v testu hrazdička než její nestresovaný protějšek (MA-N). Jedno z možných vysvětlení může být to, že mláďata vystavená dlouhodobému časné postnatálnímu stresu jsou odolnější vůči pozdějšímu stresu, kterým je testování na vysoké hrazdičce. Naše předchozí studie (Holubová *et al.* 2016) naznačila, že dlouhodobý časné postnatální stres prostřednictvím sociálních a fyzikálních stresorů matky vede k nižší citlivosti ACTH receptorů v kůře nadledvin, což by mohlo být způsobeno adaptací na stresové události (Holubová *et al.* 2016). I jiné studie ukazují, že opakovaná expozice časné postnatálnímu stresu může vyvolat adaptaci mláďat na nové prostředí (Daskalakis *et al.* 2011). Dlouhodobě opakovaný postnatální stres, který je stanovený specifickými podmínkami preklinických studií, tedy může připravit zvířata na nové podněty a další stresující situace v životě (Holubová *et al.* 2016). Na druhou stranu zde může být i jiné vysvětlení tohoto výsledku na hrazdičce. Dané chování postnatálně stresovaných mláďat může vysvětlit i snížená lokomoce a snížený průzkum prostředí (hrazdičky) z důvodu větší míry úzkostného chování (Aisa *et al.* 2007, Holubová *et al.* 2017, Yang *et al.* 2017). Toto chování je zprostředkováno osou HPA a dále modulováno limbickým systémem jako je hipokampus, PFC a amygdala (Leon Rodriguez a Duenas 2013, Holubová *et al.* 2017). Jiné testy určené pro hodnocení sensorimotorického vývoje mláďat neukázaly významné rozdíly mezi postnatální skupinami, což podporují výsledky studie autorů Mesquita *et al.* (2007), kde byly pozorované změny v negativní geotaxi pouze do PD 7 a ve vzpřimovacím reflexu ve vzduchu do PD 12. V naší práci jsme prováděli test negativní geotaxe pouze v PD 9 a test vzpřimovacího reflexu ve vzduchu v PD 17.

## 6.4. Sociální hra

### 6.4.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu

Prenatální expozice droze či stresu v naší práci neměla vliv na sociální hru či sociální exploraci dvou neznámých potkanů v juvenilním věku. Předchozí práce v naší laboratoři poukázala na významný vliv prenatálního MA v první polovině březosti u potomstva samců laboratorního potkana (Ševčíková *et al.* 2020). V druhé polovině březosti se tato významnost neprojevila. Důležitým rozdílem v naší a uvedené práci (Ševčíková *et al.* 2020) je tedy odlišná metodika. V naší práci jsme nesledovali vliv specifické fáze gestace na dané chování a také jsme použili přísnější *post-hoc* test, tj. Bonferroni oproti Fisher *post-hoc* testu v práci kolektivu autorů Ševčíková *et al.* (2020).

### 6.4.2. Vliv postnatální expozice stresu

Mateřská péče v časně postnatálním období je jistě velmi důležitým faktorem ve vývoji sociálního chování potomků, což dokazuje předchozí studie (van Hasselt *et al.* 2012), jež ukázala pozitivní korelaci mezi mírou mateřské péče v prvním postnatálním týdnu života a mírou sociálního chování zaměřenou na hru u adolescentních samců. U adolescentních samic tento efekt nebyl významný (van Hasselt *et al.* 2012). V naší studii se u postnatálního stresu, bez rozdílu typu stresoru, významný vliv na sociální hru juvenilních potkanů neukázal. Předchozí preklinické studie na potkanech zahrnující časně postnatální stres prostřednictvím mateřské separace v prvních týdnech života mláďat ukazují různé výsledky, tj. zvýšené (Lundberg *et al.* 2017, Zimmerberg a Sageser 2011), snížené (Muhammad a Kolb 2011), nebo nezměněné (Arnold a Siviy 2002) chování týkající se sociální hry laboratorních potkanů. Metodiky daných studií se liší různou dobou izolace těsně před samotným testem. V naší práci byli potkani izolováni jednu noc před samotným testem sociální hry. Nedávná studie Kentrop *et al.* (2018) hodnotila vliv jednorázové mateřské separace v PD 3 po dobu 24 hodin na sociální chování u juvenilních potkanů s předchozí 24h izolací, nebo bez izolace těsně před testem sociální hry v PD 33. Výsledkem dané studie bylo zjištění, že sociální hra 24h izolovaných samců trvá podstatně kratší dobu ve srovnání se skupinou bez izolace. Parametr sociální explorační u takto deprivovaných samců byl naopak významně delší než u kontrol. Autoři studie tedy postulují, že mateřská separace může tlumit chování týkající se sociální hry, ne však společenský zájem obecně. U samic se daný rozdíl neukázal. Juvenilní samci a samice, které byly vystaveny kratší izolaci po dobu 3h,

nevykazovali žádné významné rozdíly ve sledovaných parametrech sociálního chování (Kentrop *et al.* 2018). Podobně i naše data neprokázala významný vliv časně postnatálních stresorů na sociální hru u juvenilních samců a samic izolovaných jednu noc před testem (cca 16h). Delší izolace po dobu jednoho celého dne (24h) by tak mohla být rozhodujícím faktorem pro signifikantní změnu sociálního chování v juvenilním věku zvířat. Mateřská separace tedy může mít negativní efekt na sociální chování v juvenilním období laboratorního potkana (Kentrop *et al.* 2018). Nicméně téma sociálního chování a sociální hry u jedinců vystavených dlouhodobému časně postnatálnímu stresoru není doposud detailně prostudována. Další studie jsou zapotřebí pro ucelení dané problematiky.

### 6.4.3. Vliv akutní aplikace MA

Akutní droga 45 minut před samotným testem výrazně utlumila sociální chování, ať už sociální hru či sociální exploraci páru zvířat. Tento výsledek je podpořen podobnými výsledky v obou parametrech publikovanými v přechozí práci z naší laboratoře, kdy jednorázově podaný MA před testem způsobil významný útlum sociálního chování laboratorního potkana ve všech sledovaných parametrech ve srovnání s relevantními kontrolami (Ševčíková *et al.* 2020). I další preklinické studie ukázaly podobné výsledky, tedy významně snížený sociální kontakt dvou zvířat po přechozím jednorázovém podání MA, ať už v juvenilním věku či v dospělosti (Davidson *et al.* 2001, Hřebíčková *et al.* 2017, Manduca *et al.* 2014, Šlamberová *et al.* 2015, Šlamberová *et al.* 2010). Podobně bylo zjištěno, že i akutní dávka jiných psychostimulantů jako je kokain, amfetamin, MDMA či metylfenidát, může utlumit sociální chování, a to v dávkách nižších, které ještě nezpůsobují běžné zvýšení psychomotorické aktivity při užívání daných drog (Achterberg *et al.* 2014, Sahakian *et al.* 1975, Vanderschuren *et al.* 2008). Autoři studie Achterberg *et al.* (2014) postulují, že ačkoliv ovlivněná zvířata nevyhledávají sociální hru s jinými jedinci, neznamená to, že by nechtěla vyhledávat sociální zdroj pozitivních emocí. Možný mechanismus účinku daného vlivu amfetaminů na sociální hru pravděpodobně nezávisí na dopaminergním mechanismu, který je pevně spjat se systémem odměny (Achterberg *et al.* 2016, Achterberg *et al.* 2014, Veeneman *et al.* 2011, Veeneman *et al.* 2012). Zvýšená hladina DA po podání MA sice může zvyšovat motivaci pro sociální hru, ale neovlivňuje expresi daného chování. Naopak bylo zjištěno, že expresi sociální hry, stejně jako motivaci pro hru, ovlivňuje zejména zvýšená noradrenergí neurotransmise (Achterberg *et al.* 2016). Mechanismus účinku u amfetaminu působící na sociální hru tedy tkví převážně ve stimulaci  $\alpha$ 2-adrenoreceptorů.

Útlum sociální hry je totiž negován po podání antagonisty  $\alpha 2$ -adrenergických receptorů RX821002 a není ovlivněn antagonistou dopaminových receptorů  $\alpha$ -flupenthixolu (Achterberg *et al.* 2014). Podobně bylo po podání atomoxetinu, přímého inhibitoru zpětného vychytávání NA přes  $\alpha 2$ -adrenoreceptory, prokázána snížená exprese chování týkající se sociální hry (Achterberg *et al.* 2014, Vanderschuren *et al.* 2008). Potlačení sociální hry po amfetaminech může být také spjato s anxiogenním chováním po užití těchto drog. V některých preklinických studiích dané drogy neovlivnily sociálně explorační chování, což je standardní parametr úzkosti používaný v testu sociální interakce (Achterberg *et al.* 2014, File a Seth 2003). V naší práci bylo však i tento parametr utlumen. Alternativním vysvětlením účinku MA na sociální hru může být to, že se jedná o výsledek zvýšené inhibice chování (Achterberg *et al.* 2014). Zvýšením inhibiční kontroly nad sociálním chováním mohou psychostimulační drogy zvýšit pozornost vůči nesociálním podnětům v prostředí. To pak může způsobit, že se zvířata méně zapojují do energicky náročných interakcí sociální hry, které by byly doprovázeny sníženou pozorností na potenciálně důležité podněty z prostředí (Achterberg *et al.* 2014). Také zvýšení noradrenergí neurotransmise vyvolané amfetaminy může podpořit odpojení od probíhající sociální hry a usnadnit tak změnu chování (Achterberg *et al.* 2014, Aston-Jones a Cohen 2005).

#### **6.4.4. Vliv pohlaví**

Akutní droga výrazně snížila parametry sociální hry u obou pohlaví. Juvenilní samice laboratorního potkana byly významně aktivnější při sociální hře ve srovnání se samci. Konkrétněji, v prvním sledovaném parametru „pouncing“ byly aktivnější oproti samcům, jak ve skupině s aplikací akutního MA, tak i ve skupině kontrol s akutním SA bez ohledu na perinatální faktory. V parametrech „pinning“ a „boxing“ pak byly oproti samcům aktivnější pouze kontrolní samice (s akutním SA). Sociální explorace nebyla pohlavím ovlivněna. Našim výsledkům odporují data ze studie Ševčíková *et al.* (2020), kde samci s prenatalní expozicí MA a aplikací akutního SA před behaviorálním testem byly významně aktivnější v parametrech sociální hry než dané samice. Jednalo se však pouze o samce ovlivněné drogou v první polovině gestace. V druhé polovině gestace se daný vzorec neukázal, ukázala se však zvýšená aktivita obou pohlaví pro sociální chování (Ševčíková *et al.* 2020). V naší práci jsme nesledovali specifický vliv faktorů na různá období vývoje *in utero*. Předpokládáme tedy, že vliv první poloviny gestace by mohl být zamaskován vlivem druhé poloviny. Celkově pak byly samice aktivnější oproti samcům bez rozdílu prenatalního



či časně postnatálního ovlivnění. Studie autorů Kentrop *et al.* (2018) zaměřující se na sociální chování adolescentních samců a samic po expozici mateřské separaci naznačuje, že samci se zdají být ovlivňováni změnami prostředí významně více než samice (Kentrop *et al.* 2018).

## **6.5. Stanovení hladiny oxytocinu**

### **6.5.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu**

Výsledky naší práce naznačují, že dlouhodobá prenatální expozice droze (MA) a stresu (SA) ovlivňuje účinek té samé drogy na hladinu oxytocinu v dospělosti. V naší práci nebylo u daných prenatálně ovlivněných skupin naměřeno významné zvýšení hladin tohoto hormonu po podání akutního MA v dospělosti tak, jak tomu bylo ve skupině kontrol (C). Daný mechanismus účinku může být přes tzv. „down-regulaci“ receptorů pro oxytocin po dlouhodobém působení prenatálních faktorů, což může dále snížit jejich citlivost na následné podání MA v juvenilním věku (PD 30) (Holubová *et al.* 2019). Výsledky naší práce ukazují, že nejen dlouhodobá prenatální expozice MA, ale i dlouhodobý prenatální stres ovlivňuje vývoj oxytocinergního systému. Podobně i studie, která pozorovala důsledky antenatálního stresu v F2 generaci zjistila, že chronický stres aplikovaný v F0 a F1 generaci způsobuje v F2 generaci zvýšení basálního oxytocinu v plazmě (Babb *et al.* 2014).

### **6.5.2. Vliv postnatální expozice stresu**

Vliv postnatálního stresu, který způsobil snížení hladiny oxytocinu, se v naší práci projevil pouze u prenatálních kontrol (C) a u skupiny ovlivněné prenatální drogou (MA). Hladina oxytocinu u skupin prenatálně vystavených stresu (SA) se v rámci postnatálních skupin významně nezměnila. Jedna z možných hypotéz pro daný výsledek může být adaptace organismu na stresové situace. Bylo prokázáno, že mírný mateřský stres během gestace může indukovat snížení metylace receptorů pro oxytocin u potomstva, což má dále za následek zvýšenou expresi těchto receptorů, a tedy i větší citlivost na působení tohoto hormonu (Holubová *et al.* 2019, Unternaehrer *et al.* 2016). Takto nastavený oxytocinergní systém pak může v interakci s osou HPA a sympatickým nervovým systémem utlumit odpověď organismu na stres (Grewen a Light 2011, Holubová *et al.* 2019, Lee *et al.* 2009). Potomci ovlivnění opakovaných prenatálním stresem prostřednictvím injekční aplikace matce

tak mohou být díky epigenetické adaptaci receptorů pro oxytocin připraveni na další stresové situace v průběhu života (Holubová *et al.* 2019, Unternaehrer *et al.* 2016).

Kolektiv autorů Murgatroyd a Nephew (2013) poukázal na sníženou genovou expresi oxytocinu v hypotalamu u potomstva vystavenému chronickému stresu. Podobně i další preklinické studie zjistily snížený počet oxytocinových neuronů v hypotalamu dospělých potkanů po neonatální manipulaci (Todeschin *et al.* 2009, Winkelmann-Duarte *et al.* 2007). Tento mechanismus účinku by tak mohl vysvětlit pozorované snížení hladin oxytocinu u skupin potkanů postnatálně ovlivněných stresem v naší studii. Deregulace osy HPA a oxytocinergního systému může vést k dlouhodobého postižení hypotalamických struktur. Tato deregulace snižuje produkci a uvolňování kortizolu a oxytocinu, které ovlivňují reakce na stres a mohou vést ke zvýšené zranitelnosti vůči pozdějším stresovým situacím (Tobon *et al.* 2018). Snížený počet oxytocin-pozitivních magnocelulárních neuronů byl nalezen také u potkanů prenatalně ovlivněných chronickým stresem („restrain stress“) (de Souza *et al.* 2013). Studie de Souza *et al.* (2013) dále ukazuje na zhoršenou mateřskou péči časně postnatálně a zvýšené anxiogenní a agresivní chování potomků v dospělosti, které může způsobovat snížená sekrece oxytocinu (de Souza *et al.* 2013, Holubová *et al.* 2019). Výsledky podobných studií však nejsou zcela konzistentní. Studie kolektivu Minhas *et al.* (2016) pozorovala opačné hodnoty plazmatického oxytocinu, tedy zvýšení jeho hladiny u juvenilních samic potkana ve věku PD 30. Nicméně metodika této studie je podstatně odlišná od metodiky aplikované v naší práci. Metodika kolektivu Minhas *et al.* (2016) je zaměřena na hladinu plazmatického oxytocinu odebraného po 30 min od aplikace akutního „restrain“ stresu, což může mít za následek opačný výsledek. Význam druhu a intenzity použitého stresoru je patrná i v naší studii, kdy postnatální stres prostřednictvím samotné mateřské separace (S) nevyvolala takové změny jako například postnatální stres prostřednictvím plavání matek ve studené vodě (W, SW) (Holubová *et al.* 2019).

