

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Autoreferát k disertační práci

**Vliv prenatální aplikace metamfetaminu a
prenatální hypoxie na příznaky podobné
ADHD**

Mgr. Anna Bednaříková

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

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Největší díky patří mé školitelce prof. MUDr. Romaně Šlamberové, PhD., za její odborné vedení, pomoc při metodikách pokusů, statistickém zpracování a za celkový čas věnovaný mi během postgraduálního studia. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce doc. RNDr. Anně Yamamotové, CSc. za pomoc zejména se statistickým zpracováním výsledků, MUDr. Marii Pometlové, CSc. za zaškolení metodiky NORT a OLT, MUDr. Kateryně Nohejlové, PhD., za zaškolení metodiky Morrisova vodního bludiště a testu Laboras. Také bych chtěla poděkovat Pavlu Charvátovi za zaškolení a pomoc s obsluhou přístroje na modelování hypoxie. Dále bych ráda poděkovala všem svým kolegyním Mgr. Lýdii Mihalčíkové, PhD., Mgr. Anně Kroupové, PhD., RNDr. Ivaně Petříkové, PhD., a Mgr. Barboře Čechové za pomoc s experimenty a psychickou podporu.

Nakonec bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za jejich podporu během celého studia.

Obsah:

1. Úvod.....	6
2. Hypotéza a cíl práce	8
3. Materiál a Metodika	9
3.1. Behaviorální testy	9
a. Novel object recognition test (NORT)	9
b. Object location test (OLT)	10
c. Voluntary Running	10
e. Morrisovo vodní bludiště.....	10
4. Statistická analýza dat	11
5. Výsledky.....	11
5.1. Novel object recognition test (NORT)	11
5.2. Object location test (OLT).....	11
5.3. Voluntary running.....	12
5.4. Laboras	12
5.5. Morrisovo vodní bludiště.....	12
6. Diskuze.....	13
6.1. NORT a OLT.....	13
6.2. Voluntary running test	15
6.3. Laboras	17
6.4. Morrisovo vodní bludiště.....	18
7. Shrnutí vlivu prenatální aplikace MA a hypoxie na příznaky podobné ADHD	21
8. Závěr.....	23
9. Seznam použité literatury:.....	24
10. Publikace autora	37

Souhrn

ADHD je duševní onemocnění heterogenního původu. Počet pacientů trpících ADHD stále narůstá. Přesný patofyziologický původ onemocnění dosud nebyl objasněn. V současné době existuje několik zvířecích modelů ADHD – genetické modely, farmakologické modely (etanol, nikotin, Polychlorované bifenyly - PCBs, léze 6-hydroxydopaminu) nebo prenatální hypoxie.

Metamfetamin (MA) je nejčastěji zneužívaný psychostimulant v České republice. V případě zneužívání MA těhotnými ženami poškozuje nejen matku samotnou, ale i vyvíjející se plod. V případě kojení ovlivňuje vývoj dítěte i postnatálně. MA způsobuje abnormality placenty a pupečníku, které mají za následek hypoxii a malnutrici. Navíc naše předchozí studie prokázaly, že prenatální expozice MA způsobila poruchy paměti, změny v NMDA receptorech a změny monoaminergního systému. Rovněž jsme v našich předchozích studiích pozorovali zvýšenou lokomoční aktivitu u zvířat prenatálně exponovaných MA. Hyperlokomoce a poruchy paměti bývají symptomy i u dospělých a dětí s ADHD.

Cílem naší práce bylo proto zjistit, zda prenatální expozice MA vyvolá příznaky podobné ADHD ve srovnání s prenatální hypoxií a zda by prenatální expozice MA mohla být použita jako animální model ADHD.

Březi samice kmene Wistar byly rozděleny do čtyř skupin na základě jejich expozice během gestace. 1. skupině byl podáván MA v dávce 5mg/kg, 2. skupině byl podáván fyziologický roztok, 3. skupina byla vystavena hypoxii (10 % O₂) na hodinu denně a 4. skupina byla kontrolní.

Samčí potomci byli testováni v několika behaviorálních testech. Testy na paměť - Novel object recognition test a Object location test, test učení a paměti – Morrisovo vodní bludiště, test na motorickou aktivitu – Voluntary running test a test na aktivitu v neznámém prostředí – Laboras.

Zjistili jsme, že prenatální expozice MA měla za následek zvýšenou motorickou aktivitu v testu Voluntary running, OLT a Laboras. Prenatální hypoxie způsobila zvýšenou motorickou aktivitu v testu NORT, OLT a Voluntary running testu a poruchy učení v Morrisově vodním bludišti. V obou případech nelze charakterizovat použitý model jako zvířecí model ADHD.