### **6.5.3. Vliv akutní aplikace MA**

Naše práce jako první ukázala, že akutní jednorázové podání MA zvyšuje hladinu plazmatického oxytocinu u juvenilních samic laboratorního potkana. Tento efekt byl však pozorován pouze u prenatalních kontrol (C), tedy u potkanů bez expozice prenatalní drogy či stresu. Postnatální stresory pak na daný výsledek neměly výrazný vliv. Deregulace oxytocinergního systému byla po podání akutního MA prokázána již v předchozích studiích u dospělých laboratorních zvířat. Konkrétněji, po podání MA se zvyšuje exprese mRNA

pro oxytocin v nucleus accumbens (Cadet *et al.* 2014) a dochází k „up-regulaci“ oxytocinových receptorů v amygdale a hypotalamu, jež jsou zahrnuty do regulace stresu (Georgiou *et al.* 2016, Holubová *et al.* 2019, Zanos *et al.* 2014). Zvýšená hladina plazmatického oxytocinu byla prokázána i po „self-administraci“ MA u samců potkana v dospělosti (Baracz a Cornish 2016, Baracz *et al.* 2016, Georgiou *et al.* 2016). Navíc, zvýšení hladiny oxytocinu může přetrvávat ještě 15 dní po dlouhodobé (20-denní) expozici MA (Baracz *et al.* 2016, Holubová *et al.* 2019).

## **6.6. Změny chování v dospělosti**

### **6.6.1. Anxieta**

#### **6.6.1.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu**

Naše data ukázala, že prenatální faktory nemají významný vliv na úzkostné chování u dospělých samců laboratorního potkana. Tyto výsledky jsou srovnatelné s předchozími studiemi, kde dlouhodobá aplikace drogy (MA) v průběhu gestace neukázala významné rozdíly v chování mezi ovlivněnou skupinou a kontrolou potkanů v dospělosti (Hrubá *et al.* 2012, Schutová *et al.* 2009b). Kolektiv autorů Hrubá *et al.* (2012), který hodnotil změny po dlouhodobé prenatální a časné postnatální aplikaci MA u dospělých samců laboratorního potkana zjistil, že prenatální expozice drogy neměla na úzkostné chování samců vliv (Hrubá *et al.* 2012). Nicméně i u stejně ovlivněné prenatální skupiny samců dospělých potkanů byla nalezena zvýšená bazální hladina DA v nucleus accumbens (zvýšení 288%). Vyšší hladina DA byla u těchto zvířat dále spojena s kratší dobou imobility a s pozorovanou vyšší senzitivitou na akutní dávku MA v dospělosti ve srovnání s kontrolní skupinou (Bubeníková-Valešová *et al.* 2009).

#### **6.6.1.2. Vliv postnatální expozice stresu**

Postnatální stresory použité v naší studii snížily míru úzkostného chování v OF, když zvířata trávila více času v centrálním kruhu, méně času rozích OF a méně času ve stavu imobility v porovnání s nestresovanými kontrolami (N). Míra úzkostného chování byla také snížena v testu EPM, kde skupiny ovlivněné postnatálním stresem strávily v porovnání s kontrolami méně času v uzavřených ramenech. Zajímavé ovšem je, že skupina potkanů vystavená časné postnatálně sociálnímu stresoru prostřednictvím mateřské separace (S)

neukázala po aplikaci akutního MA významný rozdíl v čase stráveném v centrálním kruhu či v rozích OF v porovnání s akutní SA skupinou. Tento sociální stresor aplikovaný časně postnatálně tak může ovlivnit citlivost k akutní droze v dospělosti. Dostupná data popisující vliv postnatálního stresu na anxiety v preklinických studiích se však liší. Některé studie ukazují zvýšení úzkostného chování po neonatální mateřské separaci (de Melo *et al.* 2018, Jin *et al.* 2018) jako studie autorů de Melo *et al.* (2018) pozorující kratší strávenou dobu samců v otevřených ramenech a více času v uzavřených ramenech EPM. Tato studie zároveň popsala úbytek dendritických trnů v PFC a naopak zvýšenou hustotu v hipokampu v oblasti CA1 u dospělých samců potkana (de Melo *et al.* 2018). Některé preklinické studie však ukazují opačný výsledek. Výsledky studie autorů Yang *et al.* (2019) ukázaly, že každodenní mateřská separace na 3 nebo 6 h časně postnatálně (PD 2-14) může snížit úzkostné chování laboratorního potkana (Yang *et al.* 2019). Studie autorů Borges-Aguiar *et al.* (2018) potvrzuje naše zjištění u S skupiny, že 3 h mateřské separace denně v průběhu celého období laktace nemá významný vliv na úzkostné chování u dospělých potkanů v EPM a v OF. Snížený nebo nepřítomný anxiogenní účinek u postnatálně stresovaných potkanů v dospělosti je také ve shodě s jinými studiemi, které použily odlišné behaviorální testy pro hodnocení anxiety u zvířat, tj. podmiňování strachu, sociální interakce či „restrain“ stres (Caldji *et al.* 2000, Holubová-Kroupová a Šlamberová 2021, Hulshof *et al.* 2011, McIntosh *et al.* 1999, Savignac *et al.* 2011). Výsledky těchto studií naznačují, že expozice časně postnatálnímu stresu může vyústit v adaptivní chování daného jedince v dospělosti (Mittal *et al.* 2015, Sachser *et al.* 2011). Nicméně je třeba rozeznávat intenzitu stresoru. Těžce stresující události mohou vést k maladaptaci, zatímco mírné stresory mohou navodit protektivní účinky (Yang *et al.* 2019). Například tzv. „handling“ mláďat, tj. krátké odloučení mláďat od matek, během v období laktace může snížit negativní účinky chronického stresu na reaktivitu stresové osy HPA (Oines *et al.* 2012). Tato krátkodobá mateřská separace (15 min/denně) může také navodit zlepšení mateřské péče v souvislosti se snížením presynaptické excitační aktivity na neurony CRH a snížením uvolnění tohoto hormonu (Babicola *et al.* 2021). V naší předchozí studii jsme pozorovali zvýšenou hladinu ACTH a sníženou hladinu kortikosteronu v plazmě u skupin potkanů postnatálně ovlivněných mateřskou separací (S) či kombinací obou sledovaných stresorů (SW), a to po jednorázové stresové situaci v dospělosti ve srovnání s nestresovanými kontrolami (Holubová *et al.* 2016). Dlouhodobý postnatální stres tedy může vést ke snížené citlivosti ACTH receptorů v kůře nadledvin, což může následně pomoci k adaptaci jedince na další stresovou událost. Chronický časně postnatální stres tak může připravit organismu na vyrovnání se s pozdější

stresovou událostí (Daskalakis *et al.* 2011, Grissom a Bhatnagar 2009, Holubová-Kroupová a Šlamberová 2021, Yang *et al.* 2019).

### 6.6.1.3. Vliv akutní aplikace MA

Podaná akutní droga (MA) v dospělosti významně ovlivnila hodnocené parametry pro úzkostné chování hodnocené v OF a EPM. Konkrétněji, akutní dávka MA podaná 45 min před samotným testem zvýšila čas strávený v centrální kruhu OF, snížila čas strávený v jejích rozích, snížila dobu strávenou v imobilitě a snížila čas strávený čištěním sama sebe. Tyto naše výsledky podporují některé předchozí preklinické studie zaměřující se na OF (Herbert a Hughes 2009, Schutová *et al.* 2009b). Studie autorů Schutová *et al.* (2009b) ukázala, že stejná dávka MA (1 mg/kg), jako je použita v naší práci, snižuje čas strávený v rozích OF a v imobilním stavu a zvyšuje čas strávený v centrálním kruhu OF (Schutová *et al.* 2009b). Naše data z EPM pak ukázala sníženou frekvenci pozice SAP potkanů ovlivněných akutním MA v porovnání s SA kontrolami, což naznačuje snížené úzkostné chování. I tyto výsledky z EPM jsou v souladu s výsledky předchozích studií zahrnující tutéž metodiku z naší laboratoře (Schutová *et al.* 2009b). Jednorázově podaná droga (MA) před testem však může způsobit i opačné účinky, tedy zvýšit úzkostné chování pozorované v OF ve srovnání s akutní SA kontrolou (Struntz a Siegel 2018). Daná studie nicméně použila dospělé laboratorní myši jako subjekty, akutní MA byl podán těsně před zahájením testu v OF a navíc byla použita daleko vyšší dávka MA (4 mg/kg) než v naší studii. Takto vysoká dávka může indukovat stereotypní chování, což má vliv na získaná data (Holubová-Kroupová a Šlamberová 2021, Struntz a Siegel 2018). V naší studii jsme použili dávku 1 mg/kg, která byla aplikována 45 min před testem u dospělých samců laboratorního potkana. Účinek akutně podaného MA na anxieta u laboratorních zvířat tak s největší pravděpodobností závisí na aplikované dávce MA a intervalu mezi aplikací a zahájením samotného behaviorálního experimentu (Holubová-Kroupová a Šlamberová 2021).

### 6.6.2. Psychomotorické a explorativní chování

Jednorázové podání MA před testem významně zvýšilo psychomotorickou aktivitu ve skupinách N, S a SW, jenž byla pozorována skrz zvýšený počet překročených čar v OF. Tato data jsou podpořena i podobnými výsledky předchozích studií (Schutová *et al.* 2010, Struntz a Siegel 2018). Ve skupině W nebyl pozorován žádný významný rozdíl po akutním

podání MA ve srovnání s relevantní kontrolou (W-akutní SA). Mezi samotnými postnatálními skupinami nebyl zaznamenán žádný významný rozdíl (Holubová-Kroupová a Šlamberová 2021).

Akutní droga v dospělosti dále významně zvýšila parametry explorativního chování v souvislosti s prenatálním ovlivněním. Co se týče parametru vztyčování se na zadní nohy („rearing“) v testu OF, skupiny zvířat ovlivněné prenatálním MA se vztyčovaly po akutní droze v dospělosti méně než skupiny ovlivněné prenatálním SA či prenatálně neovlivněné kontroly (C). Podobně také studie autorů Schutová *et al.* (2010) pozorovala významné zvýšení času stráveného v parametru „rearing“ u skupin prenatálně ovlivněných SA. U skupiny s prenatálním MA ke zvýšení tohoto chování nedošlo (Schutová *et al.* 2010). Tento efekt byl v naší práci také pozorován v testu OF pouze u skupiny postnatálně nestresovaných samců laboratorního potkana (N). Zajímavé výsledky přinesla data z EPM ze skupin potkanů prenatálně ovlivněných stresem. Postnatální stres (S, SW, W), bez ohledu na akutní aplikaci, snížil čas strávený v pozici na zadních nohou pouze u skupin prenatálně ovlivněných MA a kontrol C ve srovnání s nestresovanými kontrolami N. Dle našich dat trávila skupina ovlivněná prenatální stresem (prenatální SA-N) srovnatelné množství času v této pozici i bez vlivu postnatálních stresorů. Rozdíl mezi prenatálními faktory však nebyl významný (Holubová-Kroupová a Šlamberová 2021).

Skupiny prenatálně ovlivněné MA a kontroly C ukázaly významný rozdíl v naměřeném čase strávený očicháváním po akutní droze v dospělosti ve srovnání s akutními kontrolami SA. Dospělí samci dlouhodobě vystavení prenatální MA po akutní droze trávily také více času očicháváním v porovnání s prenatálními kontrolami C. Naše práce by tedy mohla potvrzovat předchozí hypotézu, že dlouhotrvající vystavení prenatální MA může být spjato s vyšší citlivostí na tutéž drogu aplikovanou přímo v dospělosti, a to i přesto, že se jedná pouze o jednorázovou aplikaci (Bubeníková-Valešová *et al.* 2009; Schutová *et al.* 2009b). Ve srovnání s kontrolou se ve skupině potkanů prenatálně ovlivněných SA po akutní aplikaci MA významný rozdíl neukázal. Bazální hodnota celkově naměřeného času očichávání byla v této skupině vyšší než u prenatálních kontrol či zvířat prenatálně ovlivněných MA a po akutní aplikaci drogy nebyla dostatečně zvýšena (Holubová-Kroupová a Šlamberová 2021).

## 6.7. Morrisovo vodní bludiště

### 6.7.1. Vliv prenatalní expozice MA/stresu

Prenatální vystavení MA způsobilo významně pomalejší rychlost plavání v první fázi MWM Učení ve srovnání s prenatalní kontrolou (C). V druhé fázi MWM „Probe“ testu se signifikantní rozdíl v rychlosti a uplavané celkové dráze (vzdálenosti) projevil kromě skupiny s prenatalní expozicí MA i ve skupině s prenatalním SA. Obě skupiny byly opět pomalejší a uplavaly kratší vzdálenost oproti prenatalním kontrolám (C). Tento efekt byl v „Probe“ testu pozorován pouze u postnatálně nestresované skupiny N. Ojedinelé zpomalení rychlosti plavání a kratší uplavaná vzdálenost ve druhé fázi MWM byly zjištěny i v předchozí studii Hřebíčková *et al.* (2014) u skupiny potkanů prenatalně exponovaných MA v druhé polovině gestace (GD 12-22). Zdá se také, že postnatální stresory S, W a SW ovlivnily všechny prenatalní skupiny tak, že jejich výkon v „Probe“ testu pro vyvolání paměti byl velmi vyrovnaný. Ve třetí fázi MWM Testu paměti již nebyl vliv prenatalní expozice droze či stresu statisticky významný. Rozhodující parametry pro určení negativního vlivu na učení a paměť, tj. doba latence k nalezení ostrůvku a chyba v hledání, prenatalní droga (MA) a stres (SA) neovlivnily. Dá se tedy vyvodit předpoklad, že i přes sníženou rychlost a kratší uplavanou dráhu, se prenatalně ovlivněná zvířata učila stejně kvalitně jako neovlivněné kontroly. Prenatální expozice MA tak nemusí vést k významnému ovlivnění učení a paměti zvířete, což podporují i některé předchozí preklinické studie (Acuff-Smith *et al.* 1996, Holubová *et al.* 2018a, Hřebíčková *et al.* 2014, Hrubá *et al.* 2010, Schutová *et al.* 2008). Hypotéza zhoršeného učení a prostorové paměti se tak nenaplnila.

Některé předchozí preklinické studie dokonce předpokládají zlepšení prostorové orientace a paměti u dospělých samců laboratorního potkana s expozicí MA *in utero* (Schutová *et al.* 2009a, Šlamberová *et al.* 2014). Oproti naší práci, v těchto studiích dospělí samci potkana našli ostrůvek rychleji, s menší chybou uplavané vzdálenosti od místa ostrůvku a využívaly lepší strategii plavání k nalezení ostrůvku (Šlamberová *et al.* 2014, Schutová *et al.* 2009a). Zlepšení výkonu v testu paměti může být pak díky zvýšení počtu NR1 podjednotek N-metyl-D-aspartát (NMDA) receptorů v hipokampu zvířete po dlouhodobé expozici MA *in utero* (Šlamberová *et al.* 2014). Zvýšený počet NR1 podjednotek daných receptorů pravděpodobně koreluje s lepší dlouhodobou pamětí u dospělých samců laboratorního potkana (Cammarota *et al.* 2000, Le Greves *et al.* 2006).

Některé preklinické studie ukazují na vliv dlouhodobé prenatální aplikace drog na kognitivní funkce, kdy chronická aplikace MA v průběhu gestace může ovlivnit vývoj specifických struktur CNS jako je striatum a hipokampus, které jsou důležité pro učení a paměť (Holubová *et al.* 2018a, McDonald a White 1994, Šlamberová *et al.* 2006). Studie na zvířatech, které se zaměřily na expozici MA *in utero* a její vliv na kognici potomstva, se rozcházejí ve výsledcích, které jsou ovšem závislé na použité metodice. Studie Acuff-Smith *et al.* (1996) se zaměřila na aplikaci MA v různých fázích gestace a zjistila, že vysoká dávka MA (15-20 mg/kg) aplikovaná na začátku gestace způsobuje zhoršení prostorové paměti u laboratorních potkanů pozorovaných v testu MWM. Nízká dávka MA 5-10 mg/kg, která byla podávána i v naší práci (dávka 5 mg/kg), však neměla při použití stejného testu významný vliv na paměť a učení (Acuff-Smith *et al.* 1996, Hřebíčková *et al.* 2014, Hrubá *et al.* 2010, Schutová *et al.* 2008). Výsledky naší práce jsou tedy v souladu s předchozím výzkumem.

Na druhou stranu klinické studie u lidí naznačují, že prenatální expozice MA vede k dlouhodobým kognitivním deficitům (Chang *et al.* 2004, Smith *et al.* 2001). Studie Bayer *et al.* (1993) ukázala, že hipokampus u potkanů se stále vyvíjí během PD 11–20, což by mohlo být analogické s vývojem lidského hipokampu během třetího trimestru těhotenství (Hřebíčková *et al.* 2016). Preklinické a klinické výsledky tedy nelze srovnávat dle období před a po narození daného jedince, ale pouze podle jednotlivých fází vývoje mozkových struktur. Studie autorů Hřebíčková *et al.* (2016) porovnávala vliv prenatální expozice MA během různých fází vývoje mozku laboratorního potkana, tj. v první polovině gestace, druhé polovině gestace a časném neonatálním stadiu, jež mohou být analogické k jednotlivým trimestrům u lidí (Petríková-Hřebíčková *et al.* 2021). Výsledky dané studie ukázaly, že nejzávažnější vliv prenatální drogy na prostorové učení v MWM bylo v poslední sledované fázi vývoje mozku (časné neonatální stádium) (Hřebíčková *et al.* 2016). Výsledky klinických studií zaměřujících se na období gravidity u lidí tedy mohou potvrzovat výsledky preklinických studií z období časně postnatálního u zvířat. Prenatální expozice MA u potkanů neovlivnila učení a paměť ani v jiných preklinických studiích z naší laboratoře (Schutová *et al.* 2009a), časně postnatální expozice MA v dávce 5 mg/kg v období laktace (PD 1-21) však vyvolala poruchy kognitivních funkcí u dospělých samců laboratorního potkana (Hrubá *et al.* 2010). Postnatální expozice MA ve vyšších denních dávkách 10 nebo 15 mg/kg během PD 11–20 také ovlivňuje prostorové učení a paměť u potkanů hodnocených pomocí MWM (Williams *et al.* 2003b). Časné postnatální období tak s ohledem na expozici droze může být



pro kognitivní funkce u potkanů kritičtější než prenatální období. Naše studie však časně postnatální expozici MA u laboratorních potkanů nesledovala (Holubová *et al.* 2018a).

### 6.7.2. Vliv postnatální expozice stresu

Naše výsledky z různých fází testu MWM ukazují, že vliv dlouhodobého časně postnatálního stresu je závislý na typu stresoru. Postnatální stres prostřednictvím mateřské separace (S) výrazně zvýšil některé sledované parametry ve všech třech fázích testu MWM oproti nestresovaným kontrolám (N). Potkani z postnatální skupiny S nacházeli skrytý ostrůvek při učení později a zároveň plavali s výrazně větší chybou v hledání než jejich nestresované kontroly (N). V průběhu testu MWM se pak ukázal významný rozdíl ve sledovaných strategiích tigmotaxe a skenování, kdy zvířata ze skupiny ovlivněné mateřskou separací S a SW daleko častěji hledala ostrůvek metodou tigmotaxe (S>SW) než kontrolní skupina N a skupina ovlivněná fyzikálním stresem W, které upřednostnily strategii skenování. Také předchozí preklinické studie ukazují, že časně postnatální stres může ovlivnit vývoj a funkci mozkových struktur vedoucí ke kognitivním a psychiatrickým poruchám (Aisa *et al.* 2007, Heim a Nemeroff 2001, Holubová *et al.* 2018a;b, Plotsky *et al.* 2005). Studie autorů Aisa *et al.* (2009) uvádí, že časně postnatální stres má dlouhotrvající vliv na hipokampus, který je jednou ze zásadních struktur pro tvorbu dlouhodobé paměti a prostorového učení (Holubová *et al.* 2018a, Mirescu *et al.* 2004, Morris *et al.* 2003). Bylo prokázáno, že hipokampus je snadno ovlivnitelný hormony stresu i během časného vývoje (de Kloet *et al.* 1999). Vývoj granulárních buněk v gyrus dentatus hipokampu potkanů začíná během pozdní embryogeneze a pokračuje během prvních postnatálních týdnů (Altman a Bayer 1990), jako takový může stres způsobený postnatálním stresem ovlivnit normální vývoj hipokampálních struktur (Holubová *et al.* 2018a, Mirescu *et al.* 2004, Orelan *et al.* 2010). Studie Cao *et al.* (2014) se zaměřila na dvě období postnatálně aplikované mateřské separace, tj. PD 2-9 a PD 14-21, a vliv takové expozice na kognitivní funkce v testu MWM. Jejich výsledky naznačují, že největší dopad mateřské separace je právě v druhé fázi období laktace (PD 14-21). Právě toto období může být kritické pro vývoj hipokampu potkanů (Galvan *et al.* 2000, Holubová *et al.* 2018a, Kolb a Gibb 2011). Vztah matky a potomka je pro normální vývoj CNS dětí velmi důležitý. Dle klinické studie Stevenson-Hinde (Stevenson-Hinde 2007) je klíčové období mezi 6 a 18 měsícem života. Postnatální stres prostřednictvím matky tedy může vést k poruše pozornosti, paměti, schopnosti uvažování a zhoršení psychického stavu u dětí (Cao *et al.* 2014). Podle skupiny

autorů Choy *et al.* (2008), pozměněná exprese mozkového neurotrofického faktoru (BDNF) se podílí na etiologii mnoha psychiatrických poruch, včetně schizofrenie, a může vysvětlovat určité kognitivní deficity. Výše uvedená práce zkoumala dlouhodobý účinek raného stresu (prostřednictvím mateřské deprivace) a pozdního stresu (prostřednictvím dlouhodobé léčby stresovými hormony) a kombinace obou těchto stresorů na expresi BDNF v hipokampu dospělých potkanů. Výsledky ukázaly, že laboratorní potkani, kteří byli ovlivněni kombinací raného i pozdního stresoru, měli významně sníženou expresi BDNF v gyrus dentatus hipokampu a zaostávali v testech učení a paměti. Nicméně kognitivní funkce byly také zhoršeny u ostatních dvou skupin exponovaných ranému, nebo pozdnímu stresu (Choy *et al.* 2008, Holubová *et al.* 2018a). Naše předchozí studie také ukázala, že potkani stresovaní prostřednictvím mateřských stresorů (SW) mají narušené udržení pozornosti a snížený přirozený zájem o nové podněty (Holubová *et al.* 2018b).

Časně postnatální stresory, které jsme sledovali, pravděpodobně nestimulovaly neurotoxicitu MA u samců potkana v dospělosti. Některé studie prokázaly, že chronické variabilní stresory zvyšují MA-indukovanou neurotoxicitu (Northrop a Yamamoto 2012, Tata a Yamamoto 2008), stejně jako odezvu na tento psychostimulant (Anderson *et al.* 2019, Matuszewich *et al.* 2014). Tento účinek byl však prokázán pouze u skupin potkanů, které dostávaly akutní injekci ve vysoké dávce MA (7,5 mg/kg) ve srovnání s nestresovanými kontrolami (Matuszewich *et al.* 2014; Anderson *et al.* 2019). Skupina potkanů dostávajících MA v dávce 1 mg/kg, což byla stejná dávka jako v naší současné studii, nevykazovala v předchozí studii žádné rozdíly (Anderson *et al.* 2019). Navíc se zdá, že účinek silně závisí na typech použitých stresorů. Některé předchozí studie prokázaly, že chronický mírný stresor poskytuje určitý ochranný účinek proti striatální astroglióze vyvolané MA a může tak zlepšit některé specifické kognitivní funkce jako je dosažení cíle (Gutierrez *et al.* 2017), zlepšená prostorová paměť v MWM či zlepšená paměť během testu pro poznávání předmětu (Parihar *et al.* 2011). Tyto studie tedy naznačují, že se takto ovlivněná zvířata mohou přizpůsobit následnému vystavení stresu v podobě aplikovaného MA v dospělosti.

### **6.7.3. Vliv akutní aplikace MA**

Aplikace MA v dávce 1 mg/ml byla prováděna v průběhu všech tří fází MWM, každý den vždy po plavání daného jedince. V první fázi Učení bylo ve skupině s aplikací MA v dospělosti patrné rychlejší nalezení ostrůvku s menší chybou uplavané vzdálenosti od ostrůvku v postnatálně stresované skupině S, která bez aplikace MA v dospělosti

vykazovala významně horší výkon než ostatní sledované skupiny. U ostatních skupin N, SW, W nebyl vliv MA v dospělosti významný. Stejně tomu bylo i u parametrů sledujících strategií plavání pro nalezení ostrůvku. Aplikace MA v průběhu MWM u postnatálně stresované skupiny S výrazně snížila plavání tigmotaxí okolo bazénu a naopak zvýšila strategii skenování prostoru s místem ostrůvku. Aplikace této drogy v dospělosti tak zlepšila výkon učení u skupiny negativně ovlivněné mateřskou separací. Tyto výsledky nekorespondují s některými předchozími preklinickými studii s aplikací MA ve stejném rozsahu a stejnou nízkou dávkou jako v naší práci. Konkrétněji v některých preklinických studiích plavali potkani s aplikací MA v dospělosti významně rychleji (Hřebíčková *et al.* 2014, Hřebíčková *et al.* 2016) a uplavaly výrazně delší trať než potkani s aplikací SA v dospělosti (Schutová *et al.* 2009a). Nicméně rozhodující parametry výkonu, tj. chyba v hledání a doba latence, nebyly v daných případech rozdílné. Autoři těchto prací tedy shrnují, že ačkoliv potkani plavali rychleji a uplavali tak delší dráhu, našli ostrůvek ve shodném čase s ostatními skupinami a jejich motivace pro nalezení ostrůvku nebyla postižena (Schutová *et al.* 2009a, Hřebíčková *et al.* 2016). Zároveň mohla být zvýšena jejich rychlost kvůli každodenní aplikaci MA v průběhu celého experimentu (Hřebíčková *et al.* 2016). V některých dalších studiích pak vliv MA v dospělosti nebyl na učení významný (Petríková-Hřebíčková *et al.* 2021), což koresponduje s našimi výsledky u ostatních postnatálně ovlivněných skupin (N, SW, W).

V druhé fázi MWM byl pro vybavení paměti zjištěn vliv aplikace MA v dospělosti pouze u parametrů strategie, kdy droga snížila tigmotaxi u skupiny S a SW a naopak zvýšila strategii skenování místa, kde byl v předchozí fázi MWM umístěn ostrůvek. Vliv aplikace MA v dospělosti se ukázal významný i ve třetí fázi MWM, a to u postnatálních skupin N a S. U nestresovaných kontrol ze skupiny N se po aplikaci MA v průběhu testování snížila chyba v hledání ostrůvku a podařilo se jim nalézt ostrůvek dříve ve srovnání se skupinou N s aplikací SA. Podobně tomu bylo i v postnatální skupině S, která po aplikaci MA plavala s kratší chybně uplavanou vzdáleností od ostrůvku. I v rozdílu zvolených strategií dominoval vliv akutní aplikace MA u postnatálních skupin N a S. Volba strategie tigmotaxe byla snížena (S) a strategie skenování naopak zvýšena (N a S). Ostatní sledované skupiny W a SW nebyly vlivem drogy v dospělosti ovlivněny. Naše výsledky tedy naznačují, že aplikace MA v dospělosti u potkana zlepšuje výkon zaměřující se na prostorovou paměť v testu MWM v závislosti na postnatálním stresoru. Dané výsledky podporují data z předchozí studie s obdobnou metodikou (Hřebíčková *et al.* 2014), kde dospělí potkani s aplikací MA v dospělosti našli ostrůvek dříve s kratší chybně uplavanou vzdáleností od ostrůvku. Navíc

tito potkani volili častěji strategii plavání v blízkosti místa ostrůvku, což také koresponduje s našimi výsledky. Potkani ovlivnění MA v dospělosti si tak pravděpodobně zapamatují místo skrytého ostrůvku daleko rychleji a přesněji (Hřebíčková *et al.* 2014). Některé preklinické studie dále ukazují, že aplikace MA v dospělosti v nižších dávkách (0.1-0.4 mg/kg) zlepšují kognitivní funkce zvířat (Grilly a Loveland 2001, Kornetsky *et al.* 1959). Akutní aplikace MA v dospělosti může do jisté míry zlepšit paměť a pozornost jedince (Chen *et al.* 2012). Také vystavení této drogy v juvenilním věku potkanů zlepšilo jejich prostorovou paměť (Macúchová *et al.* 2013). Podobně i dle některých klinických prací aplikace MA může vést ke zlepšení kognitivních funkcí, což zahrnuje i zlepšení učení a grafické a prostorové paměti (Braren *et al.* 2014). Nicméně chronické užívání této drogy prokazatelně zhoršuje kognici jedince, jak v preklinických (Seminerio *et al.* 2013), tak v klinických studiích (Braren *et al.* 2014, Kamei *et al.* 2006). Zhoršení těchto funkcí je způsobeno hlavně vysokou dávkou MA (>2 mg/kg), která působí degeneraci nervových zakončení v dopaminergním a serotoninergním systému v mozku (Lee *et al.* 2011). V některých dalších preklinických studiích pak vliv MA v dospělosti nebyl na kognitivní funkce významný (Chen *et al.* 2012, Lee *et al.* 2011, Petříková-Hřebíčková *et al.* 2021), ačkoliv lokomoce zvířete může být zvýšena (Lee *et al.* 2011).

Co se týče strategií plavání, ve fázi Učení a „Probe“ testu vyvolala aplikace MA v průběhu testování MWM u skupiny s prenatalní expozicí MA významné snížení hledání ostrůvku pomocí tigmotaxe, a to bez ohledu na postnatální stres. U strategie skenování se však v první ani druhé fázi testu MWM významný rozdíl neukázal. Ve třetí fázi se po aplikaci MA v dospělosti ukázalo významné zvýšení plavání pomocí strategie skenování u skupin prenatalně exponovaných SA i MA, opět bez ohledu na postnatální stres zvířat. Vliv akutní aplikace MA na prenatalně ovlivněné skupiny se však v jiných sledovaných parametrech neukázal. Určitá míra senzitivace vyvolaná prenatalní expozicí MA vůči stejné droze v dospělosti tak byla prokázána, byť pouze na úrovni vybíraných strategií pro nalezení ostrůvku. Některé preklinické studie z naší laboratoře senzitivaci prenatalně MA-ovlivněných zvířat ke stejné droze (MA v dávce 1 mg/kg) v dospělosti prokázaly (Bernášková *et al.* 2011, Šlamberová *et al.* 2008, Šlamberová *et al.* 2011). Také studie Hřebíčková *et al.* (2014) prokázala senzitivaci u potkanů vystavených MA v druhé polovině gestace (GD 12-22), když takto ovlivnění potkani po aplikaci MA v dospělosti našli rychleji ostrůvek a plavali s kratší chybou v hledání ostrůvku. V první polovině gestace se však daný efekt neukázal (Hřebíčková *et al.* 2014). Účinek senzitivace je

pravděpodobně spjat se zvýšenou hladinou DA v nucleus accumbens (Bubeníková-Valešová *et al.* 2009). Většina jiných preklinických studií udávajících senzitivaci psychostimulancií na centrální nervový systém však testovaly tyto účinky po opakovaném přerušovaném podávání drog zvířatům pouze v dospělosti (Nordquist *et al.* 2007, Schoffelmeer *et al.* 2002, Suzuki *et al.* 2004, Vanderschuren *et al.* 2002, Wyvell a Berridge 2001). Studie Williams *et al.* (2003a) pak prokázala zvýšenou hypoaktivitu u zvířat neonatálně léčených MA po opětovné expozici této droze v dospělosti. Tato zjištění tedy naznačují, že specifické adaptivní změny, ke kterým dochází během senzitivace, mohou být ovlivněny obdobím zrání mozku, během kterého k expozici dochází (Schutová *et al.* 2009a). Naše práce však nesledovala specifická období gestace, ani potenciál senzitivace při expozici MA neonatálně.

## 7. Souhrn nejvýznamnějších výsledků

### 7.1. Vliv prenatální expozice MA/stresu

- a) Mateřské chování
  - Prenatální expozice MA/SA narušila chování matek v období laktace (MA>SA).
- b) Parametry mláďat
  - Prenatální expozice MA snížila porodní hmotnost mláďat.
- c) Vývoj mláďat
  - Sensorimotorický vývoj mláďat byl narušen prenatálním působením MA i prenatální stresem.
- d) Sociální hra
  - Prenatální faktory neměly vliv na sociální hru či sociální exploraci dvou neznámých potkanů v juvenilním věku.
- e) Stanovení hladin oxytocinu
  - Prenatální expozice MA zvýšila hladinu oxytocinu u nestresovaných kontrol N.
  - Prenatální MA/SA také pravděpodobně ovlivňuje působení téže drogy na hladinu oxytocinu v juvenilním věku zvířat.
  - Prenatální stres (SA) také významně ovlivňuje následné působení postnatálních stresorů.
- f) Změna chování v dospělosti
  - Prenatální MA/SA neměly významný vliv na úzkostné chování u dospělých samců laboratorního potkana.
- g) Morrisovo vodní bludiště
  - Prenatální expozice MA/SA nevedlo k významnému ovlivnění učení a paměti laboratorního potkana.

### 7.2. Vliv postnatální expozice stresu

- a) Mateřské chování
  - Stresované matky (S, SW, W) strávily více času v kontaktu se svými mláďaty a kojily více v pasivní pozici než matky nestresované (N). Stresované matky (C-S, C-SW, C-W) také odpočívali daleko více než jejich kontroly (C-N), a to s ohledem na prenatální faktory.

- b) Parametry mládřat
  - Mládřata ze skupiny S vykazovala na konci období laktace větší hmotnost než ostatní skupiny.
- c) Vývoj mládřat
  - Postnatální stres (MA-S, MA-SW, MA-W) vedl pravděpodobně ke zvýšené imobilitě potomků na hrazdičce v závislosti na prenatálních faktorech.
- d) Sociální hra
  - Postnatálního stres (S, SW, W) neměl významný vliv na sociální hru juvenilních potkanů.
- e) Stanovení hladin oxytocinu
  - Postnatální stres snížil hladinu oxytocinu (S<SW, W) s ohledem na prenatální faktory. Tento účinek postnatálních stresorů se ukázal pouze u prenatálních kontrol (C) a u skupiny ovlivněné prenatální drogou (MA).
- f) Změna chování v dospělosti
  - Postnatální stresory použité v naší studii snížily míru úzkostného chování v OF a EPM (S>SW, W).
- g) Morrisovo vodní bludiště
  - Časně postnatální stres prostřednictvím mateřské separace (S) významně zhoršil kognitivní funkce v testu MWM. Výkon skupin s jinými stresory byl narušen podstatně méně (S>SW>W).

### 7.3. Vliv akutní aplikace MA

- a) Sociální hra
  - Akutní aplikace MA před samotným testem výrazně utlumila sociální hru i sociální exploraci páru zvířat bez ohledu na perinatální faktory.
- b) Stanovení hladin oxytocinu
  - Akutní aplikace MA před odběrem zvýšila hladinu plazmatického oxytocinu u juvenilních samic laboratorního potkana. Tento efekt byl však pozorován pouze u prenatálních kontrol (C), tedy u potkanů bez expozice prenatální drogy či stresu.
- c) Změna chování v dospělosti
  - Podaná akutní droga v dospělosti významně snížila úzkostné chování hodnocené v OF a EPM. Skupina potkanů vystavená časně postnatálně sociálnímu stresoru prostřednictvím mateřské separace (S) neukázala po aplikaci MA významné

snížení v čase stráveném v centrálním kruhu či v rozích OF v porovnání s akutní SA skupinou. Bazální úroveň těchto parametrů u tohoto sociálního stresoru (S) však byly výrazně sníženy již před aplikací MA v dospělosti.

d) Morrisovo vodní bludiště

- Aplikace MA v průběhu testu MWM zlepšuje výkon zaměřující se na učení a paměť, a to v závislosti na postnatálním stresoru. Po aplikaci MA v dospělosti byly zhoršené učení a paměť v postnatální skupině S významně zlepšeny. Výkon skupin s jinými stresory byl zlepšen podstatně méně ( $S > SW > W$ ).



## 8. Závěr

Naše výsledky potvrdily hypotézu, že kombinace prenatalního MA/stresu a mateřských postnatálních stresorů narušuje mateřské chování a časný senzomotorický vývoj mláďat. Zdá se ovšem, že rozhodujícím faktorem je v těchto případech expozice MA během gestace. Pokud je nám známo, do této doby žádná jiná preklinická studie nesledovala kombinaci těchto faktorů na chování matek a vývoj mláďat.

Prenatální expozice droze či stresu v naší studii neměla vliv na sociální hru či sociální exploraci dvou neznámých potkanů v juvenilním věku. Také u postnatálního stresu, bez rozdílu typu stresoru, se neukázal významný vliv na sociální hru juvenilních potkanů. Naše hypotéza tedy nebyla potvrzena. Nicméně akutní droga 45 minut před samotným testem výrazně utlumila sociální chování, ať už sociální hru či sociální exploraci páru zvířat. Samice laboratorního potkana byly při sociální hře významně aktivnější ve srovnání se samci.

Námi použité perinatální faktory mohou ovlivnit sekreci plazmatického oxytocinu u juvenilních samic laboratorního potkana zcela odlišně. Zatímco výsledky časně postnatálních stresorů podporují naši hypotézu ve snížení sekrece oxytocinu, mírný prenatalní stres může tomuto efektu předejít. Stejně tak může předejít i stimulačnímu účinku akutní jednorázové dávky MA. Aplikace akutního MA stimulovala basální hladinu plazmatického oxytocinu pouze u prenatalních kontrol. Naše data tedy poukazují na významnou modulární roli mírného prenatalního stresoru, zde prostřednictvím každodenní injekční aplikace (s.c.) SA, a to v případě odpovědi oxytocinu na postnatální stres nebo na akutní drogu (MA) v dospělosti. Tato studie je rovněž unikátní ve svém zaměření na plazmatické hladiny oxytocinu po prenatalní aplikaci MA. Menší počet studií zaměřující se na problematiku oxytocinu komplikuje také nesnadná analýza samotného hormonu v laboratoři. Pro potvrzení a doplnění našich závěrů je zapotřebí větší množství poznatků s ohledem na mechanismus účinku či rozdíly mezi oběma pohlavími. Další studie jsou třeba k objasnění rozdílů v odpovědi periferního a centrálního oxytocinu.

Stres může být adaptivní nebo maladaptivní, což záleží na druhu, intenzitě a délce expozice. Oproti naší pracovní hypotéze, prenatalní faktory neovlivnily chování dospělých potkanů. Naše výsledky dále ukazují, že časně postnatální stres, podobně jako jednorázové použití MA v dospělosti, může dokonce snižovat míru úzkostného chování u dospělých samic laboratorního potkana bez ohledu na prenatalní vlivy. Nicméně účinek akutně podané drogy v dospělosti je závislý na typu aplikovaného postnatálního stresoru, zejména na mateřské

separaci. Vystavení prenatalnímu stresu či droze pak může vyvolat změny v explorativním chování na nové prostředí u laboratorních potkanů v dospělosti.

Co se týče kognitivních funkcí, prenatalní expozice MA či stresu nemusí vést k významnému ovlivnění učení a paměti zvířete, jak se ukázalo v testu MWM. Naopak tomu je u časného postnatálního stresoru prostřednictvím mateřské separace, který kognitivní funkce významně zhoršuje. Naše hypotéza se tak částečně potvrdila. Časný postnatální stres se tedy zdá být pro kognitivní funkce důležitější než prenatalní faktory, jako je expozice MA či stresu během gestace. Důležité je také zdůraznit, že dle našich výsledků by škodlivé účinky raného postnatálního stresu na učení a paměť mohly mít významný vliv až do dospělosti. Naše výsledky dále naznačují, že aplikace MA v průběhu testování zlepšuje výkon zaměřující se na učení a paměť, a to právě v závislosti na postnatálním stresoru. Zhoršené kognitivní funkce u skupiny ovlivněné mateřskou separací byly po aplikaci MA významně zlepšeny.

Problém týkající se drogově závislých těhotných žen je alarmujícím problémem naší společnosti. Je nutné si uvědomit, že tyto ženy neubližují pouze sami sobě, ale ohrožují zdraví a vývoj svých dětí. Už jen samotné injekční podání vysoce rizikových uživatelů drog a dále pak jejich chování po porodu může kriticky ovlivnit další vývoj jejich potomků. Preklinický výzkum této problematiky je nezbytný pro poznání míry tohoto poškození a nalezení nových možností pro jeho zmírnění. Ačkoliv i zde platí, že nejlepší terapie, je prevence (Holubová a Šlamberová 2017).

## 9. Reference

1. Abrines, N., Barcons, N., Marre, D., Brun, C., Fornieles, A., Fumado, V. (2012). ADHD-like symptoms and attachment in internationally adopted children. *Attach Hum Dev.* 14, 405-423.
2. Achterberg, E.J., Trezza, V., Siviyy, S.M., Schrama, L., Schoffelmeer, A.N., Vanderschuren, L.J. (2014). Amphetamine and cocaine suppress social play behavior in rats through distinct mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*. 231, 1503-1515.
3. Achterberg, E.J., Van Kerkhof, L.W., Servadio, M., Van Swieten, M.M., Houwing, D.J., Aalderink, M., Driel, N.V., Trezza, V., Vanderschuren, L.J. (2016). Contrasting Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Motivational Properties of Social Play Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology*. 41, 858-868.
4. Acuff-Smith, K.D., George, M., Lorens, S.A., Vorhees, C.V. (1992). Preliminary evidence for methamphetamine-induced behavioral and ocular effects in rat offspring following exposure during early organogenesis. *Psychopharmacology (Berl)*. 109, 255-263.
5. Acuff-Smith, K.D., Schilling, M.A., Fisher, J.E., Vorhees, C.V. (1996). Stage-specific effects of prenatal d-methamphetamine exposure on behavioral and eye development in rats. *Neurotoxicol Teratol*. 18, 199-215.
6. Aisa, B., Elizalde, N., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J. (2009). Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus*. 19, 1222-1231.
7. Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., Ramirez, M.J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 32, 256-266.
8. Alonso, S.J., Arevalo, R., Afonso, D., Rodriguez, M. (1991). Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiol Behav*. 50, 511-517.
9. Altman, J., Bayer, S.A. (1990). Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*. 301, 365-381.

10. Altman, J., Sudarshan, K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav.* 23, 896-920.
11. Anderson, E.M., Mcfadden, L.M., Matuszewich, L. (2019). Interaction of stress and stimulants in female rats: Role of chronic stress on later reactivity to methamphetamine. *Behav Brain Res.* 376, 112176.
12. Anglin, M.D., Burke, C., Perrochet, B., Stamper, E., Dawud-Noursi, S. (2000). History of the methamphetamine problem. *J Psychoactive Drugs.* 32, 137-141.
13. Antonelli, M.C., Pallares, M.E., Ceccatelli, S., Spulber, S. (2017). Long-term consequences of prenatal stress and neurotoxicants exposure on neurodevelopment. *Prog Neurobiol.* 155, 21-35.
14. Arnold, J.L., Siviy, S.M. (2002). Effects of neonatal handling and maternal separation on rough-and-tumble play in the rat. *Dev Psychobiol.* 41, 205-215.
15. Arria, A.M., Derauf, C., Lagasse, L.L., Grant, P., Shah, R., Smith, L., Haning, W., Huestis, M., Strauss, A., Della Grotta, S., Liu, J., Lester, B. (2006). Methamphetamine and other substance use during pregnancy: preliminary estimates from the Infant Development, Environment, and Lifestyle (IDEAL) study. *Matern Child Health J.* 10, 293-302.
16. Aston-Jones, G., Cohen, J.D. (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: adaptive gain and optimal performance. *Annu Rev Neurosci.* 28, 403-450.
17. Babb, J.A., Carini, L.M., Spears, S.L., Nephew, B.C. (2014). Transgenerational effects of social stress on social behavior, corticosterone, oxytocin, and prolactin in rats. *Horm Behav.* 65, 386-393.
18. Babicola, L., Ventura, R., D'addario, S.L., Ielpo, D., Andolina, D., Di Segni, M. (2021). Long term effects of early life stress on HPA circuit in rodent models. *Mol Cell Endocrinol.* 521, 111125.
19. Baes, C., Martins, C.M., Tofoli, S.M., Juruena, M.F. (2014). Early Life Stress in Depressive Patients: HPA Axis Response to GR and MR Agonist. *Front Psychiatry.* 5, 2.
20. Bagner, D.M., Sheinkopf, S.J., Miller-Loncar, C., Lagasse, L.L., Lester, B.M., Liu, J., Bauer, C.R., Shankaran, S., Bada, H., Das, A. (2009). The effect of parenting stress on child behavior problems in high-risk children with prenatal drug exposure. *Child Psychiatry Hum Dev.* 40, 73-84.

21. Baracz, S.J., Cornish, J.L. (2016). The neurocircuitry involved in oxytocin modulation of methamphetamine addiction. *Front Neuroendocrinol.* 43, 1-18.
22. Baracz, S.J., Parker, L.M., Suraev, A.S., Everett, N.A., Goodchild, A.K., McGregor, I.S., Cornish, J.L. (2016). Chronic Methamphetamine Self-Administration Dysregulates Oxytocin Plasma Levels and Oxytocin Receptor Fibre Density in the Nucleus Accumbens Core and Subthalamic Nucleus of the Rat. *J Neuroendocrinol.* 28.
23. Barr, A.M., Panenka, W.J., Macewan, G.W., Thornton, A.E., Lang, D.J., Honer, W.G., Lecomte, T. (2006). The need for speed: an update on methamphetamine addiction. *J Psychiatry Neurosci.* 31, 301-313.
24. Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology.* 14, 83-144.
25. Berman, S., O'Neill, J., Fears, S., Bartzokis, G., London, E.D. (2008). Abuse of amphetamines and structural abnormalities in the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1141, 195-220.
26. Bernášková, K., Matějovská, I., Šlamberová, R. (2011). Postnatal challenge dose of methamphetamine amplifies anticonvulsant effects of prenatal methamphetamine exposure on epileptiform activity induced by electrical stimulation in adult male rats. *Exp Neurol.* 229, 282-287.
27. Bhatnagar, S., Meaney, M.J. (1995). Hypothalamic-pituitary-adrenal function in chronic intermittently cold-stressed neonatally handled and non handled rats. *J Neuroendocrinol.* 7, 97-108.
28. Billing, L., Eriksson, M., Jonsson, B., Steneroth, G., Zetterstrom, R. (1994). The influence of environmental factors on behavioural problems in 8-year-old children exposed to amphetamine during fetal life. *Child Abuse Negl.* 18, 3-9.
29. Billing, L., Eriksson, M., Larsson, G., Zetterstrom, R. (1980). Amphetamine addiction and pregnancy. III. One year follow-up of the children. Psychosocial and pediatric aspects. *Acta Paediatr Scand.* 69, 675-680.
30. Billing, L., Eriksson, M., Steneroth, G., Zetterstrom, R. (1988). Predictive indicators for adjustment in 4-year-old children whose mothers used amphetamine during pregnancy. *Child Abuse Negl.* 12, 503-507.
31. Bittner, S.E., Wagner, G.C., Aigner, T.G., Seiden, L.S. (1981). Effects of a high-dose treatment of methamphetamine on caudate dopamine and anorexia in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 14, 481-486.

32. Bolton, J.L., Short, A.K., Simeone, K.A., Daghlian, J., Baram, T.Z. (2019). Programming of Stress-Sensitive Neurons and Circuits by Early-Life Experiences. *Front Behav Neurosci.* 13, 30.
33. Borges-Aguiar, A.C., Schaffer, L.Z., De Kloet, E.R., Schenberg, L.C. (2018). Daily maternal separations during stress hyporesponsive period decrease the thresholds of panic-like behaviors to electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray of the adult rat. *Behav Brain Res.* 344, 132-144.
34. Branchi, I., Santarelli, S., D'andrea, I., Alleva, E. (2013). Not all stressors are equal: early social enrichment favors resilience to social but not physical stress in male mice. *Horm Behav.* 63, 503-509.
35. Braren, S.H., Drapala, D., Tulloch, I.K., Serrano, P.A. (2014). Methamphetamine-induced short-term increase and long-term decrease in spatial working memory affects protein Kinase M zeta (PKMzeta), dopamine, and glutamate receptors. *Front Behav Neurosci.* 8, 438.
36. Bubeníková-Valešová, V., Kačer, P., Syslová, K., Rambousek, L., Janovsky, M., Schutová, B., Hrubá, L., Šlamberová, R. (2009). Prenatal methamphetamine exposure affects the mesolimbic dopaminergic system and behavior in adult offspring. *Int J Dev Neurosci.* 27, 525-530.
37. Cadet, J.L., Brannock, C., Ladenheim, B., McCoy, M.T., Krasnova, I.N., Lehrmann, E., Becker, K.G., Jayanthi, S. (2014). Enhanced upregulation of CRH mRNA expression in the nucleus accumbens of male rats after a second injection of methamphetamine given thirty days later. *PLoS One.* 9, e84665.
38. Caldji, C., Diorio, J., Meaney, M.J. (2000). Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry.* 48, 1164-1174.
39. Cammarota, M., De Stein, M.L., Paratcha, G., Bevilacqua, L.R., Izquierdo, I., Medina, J.H. (2000). Rapid and transient learning-associated increase in NMDA NR1 subunit in the rat hippocampus. *Neurochem Res.* 25, 567-572.
40. Cao, X., Huang, S., Cao, J., Chen, T., Zhu, P., Zhu, R., Su, P., Ruan, D. (2014). The timing of maternal separation affects morris water maze performance and long-term potentiation in male rats. *Dev Psychobiol.* 56, 1102-1109.
41. Cernerud, L., Eriksson, M., Jonsson, B., Steneroth, G., Zetterstrom, R. (1996). Amphetamine addiction during pregnancy: 14-year follow-up of growth and school performance. *Acta Paediatr.* 85, 204-208.

42. Chang, L., Cloak, C., Patterson, K., Grob, C., Miller, E.N., Ernst, T. (2005). Enlarged striatum in abstinent methamphetamine abusers: a possible compensatory response. *Biol Psychiatry*. 57, 967-974.
43. Chang, L., Smith, L.M., Lopresti, C., Yonekura, M.L., Kuo, J., Walot, I., Ernst, T. (2004). Smaller subcortical volumes and cognitive deficits in children with prenatal methamphetamine exposure. *Psychiatry Res*. 132, 95-106.
44. Chen, Y.J., Liu, Y.L., Zhong, Q., Yu, Y.F., Su, H.L., Toque, H.A., Dang, Y.H., Chen, F., Xu, M., Chen, T. (2012). Tetrahydropalmatine protects against methamphetamine-induced spatial learning and memory impairment in mice. *Neurosci Bull*. 28, 222-232.
45. Cho, A.K., Melega, W.P. (2002). Patterns of methamphetamine abuse and their consequences. *J Addict Dis*. 21, 21-34.
46. Choy, K.H., De Visser, Y., Nichols, N.R., Van Den Buuse, M. (2008). Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. *Hippocampus*. 18, 655-667.
47. Courtney, K.E., Ray, L.A. (2014). Methamphetamine: an update on epidemiology, pharmacology, clinical phenomenology, and treatment literature. *Drug Alcohol Depend*. 143, 11-21.
48. Cruickshank, C.C., Dyer, K.R. (2009). A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*. 104, 1085-1099.
49. Darke, S., Kaye, S., Mcketin, R., Dufrou, J. (2008). Major physical and psychological harms of methamphetamine use. *Drug Alcohol Rev*. 27, 253-262.
50. Daskalakis, N.P., Bagot, R.C., Parker, K.J., Vinkers, C.H., De Kloet, E.R. (2013). The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology*. 38, 1858-1873.
51. Daskalakis, N.P., Claessens, S.E., Laboyrie, J.J., Enthoven, L., Oitzl, M.S., Champagne, D.L., De Kloet, E.R. (2011). The newborn rat's stress system readily habituates to repeated and prolonged maternal separation, while continuing to respond to stressors in context dependent fashion. *Horm Behav*. 60, 165-176.
52. Dattel, B.J. (1990). Substance abuse in pregnancy. *Semin Perinatol*. 14, 179-187.
53. Davidson, C., Gow, A.J., Lee, T.H., Ellinwood, E.H. (2001). Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Brain Res Rev*. 36, 1-22.

54. De Kloet, E.R., Joels, M., Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 6, 463-475.
55. De Kloet, E.R., Oitzl, M.S., Joels, M. (1999). Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci.* 22, 422-426.
56. De Melo, S.R., De David Antoniazzi, C.T., Hossain, S., Kolb, B. (2018). Neonatal Stress Has a Long-Lasting Sex-Dependent Effect on Anxiety-Like Behavior and Neuronal Morphology in the Prefrontal Cortex and Hippocampus. *Dev Neurosci.* 40, 93-103.
57. De Souza, M.A., Centenaro, L.A., Menegotto, P.R., Henriques, T.P., Bonini, J., Achaval, M., Lucion, A.B. (2013). Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats. *Neurochem Res.* 38, 1479-1489.
58. Derauf, C., Katz, A.R., Frank, D.A., Grandinetti, A., Easa, D. (2003). The prevalence of methamphetamine and other drug use during pregnancy in Hawaii. *J Drug Issues.* 33, 1001–1016.
59. Derauf, C., Lagasse, L.L., Smith, L.M., Grant, P., Shah, R., Arria, A., Huestis, M., Haning, W., Strauss, A., Della Grotta, S., Liu, J., Lester, B.M. (2007). Demographic and psychosocial characteristics of mothers using methamphetamine during pregnancy: preliminary results of the infant development, environment, and lifestyle study (IDEAL). *Am J Drug Alcohol Abuse.* 33, 281-289.
60. Dhabhar, F.S., Mcewen, B.S., Spencer, R.L. (1997). Adaptation to prolonged or repeated stress--comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology.* 65, 360-368.
61. Di Segni, M., Andolina, D., D'addario, S.L., Babicola, L., Ielpo, D., Luchetti, A., Pascucci, T., Lo Iacono, L., D'amato, F.R., Ventura, R. (2019). Sex-dependent effects of early unstable post-natal environment on response to positive and negative stimuli in adult mice. *Neuroscience.* 413, 1-10.
62. Di Segni, M., Andolina, D., Luchetti, A., Babicola, L., D'apolito, L.I., Pascucci, T., Conversi, D., Accoto, A., D'amato, F.R., Ventura, R. (2016). Unstable Maternal Environment Affects Stress Response in Adult Mice in a Genotype-Dependent Manner. *Cereb Cortex.* 26, 4370-4380.
63. Diaz, S.D., Smith, L.M., Lagasse, L.L., Derauf, C., Newman, E., Shah, R., Arria, A., Huestis, M.A., Della Grotta, S., Dansereau, L.M., Neal, C., Lester, B.M. (2014).



- Effects of prenatal methamphetamine exposure on behavioral and cognitive findings at 7.5 years of age. *J Pediatr.* 164, 1333-1338.
64. Drago, F., Di Leo, F., Giardina, L. (1999). Prenatal stress induces body weight deficit and behavioural alterations in rats: the effect of diazepam. *Eur Neuropsychopharmacol.* 9, 239-245.
  65. Driscoll, C.A., Barr, C.S. (2016). Studying longitudinal trajectories in animal models of psychiatric illness and their translation to the human condition. *Neurosci Res.* 102, 67-77.
  66. Eagle, A.L., Fitzpatrick, C.J., Perrine, S.A. (2013). Single prolonged stress impairs social and object novelty recognition in rats. *Behav Brain Res.* 256, 591-597.
  67. EMCDDA, Europol. (2019). Methamphetamine in Europe, EMCDDA-Europol Threat Assessment. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
  68. EMCDDA. (2016). European Drug Report 2016: Trends and Developments. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
  69. EMCDDA. (2021). Evropská zpráva o drogách 2021: Trendy a vývoj. Úřad pro publikace Evropské unie, Lucemburk.
  70. Eriksson, M., Zetterstrom, R. (1994). Amphetamine addiction during pregnancy: 10-year follow-up. *Acta Paediatr Suppl.* 404, 27-31.
  71. Estelles, J., Rodriguez-Arias, M., Maldonado, C., Aguilar, M.A., Minarro, J. (2006). Gestational exposure to cocaine alters cocaine reward. *Behav Pharmacol.* 17, 509-515.
  72. Field, T. (1998). Maternal depression effects on infants and early interventions. *Prev Med.* 27, 200-203.
  73. File, S.E., Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol.* 463, 35-53.
  74. Friedman, J.M. (2011). Leptin and the regulation of body weigh. *Keio J Med.* 60, 1-9.
  75. Fuentes, S., Daviu, N., Gagliano, H., Belda, X., Armario, A., Nadal, R. (2018). Early life stress in rats sex-dependently affects remote endocrine rather than behavioral consequences of adult exposure to contextual fear conditioning. *Horm Behav.* 103, 7-18.
  76. Galvan, C.D., Hrachovy, R.A., Smith, K.L., Swann, J.W. (2000). Blockade of neuronal activity during hippocampal development produces a chronic focal epilepsy in the rat. *J Neurosci.* 20, 2904-2916.
  77. Georgiou, P., Zanos, P., Garcia-Carmona, J.A., Hourani, S., Kitchen, I., Laorden, M.L., Bailey, A. (2016). Methamphetamine abstinence induces changes in mu-opioid

- receptor, oxytocin and CRF systems: Association with an anxiogenic phenotype. *Neuropharmacology*. 105, 520-532.
78. Good, M.M., Solt, I., Acuna, J.G., Rotmensch, S., Kim, M.J. (2010). Methamphetamine use during pregnancy: maternal and neonatal implications. *Obstet Gynecol*. 116, 330-334.
  79. Grewen, K.M., Light, K.C. (2011). Plasma oxytocin is related to lower cardiovascular and sympathetic reactivity to stress. *Biol Psychol*. 87, 340-349.
  80. Griffiths, P., Mravcik, V., Lopez, D., Klempova, D. (2008). Quite a lot of smoke but very limited fire--the use of methamphetamine in Europe. *Drug Alcohol Rev*. 27, 236-242.
  81. Grilly, D.M., Loveland, A. (2001). What is a "low dose" of d-amphetamine for inducing behavioral effects in laboratory rats? *Psychopharmacology (Berl)*. 153, 155-169.
  82. Grissom, N., Bhatnagar, S. (2009). Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem*. 92, 215-224.
  83. Gutierrez, A., Jablonski, S.A., Amos-Kroohs, R.M., Barnes, A.C., Williams, M.T., Vorhees, C.V. (2017). Effects of Housing on Methamphetamine-Induced Neurotoxicity and Spatial Learning and Memory. *ACS Chem Neurosci*. 8, 1479-1489.
  84. Hart, C.L., Gunderson, E.W., Perez, A., Kirkpatrick, M.G., Thurmond, A., Comer, S.D., Foltin, R.W. (2008). Acute physiological and behavioral effects of intranasal methamphetamine in humans. *Neuropsychopharmacology*. 33, 1847-1855.
  85. Heim, C., Nemeroff, C.B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*. 49, 1023-1039.
  86. Heim, C., Nemeroff, C.B. (2002). Neurobiology of early life stress: clinical studies. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 7, 147-159.
  87. Herbert, C.E., Hughes, R.N. (2009). A comparison of 1-benzylpiperazine and methamphetamine in their acute effects on anxiety-related behavior of hooded rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 92, 243-250.
  88. Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Cullinan, W.E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 24, 151-180.

89. Hermens, D.F., Lubman, D.I., Ward, P.B., Naismith, S.L., Hickie, I.B. (2009). Amphetamine psychosis: a model for studying the onset and course of psychosis. *Med J Aust.* 190, S22-25.
90. Holson, R.R., Pearce, B. (1992). Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol Teratol.* 14, 221-228.
91. Holubová-Kroupová, A., Šlamberová, R. (2021). Perinatal stress and methamphetamine exposure decreases anxiety-like behavior in adult male rats. *Front Behav Neurosci.* 15, 648780.
92. Holubová, A., Šlamberová, R. (2017). Drogová závislost a perinatální stres. *Cesk fysiolog.* 66, 46-51.
93. Holubová, A., Lukášková, I., Tomášová, N., Šuhajdová, M., Šlamberová, R. (2018a). Early postnatal stress impair cognitive functions of affected male rats persisting until adulthood. *Front Behav Neurosci.* 12, 176.
94. Holubová, A., Mikulecká, A., Pometlová, M., Nohejlová, K., Šlamberová, R. (2018b). Long-term early life adverse experience impairs responsiveness to exteroceptive stimuli in adult rats. *Behav Process.* 149, 59-64.
95. Holubová, A., Poništ, S., Jurčovičová, J., Šlamberová, R. (2019). Different oxytocin response to acute metamphetamine treatment in juvenile female rats perinatally exposed to stress and/or metamphetamine administration. *Front Physiol.* 10, 305.
96. Holubová, A., Ševčíková, M., Macúchová, E., Hřebíčková, I., Pometlová, M., Šlamberová, R. (2017). Effects of perinatal stress and drug abuse on maternal behavior and sensorimotor development of affected progeny. *Physiol Res.* 66 Suppl 4, 481-491.
97. Holubová, A., Štofková, A., Jurčovičová, J., Šlamberová, R. (2016). The effect of neonatal maternal stress on plasma levels of ACTH, corticosterone, leptin, and ghrelin in adult male rats exposed to acute heterotypic stressor. *Physiol Res.* 65 Suppl 5, 557-566.
98. Hřebíčková, I., Malinová-Ševčíková, M., Macúchová, E., Nohejlová, K., Šlamberová, R. (2014). Exposure to methamphetamine during first and second half of prenatal period and its consequences on cognition after long-term application in adulthood. *Physiol Res.* 63, 535-545.
99. Hřebíčková, I., Ševčíková, M., Macúchová, E., Šlamberová, R. (2017). How methamphetamine exposure during different neurodevelopmental stages affects social behavior of adult rats? *Physiol Behav.* 179, 391-400.

100. Hřebíčková, I., Ševčíková, M., Nohejlová, K., Šlamberová, R. (2016). Does effect from developmental methamphetamine exposure on spatial learning and memory depend on stage of neuroontogeny? *Physiol Res.* 65, 577-589.
101. Hrubá, L., Schutová, B., Šlamberová, R. (2012). Sex differences in anxiety-like behavior and locomotor activity following prenatal and postnatal methamphetamine exposure in adult rats. *Physiol Behav.* 105, 364-370.
102. Hrubá, L., Schutová, B., Pometlová, M., Rokyta, R., Šlamberová, R. (2010). Effect of methamphetamine exposure and cross-fostering on cognitive function in adult male rats. *Behav Brain Res.* 208, 63-71.
103. Hrubá, L., Schutová, B., Šlamberová, R., Pometlová, M., Rokyta, R. (2009). Effect of methamphetamine exposure and cross-fostering on sensorimotor development of male and female rat pups. *Dev Psychobiol.* 51, 73-83.
104. Hulshof, H.J., Novati, A., Sgoifo, A., Luiten, P.G., Den Boer, J.A., Meerlo, P. (2011). Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res.* 216, 552-560.
105. Huot, R.L., Gonzalez, M.E., Ladd, C.O., Thirivikraman, K.V., Plotsky, P.M. (2004). Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology.* 29, 279-289.
106. Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H., Mcnamara, R.K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.* 950, 52-63.
107. Jahn, G.A., Rastrilla, A.M., Deis, R.P. (1993). Correlation of growth hormone secretion during pregnancy with circulating prolactin in rats. *J Reprod Fertil.* 98, 327-333.
108. Jin, F., Li, L., Shi, M., Li, Z., Zhou, J., Chen, L. (2013). The longitudinal study of rat hippocampus influenced by stress: early adverse experience enhances hippocampal vulnerability and working memory deficit in adult rats. *Behav Brain Res.* 246, 116-124.
109. Jin, S., Zhao, Y., Jiang, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, D., Lian, B., Du, Z., Sun, H., Sun, L. (2018). Anxiety-like behaviour assessments of adolescent rats after repeated maternal separation during early life. *Neuroreport.* 29, 643-649.
110. Johnson, J.L., Leff, M. (1999). Children of substance abusers: overview of research findings. *Pediatrics.* 103, 1085-1099.

111. Juruena, M.F., Eror, F., Cleare, A.J., Young, A.H. (2020). The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. *Adv Exp Med Biol.* 1191, 141-153.
112. Kamei, H., Nagai, T., Nakano, H., Togan, Y., Takayanagi, M., Takahashi, K., Kobayashi, K., Yoshida, S., Maeda, K., Takuma, K., Nabeshima, T., Yamada, K. (2006). Repeated methamphetamine treatment impairs recognition memory through a failure of novelty-induced ERK1/2 activation in the prefrontal cortex of mice. *Biol Psychiatry.* 59, 75-84.
113. Kelley, S.J. (1998). Stress and coping behaviors of substance-abusing mothers. *J Soc Pediatr Nurs.* 3, 103-110.
114. Kentrop, J., Smid, C.R., Achterberg, E.J.M., Van, I.M.H., Bakermans-Kranenburg, M.J., Joels, M., Van Der Veen, R. (2018). Effects of Maternal Deprivation and Complex Housing on Rat Social Behavior in Adolescence and Adulthood. *Front Behav Neurosci.* 12, 193.
115. Kittirattanapaiboon, P., Srikosai, S., Wittayanookulluk, A. (2017). Methamphetamine use and dependence in vulnerable female populations. *Curr Opin Psychiatry.* 30, 247-252.
116. Knechtle, B., Waskiewicz, Z., Sousa, C.V., Hill, L., Nikolaidis, P.T. (2020). Cold Water Swimming-Benefits and Risks: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health.* 17.
117. Kolb, B., Gibb, R. (2011). Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 20, 265-276.
118. Koob, G.F., Ahmed, S.H., Boutrel, B., Chen, S.A., Kenny, P.J., Markou, A., O'dell, L.E., Parsons, L.H., Sanna, P.P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev.* 27, 739-749.
119. Kornetsky, C., Mirsky, A.F., Kessler, E.K., Dorff, J.E. (1959). The effects of dextro-amphetamine on behavioral deficits produced by sleep loss in humans. *J Pharmacol Exp Ther.* 127, 46-50.
120. Ladd, C.O., Huot, R.L., Thirivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Plotsky, P.M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biol Psychiatry.* 55, 367-375.
121. Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G., Torner, L. (2012). Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal

- corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology*. 37, 410-420.
122. Le Greves, M., Zhou, Q., Berg, M., Le Greves, P., Fholenhag, K., Meyerson, B., Nyberg, F. (2006). Growth hormone replacement in hypophysectomized rats affects spatial performance and hippocampal levels of NMDA receptor subunit and PSD-95 gene transcript levels. *Exp Brain Res*. 173, 267-273.
  123. Lee, H.J., Macbeth, A.H., Pagani, J.H., Young, W.S., 3rd. (2009). Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol*. 88, 127-151.
  124. Lee, K.W., Kim, H.C., Lee, S.Y., Jang, C.G. (2011). Methamphetamine-sensitized mice are accompanied by memory impairment and reduction of N-methyl-d-aspartate receptor ligand binding in the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*. 178, 101-107.
  125. Leon Rodriguez, D.A., Duenas, Z. (2013). Maternal Separation during Breastfeeding Induces Gender-Dependent Changes in Anxiety and the GABA-A Receptor Alpha-Subunit in Adult Wistar Rats. *PLoS One*. 8, e68010.
  126. Lijffijt, M., Hu, K., Swann, A.C. (2014). Stress modulates illness-course of substance use disorders: a translational review. *Front Psychiatry*. 5, 83.
  127. Liles, B.D., Newman, E., Lagasse, L.L., Derauf, C., Shah, R., Smith, L.M., Arria, A.M., Huestis, M.A., Haning, W., Strauss, A., Dellagrotta, S., Dansereau, L.M., Neal, C., Lester, B.M. (2012). Perceived child behavior problems, parenting stress, and maternal depressive symptoms among prenatal methamphetamine users. *Child Psychiatry Hum Dev*. 43, 943-957.
  128. Little, B.B., Snell, L.M., Gilstrap, L.C., 3rd. (1988). Methamphetamine abuse during pregnancy: outcome and fetal effects. *Obstet Gynecol*. 72, 541-544.
  129. Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol*. 12, 5-12.
  130. Llorente, R., Miguel-Blanco, C., Aisa, B., Lachize, S., Borcel, E., Meijer, O.C., Ramirez, M.J., De Kloet, E.R., Viveros, M.P. (2011). Long term sex-dependent psychoneuroendocrine effects of maternal deprivation and juvenile unpredictable stress in rats. *J Neuroendocrinol*. 23, 329-344.
  131. Logan, B.K. (2002). Methamphetamine - Effects on Human Performance and Behavior. *Forensic Sci Rev*. 14, 133-151.

132. Lundberg, S., Martinsson, M., Nylander, I., Roman, E. (2017). Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Horm Behav.* 87, 137-144.
133. Macúchová, E., Nohejlová-Deykun, K., Šlamberová, R. (2013). Effect of methamphetamine on cognitive functions of adult female rats prenatally exposed to the same drug. *Physiol Res.* 62, 89-98.
134. Macúchová, E., Nohejlová, K., Ševčíková, M., Hřebíčková, I., Šlamberová, R. (2017). Sex differences in the strategies of spatial learning in prenatally-exposed rats treated with various drugs in adulthood. *Behav Brain Res.* 327, 83-93.
135. Macúchová, E., Ševčíková, M., Hřebíčková, I., Nohejlová, K., Šlamberová, R. (2016). How various drugs affect anxiety-related behavior in male and female rats prenatally exposed to methamphetamine. *Int J Dev Neurosci.* 51, 1-11.
136. Malinová-Ševčíková, M., Hřebíčková, I., Macúchová, E., Nová, E., Pometlová, M., Šlamberová, R. (2014). Differences in maternal behavior and development of their pups depend on the time of methamphetamine exposure during gestation period. *Physiol Res.* 63 Suppl 4, 559-572.
137. Manduca, A., Campolongo, P., Palmery, M., Vanderschuren, L.J., Cuomo, V., Trezza, V. (2014). Social play behavior, ultrasonic vocalizations and their modulation by morphine and amphetamine in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl).* 231, 1661-1673.
138. Marais, L., Van Rensburg, S.J., Van Zyl, J.M., Stein, D.J., Daniels, W.M. (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res.* 61, 106-112.
139. Martin, J.C. (1975). Effects on offspring of chronic maternal methamphetamine exposure. *Dev Psychobiol.* 8, 397-404.
140. Martin, J.C., Martin, D.C., Radow, B., Sigman, G. (1976). Growth, development and activity in rat offspring following maternal drug exposure. *Exp Aging Res.* 2, 235-251.
141. Marwick, C. (2000). NIDA seeking data on effect of fetal exposure to methamphetamine. *JAMA.* 283, 2225-2226.
142. Matuszewich, L., Carter, S., Anderson, E.M., Friedman, R.D., Mcfadden, L.M. (2014). Persistent behavioral and neurochemical sensitization to an acute injection of methamphetamine following unpredictable stress. *Behav Brain Res.* 272, 308-313.

143. Mccann, U.D., Wong, D.F., Yokoi, F., Villemagne, V., Dannals, R.F., Ricaurte, G.A. (1998). Reduced striatal dopamine transporter density in abstinent methamphetamine and methcathinone users: evidence from positron emission tomography studies with [<sup>11</sup>C]WIN-35,428. *J Neurosci.* 18, 8417-8422.
144. Mcdonald, R.J., White, N.M. (1994). Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol.* 61, 260-270.
145. Mcewen, B.S. (2001). Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 933, 265-277.
146. Mcintosh, J., Anisman, H., Merali, Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res.* 113, 97-106.
147. Mcketin, R., Dawe, S., Burns, R.A., Hides, L., Kavanagh, D.J., Teesson, M., Mc, D.Y.R., Voce, A., Saunders, J.B. (2016). The profile of psychiatric symptoms exacerbated by methamphetamine use. *Drug Alcohol Depend.* 161, 104-109.
148. Meaney, M.J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* 24, 1161-1192.
149. Meaney, M.J., Aitken, D.H., Viau, V., Sharma, S., Sarrieau, A. (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology.* 50, 597-604.
150. Meaney, M.J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., Laplante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J.R., Plotsky, P.M. (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci.* 18, 49-72.
151. Mendelson, J., Uemura, N., Harris, D., Nath, R.P., Fernandez, E., Jacob, P., 3rd, Everhart, E.T., Jones, R.T. (2006). Human pharmacology of the methamphetamine stereoisomers. *Clin Pharmacol Ther.* 80, 403-420.
152. Mesquita, A.R., Pego, J.M., Summavielle, T., Maciel, P., Almeida, O.F., Sousa, N. (2007). Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life. *Neuroscience.* 147, 1022-1033.
153. Michael, A.E., Papageorghiou, A.T. (2008). Potential significance of physiological and pharmacological glucocorticoids in early pregnancy. *Hum Reprod Update.* 14, 497-517.



154. Minhas, S., Liu, C., Galdamez, J., So, V.M., Romeo, R.D. (2016). Stress-induced oxytocin release and oxytocin cell number and size in prepubertal and adult male and female rats. *Gen Comp Endocrinol.* 234, 103-109.
155. Mirescu, C., Peters, J.D., Gould, E. (2004). Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci.* 7, 841-846.
156. Mittal, C., Griskevicius, V., Simpson, J.A., Sung, S., Young, E.S. (2015). Cognitive adaptations to stressful environments: When childhood adversity enhances adult executive function. *J Pers Soc Psychol.* 109, 604-621.
157. Moore, S.J., Deshpande, K., Stinnett, G.S., Seasholtz, A.F., Murphy, G.G. (2013). Conversion of short-term to long-term memory in the novel object recognition paradigm. *Neurobiol Learn Mem.* 105, 174-185.
158. Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11, 47-60.
159. Morris, R.G., Moser, E.I., Riedel, G., Martin, S.J., Sandin, J., Day, M., O'carroll, C. (2003). Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358, 773-786.
160. Muhammad, A., Kolb, B. (2011). Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behav Brain Res.* 223, 7-16.
161. Murgatroyd, C.A., Nephew, B.C. (2013). Effects of early life social stress on maternal behavior and neuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology.* 38, 219-228.
162. Nephew, B., Murgatroyd, C. (2013). The role of maternal care in shaping CNS function. *Neuropeptides.* 47, 371-378.
163. Nordquist, R.E., Voorn, P., De Mooij-Van Malsen, J.G., Joosten, R.N., Pennartz, C.M., Vanderschuren, L.J. (2007). Augmented reinforcer value and accelerated habit formation after repeated amphetamine treatment. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17, 532-540.
164. Northrop, N.A., Yamamoto, B.K. (2012). Persistent neuroinflammatory effects of serial exposure to stress and methamphetamine on the blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol.* 7, 951-968.
165. Oh, J.S., Lyoo, I.K., Sung, Y.H., Hwang, J., Kim, J., Chung, A., Park, K.S., Kim, S.J., Renshaw, P.F., Song, I.C. (2005). Shape changes of the corpus callosum in abstinent methamphetamine users. *Neurosci Lett.* 384, 76-81.

166. Oines, E., Murison, R., Mrdalj, J., Gronli, J., Milde, A.M. (2012). Neonatal maternal separation in male rats increases intestinal permeability and affects behavior after chronic social stress. *Physiol Behav.* 105, 1058-1066.
167. Oreland, S., Nylander, I., Pickering, C. (2010). Prolonged maternal separation decreases granule cell number in the dentate gyrus of 3-week-old male rats. *Int J Dev Neurosci.* 28, 139-144.
168. Oswald, L.M., Wong, D.F., Mccaul, M., Zhou, Y., Kuwabara, H., Choi, L., Brasic, J., Wand, G.S. (2005). Relationships among ventral striatal dopamine release, cortisol secretion, and subjective responses to amphetamine. *Neuropsychopharmacology.* 30, 821-832.
169. Parihar, V.K., Hattiangady, B., Kuruba, R., Shuai, B., Shetty, A.K. (2011). Predictable chronic mild stress improves mood, hippocampal neurogenesis and memory. *Mol Psychiatry.* 16, 171-183.
170. Paulus, M.P., Stewart, J.L. (2020). Methamphetamine use disorder: the next addiction crisis *JAMA Psychiatry.* 77, 959–966.
171. Peters, D.A. (1986). Prenatal stress increases the behavioral response to serotonin agonists and alters open field behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 25, 873-877.
172. Petříková-Hřebíčková, I., Ševčíková, M., Šlamberová, R. (2021). The Impact of Neonatal Methamphetamine on Spatial Learning and Memory in Adult Female Rats. *Front Behav Neurosci.* 15, 629585.
173. Pham, K., Nacher, J., Hof, P.R., Mcewen, B.S. (2003). Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 17, 879-886.
174. Plotsky, P.M., Thrivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Caldji, C., Sharma, S., Meaney, M.J. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology.* 30, 2192-2204.
175. Pometlová, M., Hrubá, L., Šlamberová, R., Rokyta, R. (2009). Cross-fostering effect on postnatal development of rat pups exposed to methamphetamine during gestation and preweaning periods. *Int J Dev Neurosci.* 27, 149-155.
176. Pruessner, J.C., Champagne, F., Meaney, M.J., Dagher, A. (2004). Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life

- maternal care: a positron emission tomography study using [11C]raclopride. *J Neurosci.* 24, 2825-2831.
177. Rabasa, C., Gagliano, H., Pastor-Ciurana, J., Fuentes, S., Belda, X., Nadal, R., Armario, A. (2015). Adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis to daily repeated stress does not follow the rules of habituation: a new perspective. *Neurosci Biobehav Rev.* 56, 35-49.
  178. Rambousek, L., Kačer, P., Syslová, K., Bumba, J., Bubeníková-Valešová, V., Šlamberová, R. (2014). Sex differences in methamphetamine pharmacokinetics in adult rats and its transfer to pups through the placental membrane and breast milk. *Drug Alcohol Depend.* 139, 138-144.
  179. Rokyta, R., Yamamotová, A., Šlamberová, R., Franěk, M., Vaculín, S., Hrubá, L., Schutová, B., Pometlová, M. (2008). Prenatal and perinatal factors influencing nociception, addiction and behavior during ontogenetic development. *Physiol Res.* 57 Suppl 3, 79-88.
  180. Russak, L.G., Schwartz, G.E. (1997). Feelings of parental care predict health status in midlife: a 35 year follow-up of the Harvard Mastery of Stress Study. *J Behav Med.* 20, 1-11.
  181. Sachser, N., Hennessy, M.B., Kaiser, S. (2011). Adaptive modulation of behavioural profiles by social stress during early phases of life and adolescence. *Neurosci Biobehav Rev.* 35, 1518-1533.
  182. Sahakian, B.J., Robbins, T.W., Morgan, M.J., Iversen, S.D. (1975). The effects of psychomotor stimulants on stereotypy and locomotor activity in socially-deprived and control rats. *Brain Res.* 84, 195-205.
  183. Salzmann, C., Otis, M., Long, H., Roberge, C., Gallo-Payet, N., Walker, C.D. (2004). Inhibition of steroidogenic response to adrenocorticotropin by leptin: implications for the adrenal response to maternal separation in neonatal rats. *Endocrinology.* 145, 1810-1822.
  184. Savignac, H.M., Dinan, T.G., Cryan, J.F. (2011). Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front Behav Neurosci.* 5, 13.
  185. Sekine, Y., Ouchi, Y., Takei, N., Yoshikawa, E., Nakamura, K., Futatsubashi, M., Okada, H., Minabe, Y., Suzuki, K., Iwata, Y., Tsuchiya, K.J., Tsukada, H., Iyo, M., Mori, N. (2006). Brain serotonin transporter density and aggression in abstinent methamphetamine abusers. *Arch Gen Psychiatry.* 63, 90-100.

186. Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J.* 1, 1383–1392.
187. Seminerio, M.J., Hansen, R., Kaushal, N., Zhang, H.T., Mccurdy, C.R., Matsumoto, R.R. (2013). The evaluation of AZ66, an optimized sigma receptor antagonist, against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity and memory impairment in mice. *Int J Neuropsychopharmacol.* 16, 1033-1044.
188. Shuklaa, M., Vincent, B. (2021). Methamphetamine abuse disturbs the dopaminergic system to impair hippocampal-based learning and memory: An overview of animal and human investigations. *Neurosci Biobehav Rev.* 131, 541–559.
189. Schoffelmeer, A.N., De Vries, T.J., Wardeh, G., Van De Ven, H.W., Vanderschuren, L.J. (2002). Psychostimulant-induced behavioral sensitization depends on nicotinic receptor activation. *J Neurosci.* 22, 3269-3276.
190. Schutová, B., Hrubá, L., Pometlová, M., Šlamberová, R. (2009b). Impact of prenatal and acute methamphetamine exposure on behaviour of adult male rats. *Prague Med Rep.* 110, 67-78.
191. Schutová, B., Hrubá, L., Pometlová, M., Deykun, K., Šlamberová, R. (2009a). Cognitive functions and drug sensitivity in adult male rats prenatally exposed to methamphetamine. *Physiol Res.* 58, 741-750.
192. Schutová, B., Hrubá, L., Pometlová, M., Deykun, K., Šlamberová, R. (2008). Impact of methamphetamine administered prenatally and in adulthood on cognitive functions of male rats tested in Morris water maze. *Prague Med Rep.* 109, 62-70.
193. Schutová, B., Hrubá, L., Pometlová, M., Rokyta, R., Šlamberová, R. (2010). Responsiveness to methamphetamine in adulthood is altered by prenatal exposure in rats. *Physiol Behav.* 99, 381-387.
194. Smith, J., Prior, M. (1995). Temperament and stress resilience in school-age children: a within-families study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 34, 168-179.
195. Smith, L.M., Santos, L.S. (2016). Prenatal exposure: The effects of prenatal cocaine and methamphetamine exposure on the developing child. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 108, 142-146.
196. Smith, L.M., Chang, L., Yonekura, M.L., Grob, C., Osborn, D., Ernst, T. (2001). Brain proton magnetic resonance spectroscopy in children exposed to methamphetamine in utero. *Neurology.* 57, 255-260.
197. Smith, L.M., Diaz, S., Lagasse, L.L., Wouldes, T., Derauf, C., Newman, E., Arria, A., Huestis, M.A., Haning, W., Strauss, A., Della Grotta, S., Dansereau, L.M., Neal, C.,

- Lester, B.M. (2015). Developmental and behavioral consequences of prenatal methamphetamine exposure: A review of the Infant Development, Environment, and Lifestyle (IDEAL) study. *Neurotoxicol Teratol.* 51, 35-44.
198. Smith, L.M., Lagasse, L.L., Derauf, C., Grant, P., Shah, R., Arria, A., Huestis, M., Haning, W., Strauss, A., Della Grotta, S., Liu, J., Lester, B.M. (2006). The infant development, environment, and lifestyle study: effects of prenatal methamphetamine exposure, polydrug exposure, and poverty on intrauterine growth. *Pediatrics.* 118, 1149-1156.
199. Stevenson-Hinde, J. (2007). Attachment theory and John Bowlby: some reflections. *Attach Hum Dev.* 9, 337-342.
200. Struntz, K.H., Siegel, J.A. (2018). Effects of methamphetamine exposure on anxiety-like behavior in the open field test, corticosterone, and hippocampal tyrosine hydroxylase in adolescent and adult mice. *Behav Brain Res.* 348, 211-218.
201. Stuchlík, A. (2003). [Space and spatial orientation]. *Cesk Fysiol.* 52, 22-33.
202. Suzuki, T., Fukuoka, Y., Mori, T., Miyatake, M., Narita, M. (2004). Behavioral sensitization to the discriminative stimulus effects of methamphetamine in rats. *Eur J Pharmacol.* 498, 157-161.
203. Szeto, A., McCabe, P.M., Nation, D.A., Tabak, B.A., Rossetti, M.A., McCullough, M.E., Schneiderman, N., Mendez, A.J. (2011). Evaluation of enzyme immunoassay and radioimmunoassay methods for the measurement of plasma oxytocin. *Psychosom Med.* 73, 393–400.
204. Ševčíková, M., Petříková, I., Šlamberová, R. (2020). Methamphetamine exposure during the first, but not the second half of prenatal development, affects social play behavior. *Physiol Res.* 69, 319-330.
205. Šlamberová, R. (2005). Flurothyl seizures susceptibility is increased in prenatally methamphetamine-exposed adult male and female rats. *Epilepsy Res.* 65, 121-124.
206. Šlamberová, R. (2019). Review of long-term consequences of maternal methamphetamine exposure. *Physiol Res.* 68, 219-231.
207. Šlamberová, R., Bernášková, K., Matějovská, I., Schutová, B. (2008). Does prenatal methamphetamine exposure affect seizure susceptibility in adult rats with acute administration of the same drug? *Epilepsy Res.* 78, 33-39.
208. Šlamberová, R., Charousová, P., Pometlová, M. (2005a). Methamphetamine administration during gestation impairs maternal behavior. *Dev Psychobiol.* 46, 57-65.

209. Šlamberová, R., Charousová, P., Pometlová, M. (2005b). Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during pre-mating, gestation and lactation. *Reprod Toxicol.* 20, 103-110.
210. Šlamberová, R., Macúchová, E., Nohejlova-Deykun, K., Schutová, B., Hrubá, L., Rokyta, R. (2013). Gender differences in the effect of prenatal methamphetamine exposure and challenge dose of other drugs on behavior of adult rats. *Physiol Res.* 62, 99-108.
211. Šlamberová, R., Mikulecká, A., Macúchová, E., Hřebíčková, I., Ševčíková, M., Nohejlová, K., Pometlová, M. (2015). Effects of psychostimulants on social interaction in adult male rats. *Behav Pharmacol.* 26, 776-785.
212. Šlamberová, R., Mikulecká, A., Pometlová, M., Schutová, B., Hrubá, L., Deykun, K. (2010). The effect of methamphetamine on social interaction of adult male rats. *Behav Brain Res.* 214, 423-427.
213. Šlamberová, R., Pometlová, M., Charousová, P. (2006). Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30, 82-88.
214. Šlamberová, R., Schindler, C.J., Vathy, I. (2002). Impact of maternal morphine and saline injections on behavioral responses to a cold water stressor in adult male and female progeny. *Physiol Behav.* 75, 723-732.
215. Šlamberová, R., Schutová, B., Hrubá, L., Pometlová, M. (2011). Does prenatal methamphetamine exposure affect the drug-seeking behavior of adult male rats? *Behav Brain Res.* 224, 80-86.
216. Šlamberová, R., Vrajová, M., Schutová, B., Mertlová, M., Macúchová, E., Nohejlová, K., Hrubá, L., Puskarčíková, J., Bubeníková-Valešová, V., Yamamotová, A. (2014). Prenatal methamphetamine exposure induces long-lasting alterations in memory and development of NMDA receptors in the hippocampus. *Physiol Res.* 63, 547-558.
217. Tamura, M. (1989). Japan: stimulant epidemics past and present. *Bull Narc.* 41, 83-93.
218. Tata, D.A., Yamamoto, B.K. (2008). Chronic stress enhances methamphetamine-induced extracellular glutamate and excitotoxicity in the rat striatum. *Synapse.* 62, 325-336.
219. Terplan, M., Smith, E.J., Kozloski, M.J., Pollack, H.A. (2009). Methamphetamine use among pregnant women. *Obstet Gynecol.* 113, 1285-1291.

220. Thompson, P.M., Hayashi, K.M., Simon, S.L., Geaga, J.A., Hong, M.S., Sui, Y., Lee, J.Y., Toga, A.W., Ling, W., London, E.D. (2004). Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *J Neurosci.* 24, 6028-6036.
221. Tobias, M.C., O'Neill, J., Hudkins, M., Bartzokis, G., Dean, A.C., London, E.D. (2010). White-matter abnormalities in brain during early abstinence from methamphetamine abuse. *Psychopharmacology (Berl)*. 209, 13-24.
222. Tobon, A.L., Newport, D.J., Nemeroff, C.B. (2018). The role of oxytocin in early life adversity and later psychopathology: A review of preclinical and clinical studies. *Curr Treat Options Psychiatry.* 5, 401–415.
223. Todeschin, A.S., Winkelmann-Duarte, E.C., Jacob, M.H., Aranda, B.C., Jacobs, S., Fernandes, M.C., Ribeiro, M.F., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B. (2009). Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Horm Behav.* 56, 93-100.
224. Ujike, H., Sato, M. (2004). Clinical features of sensitization to methamphetamine observed in patients with methamphetamine dependence and psychosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1025, 279-287.
225. Unternaehrer, E., Bolten, M., Nast, I., Staehli, S., Meyer, A.H., Dempster, E., Hellhammer, D.H., Lieb, R., Meinschmidt, G. (2016). Maternal adversities during pregnancy and cord blood oxytocin receptor (OXTR) DNA methylation. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 11, 1460-1470.
226. Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., Maccari, S. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J Neurosci.* 17, 2626-2636.
227. Van Bodegom, M., Homberg, J.R., Henckens, M. (2017). Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front Cell Neurosci.* 11, 87.
228. Van Den Hove, D.L., Leibold, N.K., Strackx, E., Martinez-Claros, M., Lesch, K.P., Steinbusch, H.W., Schruers, K.R., Prickaerts, J. (2014). Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24, 595-607.
229. Van Hasselt, F.N., Tieskens, J.M., Trezza, V., Krugers, H.J., Vanderschuren, L.J., Joels, M. (2012). Within-litter variation in maternal care received by individual pups

- correlates with adolescent social play behavior in male rats. *Physiol Behav.* 106, 701-706.
230. Vanderschuren, L.J., Niesink, R.J., Van Ree, J.M. (1997). The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev.* 21, 309-326.
231. Vanderschuren, L.J., Schoffelmeer, A.N., Van Leeuwen, S.D., Hof, L., Jonker, A.J., Voorn, P. (2002). Compartment-specific changes in striatal neuronal activity during expression of amphetamine sensitization are the result of drug hypersensitivity. *Eur J Neurosci.* 16, 2462-2468.
232. Vanderschuren, L.J., Trezza, V., Griffioen-Roose, S., Schiepers, O.J., Van Leeuwen, N., De Vries, T.J., Schoffelmeer, A.N. (2008). Methylphenidate disrupts social play behavior in adolescent rats. *Neuropsychopharmacology.* 33, 2946-2956.
233. Vavřínková, B., Binder, T., Živný, J. (2001). [Characteristics of a population of drug dependent pregnant women in the Czech Republic]. *Ceska Gynekol.* 66, 285-291.
234. Veeneman, M.M., Boleij, H., Broekhoven, M.H., Snoeren, E.M., Guitart Masip, M., Cousijn, J., Spooren, W., Vanderschuren, L.J. (2011). Dissociable roles of mGlu5 and dopamine receptors in the rewarding and sensitizing properties of morphine and cocaine. *Psychopharmacology (Berl).* 214, 863-876.
235. Veeneman, M.M., Broekhoven, M.H., Damsteegt, R., Vanderschuren, L.J. (2012). Distinct contributions of dopamine in the dorsolateral striatum and nucleus accumbens shell to the reinforcing properties of cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 37, 487-498.
236. Vega, W.A., Kolody, B., Hwang, J., Noble, A. (1993). Prevalence and magnitude of perinatal substance exposures in California. *N Engl J Med.* 329, 850-854.
237. Viau, V., Sharma, S., Plotsky, P.M., Meaney, M.J. (1993). Increased plasma ACTH responses to stress in nonhandled compared with handled rats require basal levels of corticosterone and are associated with increased levels of ACTH secretagogues in the median eminence. *J Neurosci.* 13, 1097-1105.
238. Volkow, N.D., Chang, L., Wang, G.J., Fowler, J.S., Franceschi, D., Sedler, M., Gatley, S.J., Miller, E., Hitzemann, R., Ding, Y.S., Logan, J. (2001a). Loss of dopamine transporters in methamphetamine abusers recovers with protracted abstinence. *J Neurosci.* 21, 9414-9418.
239. Volkow, N.D., Chang, L., Wang, G.J., Fowler, J.S., Leonido-Yee, M., Franceschi, D., Sedler, M.J., Gatley, S.J., Hitzemann, R., Ding, Y.S., Logan, J., Wong, C., Miller,



- E.N. (2001b). Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am J Psychiatry*. 158, 377-382.
240. Walker, C.D., Salzman, C., Long, H., Otis, M., Roberge, C., Gallo-Payet, N. (2004). Direct inhibitory effects of leptin on the neonatal adrenal and potential consequences for brain glucocorticoid feedback. *Endocr Res*. 30, 837-844.
241. Wand, G.S., Oswald, L.M., Mccaul, M.E., Wong, D.F., Johnson, E., Zhou, Y., Kuwabara, H., Kumar, A. (2007). Association of amphetamine-induced striatal dopamine release and cortisol responses to psychological stress. *Neuropsychopharmacology*. 32, 2310-2320.
242. Wang, Z., Li, W.X., Zhi-Min, L. (2017). Similarity and Difference in Drug Addiction Process Between Heroin- and Methamphetamine-Dependent Users. *Subst Use Misuse*. 52, 459-467.
243. Williams, M.T., Blankenmeyer, T.L., Schaefer, T.L., Brown, C.A., Gudelsky, G.A., Vorhees, C.V. (2003a). Long-term effects of neonatal methamphetamine exposure in rats on spatial learning in the Barnes maze and on cliff avoidance, corticosterone release, and neurotoxicity in adulthood. *Brain Res Dev Brain Res*. 147, 163-175.
244. Williams, M.T., Morford, L.L., Wood, S.L., Wallace, T.L., Fukumura, M., Broening, H.W., Vorhees, C.V. (2003b). Developmental D-methamphetamine treatment selectively induces spatial navigation impairments in reference memory in the Morris water maze while sparing working memory. *Synapse*. 48, 138-148.
245. Winkelmann-Duarte, E.C., Todeschin, A.S., Fernandes, M.C., Bittencourt, L.C., Pereira, G.A., Samios, V.N., Schuh, A.F., Achaval, M.E., Xavier, L.L., Sanvitto, G.L., Mandarim-De-Lacerda, C.A., Lucion, A.B. (2007). Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Res*. 1170, 20-30.
246. Wouldes, T., Lagasse, L., Sheridan, J., Lester, B. (2004). Maternal methamphetamine use during pregnancy and child outcome: what do we know? *N Z Med J*. 117, U1180.
247. Wyvell, C.L., Berridge, K.C. (2001). Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered "wanting" for sucrose reward. *J Neurosci*. 21, 7831-7840.
248. Yamamotová, A., Hrubá, L., Schutová, B., Rokyta, R., Šlamberová, R. (2011). Perinatal effect of methamphetamine on nociception in adult Wistar rats. *Int J Dev Neurosci*. 29, 85-92.
249. Yang, R., Sun, H., Wu, Y., Lu, G., Wang, Y., Li, Q., Zhou, J., Sun, H., Sun, L. (2019). Long-Lasting Sex-Specific Effects Based On Emotion- and Cognition-Related

- Behavioral Assessment of Adult Rats After Post-Traumatic Stress Disorder From Different Lengths of Maternal Separation. *Front Psychiatry*. 10, 289.
250. Yang, Y., Cheng, Z., Tang, H., Jiao, H., Sun, X., Cui, Q., Luo, F., Pan, H., Ma, C., Li, B. (2017). Neonatal Maternal Separation Impairs Prefrontal Cortical Myelination and Cognitive Functions in Rats Through Activation of Wnt Signaling. *Cereb Cortex*. 27, 2871-2884.
251. Záborský, T. (2007). Methamphetamine in the Czech Republic. *J Drug Issues*. 37, 115-180.
252. Zanos, P., Wright, S.R., Georgiou, P., Yoo, J.H., Ledent, C., Hourani, S.M., Kitchen, I., Winsky-Sommerer, R., Bailey, A. (2014). Chronic methamphetamine treatment induces oxytocin receptor up-regulation in the amygdala and hypothalamus via an adenosine A2A receptor-independent mechanism. *Pharmacol Biochem Behav*. 119, 72-79.
253. Zhang, L., Hernandez, V.S., Liu, B., Medina, M.P., Nava-Kopp, A.T., Irls, C., Morales, M. (2012). Hypothalamic vasopressin system regulation by maternal separation: its impact on anxiety in rats. *Neuroscience*. 215, 135-148.
254. Zhang, Y., Gong, F., Liu, P., He, Y., Wang, H. (2021). Effects of Prenatal Methamphetamine Exposure on Birth Outcomes, Brain Structure, and Neurodevelopmental Outcomes. *Dev Neurosci*. 43, 271-280.
255. Zimmerberg, B., Sageser, K.A. (2011). Comparison of two rodent models of maternal separation on juvenile social behavior. *Front Psychiatry*. 2, 39.
256. Zorick, T., Nestor, L., Miotto, K., Sugar, C., Hellemann, G., Scanlon, G., Rawson, R., London, E.D. (2010). Withdrawal symptoms in abstinent methamphetamine-dependent subjects. *Addiction*. 105, 1809-1818.

## 10. Publikace a prezentace autora

### 10.1. Publikace *in extenso* s impakt faktorem

- Holubová-Kroupová A., Šlamberová R. (2021). Perinatal Stress and Methamphetamine Exposure Decreases Anxiety-Like Behavior in Adult Male Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 15:648780, doi: 10.3389/fnbeh.2021.648780. **IF 3.558**
- Holubová A., Poništ S., Jurčovičová J., Šlamberová R. (2019). Different oxytocin response to acute metamphetamine treatment in juvenile female rats perinatally exposed to stress and/or metamphetamine administration. *Frontiers in Physiology*, 10:305, doi: 10.3389/fphys.2019.00305. **IF 3.394**
- Holubová A., Mikulecká A., Pometlová M., Nohejlová K., Šlamberová R. (2018). Long-term early life adverse experience impairs responsiveness to exteroceptive stimuli in adult rats. *Behavioural Processes* 149:59-64, doi.org/10.1016/j.beproc.2018.02.005. **IF 1.746**
- Holubová A., Lukášková I., Tomášová N., Šuhajdová M., Šlamberová R. (2018). Early postnatal stress impair cognitive functions of affected male rats persisting until adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12:176, doi: 10.3389/fnbeh.2018.00176. **IF 3.138**
- Holubová A., Ševčíková M., Macúchová E., Hřebíčková I., Pometlová M., Šlamberová R. (2017). Effects of perinatal stress and drug abuse on maternal behavior and sensorimotor development of affected progeny. *Physiological Research* 66(Suppl.4):481-491. **IF 1.643**
- Holubová A., Štofková A., Jurčovičová J., Šlamberová R. (2016). The effect of neonatal maternal stress on plasma levels of ACTH, corticosterone, leptin, and ghrelin in adult male rats exposed to acute heterotypic stressor. *Physiological Research* 65(Suppl.5):557-566. **IF 1.618**

### 10.2. Publikace *in extenso* bez impakt faktoru

- Holubová A., Šlamberová R. (2017). Drogová závislost a perinatální stres. *Československá fyziologie* 66(2):46-51.

### 10.3. Prezentace a abstrakta

1. Kroupová A., Šlamberová R. Effect of Perinatal Stress and Drug Abuse on Anxiety-Like Behavior of Adult Male Rats in Open Field and Elevated Plus Maze. 17th International Medical Postgraduate Conference, 19.-20.11.2020, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Hradci Králové (online konference z důvodu pandemie COVID-19).
2. Holubová A., Šlamberová R. Perinatal stress and methamphetamine affect behavior of adult male rats. 48th Meeting of European Brain and Behaviour Society, 21.-24.9.2019, Praha, ČR.
3. Holubová A., Poništ S., Jurčovičová J., Šlamberová R. Different social behavior and oxytocin responses to acute methamphetamine treatment in juvenile female rats perinatally exposed to stress and/or drug administration. 21st Annual Genes, Brain and Behavior Meeting, 10-14.5.2019, Edinburgh, Scotland, UK.
4. Holubová A., Šlamberová R. Vliv perinatálního stresu a metamfetaminu na chování dospělých samců laboratorního potkana. Fyziologické dny 2019 (95.ročník), 5.-7.2.2019, Praha, ČR.
5. Holubová A., Poništ S., Jurčovičová J., Šlamberová R. Different oxytocin responses to acute methamphetamine treatment in juvenile female rats perinatally exposed to stress and/or methamphetamine administration. Neuroscience 2018 (Society for Neuroscience), 3.-7.11.2018, San Diego, USA.
6. Holubová A., Poništ S., Jurčovičová J., Šlamberová R. Rozdílná odpověď oxytocinu na podání metamfetaminu u juvenilních samic potkana prenatalně vystavených stresu a/nebo droze. Fyziologické dny 2018 (94.ročník), 6.-8.2.2018, Praha, ČR.
7. Holubová A., Lukášková I., Šuhajdová M., Tomášová N., Šlamberová R. Effects of perinatal stress and drug abuse on cognitive functions. Behaviour 2017, 30.7.-4.8.2017, Estoril, Portugalsko.
8. Holubová A., Mikulecká A., Pometlová M., Šlamberová R. Vliv dlouhodobého postnatálního stresu na habituaci a pozornost ovlivněného jedince v dospělosti. Studentská vědecká konference, 23.5.2017, 3. LF UK, Praha, ČR.
9. Holubová A., Ševčíková M., Macúchová E., Hřebíčková I., Charousová P., Pometlová M., Šlamberová R. Vliv perinatálního stresu a drogové závislosti na mateřské chování a vývoj

mláďat laboratorního potkana. Fyziologické dny 2017 (93.ročník), 2.– 4.2. 2017, Košice, Slovensko.

10. Holubová A., Ševčíková M., Macúchová E., Hřebíčková I., Šlamberová R. The effect of long-term perinatal stress and drug addiction on maternal behavior and development of the pups. 10th FENS Forum of Neuroscience, 1. –7.7.2016, Kodaň, Dánsko.
11. Holubová A., Mikulecká A., Pometlová M., Šlamberová R. Long-term early life adverse experience affects recognition memory and accelerates the process of habituation to familiar environment. IBNS 25th Annual Meeting, 6. –13.6. 2016, Budapešť, Maďarsko.
12. Holubová A., Macúchová E., Ševčíková M., Šlamberová R. Vliv perinatálního stresu na mateřské chování drogově závislých matek a vývoj jejich potomků. Studentská vědecká konference, 10.5.2016, 3. LF UK, Praha, ČR.
13. Holubová A., Štofková A., Jurčovičová J., Šlamberová R. Vliv akutního stresu na plazmatickou hladinu ACTH, CORT, leptinu a ghrelinu u dospělých samců potkana laboratorního v závislosti na neonatální expozici sociálnímu a fyzikálnímu stresu. Fyziologické dny 2016 (92. ročník), 4.-6.2.2016, České Budějovice, ČR.
14. Holubová A., Macúchová E., Ševčíková M., Šlamberová R. Vliv perinatálního stresu a drogové závislosti na vývoj mláďat potkana laboratorního. 58. česko-slovenská psychofarmakologická konference, 4.–7.1.2016, Jeseník, ČR.
15. Holubová A., Macúchová E., Ševčíková M., Šlamberová R. Vliv perinatálního stresu a drogové závislosti na vývoj mláďat potkana laboratorního. Výjezdní zasedání PRVOUK P34, 7. -8.11.2015, Brandýs nad Labem, ČR.
16. Holubová A., Štofková A., Jurčovičová J., Šlamberová R. The effect of acute swimming stress on plasma level of ACTH, CORT, leptin and ghrelin in male progeny according to neonatal social and physical stressors. Neuroscience 2015 (Society for Neuroscience), 16. – 24.10.2015, Chicago, USA.

## 11. Seznam příloh

1. Holubová-Kroupová A., Šlamberová R. (2021). Perinatal Stress and Methamphetamine Exposure Decreases Anxiety-Like Behavior in Adult Male Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 15:648780.
2. Holubová A., Poništ S., Jurčovičová J., Šlamberová R. (2019). Different oxytocin response to acute metamphetamine treatment in juvenile female rats perinatally exposed to stress and/or metamphetamine administration. *Frontiers in Physiology*, 10:305.
3. Holubová A., Lukášková I., Tomášová N., Šuhajdová M., Šlamberová R. (2018). Early postnatal stress impair cognitive functions of affected male rats persisting until adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12:176.
4. Holubová A., Mikulecká A., Pometlová M., Nohejlová K., Šlamberová R. (2018). Long-term early life adverse experience impairs responsiveness to exteroceptive stimuli in adult rats. *Behavioural Processes* 149:59-64.
5. Holubová A., Ševčíková M., Macúchová E., Hřebíčková I., Pometlová M., Šlamberová R. (2017). Effects of perinatal stress and drug abuse on maternal behavior and sensorimotor development of affected progeny. *Physiological Research* 66(Suppl.4):481-491.
6. Holubová A., Šlamberová R. (2017). Drogová závislost a perinatální stres. *Československá fyziologie* 66(2):46-51.
7. Holubová A., Štofková A., Jurčovičová J., Šlamberová R. (2016). The effect of neonatal maternal stress on plasma levels of ACTH, corticosterone, leptin, and ghrelin in adult male rats exposed to acute heterotypic stressor. *Physiological Research* 65(Suppl.5):557-566.