Summary

ADHD is a mental disorder with a heterogeneous origin. The number of patients suffering from ADHD is growing. The pathophysiological mechanisms causing ADHD have not been clarified yet. There are few rat models of ADHD - genetic models, chemically induced models (ethanol, nicotine, PCBs, 6-hydroxydopamine lesion) or environmentally induced models (hypoxia).

Methamphetamine is commonly used psychostimulant in the Czech Republic and is often abused by pregnant women. Methamphetamine may cause abnormalities in placenta and umbilical cord that result in hypoxia and malnutrition. Our previous studies showed that prenatal MA exposure leads to memory impairment, changes in NMDA receptors and changes in monoaminergic system

The aim of the present study was to test whether prenatal methamphetamine exposure (5 mg/kg) leads to symptoms of ADHD in comparison with prenatal hypoxia.

We found that adult male offspring prenatally exposed to methamphetamine presented hyperactivity in exploring an unknown environment.

In conclusion, rats exposed to methamphetamine *in utero* have shown changes in different types of behavior in adulthood prenatal hypoxia exposure.

Pregnant Wistar rats were divided into four groups based on their gestational exposure: (1) group was daily administered with subcutaneous injection of MA (5 mg/kg), (2) was injected with saline in the same time and volume, (3) group was affected by daily prenatal hypoxia (10 % O₂) for one hour, (4) group was control (without any injection). Male rat offspring were tested for their short term memory in Novel object recognition test and Object location test, for their learning and memory in Morris water maze and for their motor activity in Voluntary running test and in Laboras test for their activity in an unknown environment.

We found that prenatal MA exposure lead to increased motor activity in Voluntary running test, OLT and Laboras. Prenatal hypoxia caused increased motor activity in NORT, OLT and Voluntary running test and also caused learning impairment in Morris water maze. Both prenatal exposure models cannot be confirmed as valid animal models of ADHD.

1. Úvod

Psychiatrická onemocnění představují závažný problém naší společnosti. Za posledních 20 let se zvýšil počet dětí se závažnou poruchou chování čtyřnásobně (Příhodová 2011). Mezi nejčastější poruchy chování patří ADHD, porucha pozornosti či hyperaktivita (Theiner 2012). ADHD (Attention Deficit nad Hyperactivity Disorder) je heterogenní neurovývojová porucha založená na kombinaci genetických a environmentálních faktorů. Mezi její projevy patří neklid, neschopnost vydržet na jednom místě, problémy s obsluhou sebe sama nebo zapomětivost a dále přidružené poruchy jako dyslexie, dysgrafie nebo dyskalkulie, což má za následek horší vzdělávací výsledky, popř. horší uplatnění na trhu práce (Příhodová 2011, Malá 2012). Prevalence je celosvětově odhadována na 8-12 % přičemž se častěji vyskytuje u chlapců (Příhodová 2011).

Příčiny vzniku tohoto onemocnění jsou multifaktoriální, největší vliv má pravděpodobně dědičnost (až 70 %) přičemž se nejčastěji jedná o patologii genů kódující dopaminové dráhy (Gizer et al. 2009). Proto je i dopaminová teorie je jednou z hlavních teorií patofyziologie ADHD (Tripp et al. 2008, Volkow et al. 2009). Opírá se i o mechanismus účinku léčiv schválených k terapii tohoto onemocnění (metylfenidát a amfetamin), které ovlivňují dopaminergní přenos v mozku.

Jako další rizikové faktory ADHD byly popsány: předčasný porod, nízká porodní hmotnost, nízké Apgar skóre (Halmøy et al. 2012). Na patogenezi se podílí také environmentální faktory - podle některých studií je těmito příčinami způsobeno 10-40 % všech diagnostikovaných ADHD (Sciberras et al. 2017). Sem patří konzumace drog v těhotenství: prenatální expozice kokainu (Ackerman et al. 2008, Lambert and Bauer 2012) nebo alkoholu (Infante et al. 2015, Knopik et al. 2006), také u metamfetaminu (MA) exponovanými dětmi se rozvinuly některé z poruch pozornosti (Kiblawi et al. 2013). Vliv mají i jiné syntetické látky (organofosfáty, PCBs). (Bouchard et al. 2010, Eubig et al. 2010). Také prenatální hypoxie může vyvolat příznaky podobné ADHD (Wei et al. 2016). Hypoxie-ischemie jsou totiž primárními příčinami nižší porodní hmotnosti, mají za následek nedostatečný přísun nutrientů nebo kyslíku během těhotenství (Lou 1996, Smith 2016).

Pro testování ADHD se tedy používá několik zvířecích modelů – genetické („spontaneously hypertensive rats“ (SHR), Wistar-Kyoto rat (WKY), Naples high excitability rat (NHE) aj.) (Sontag et al. 2010, Russell et al. 2011), farmakologické: prenatální, tak i neonatální hypoxie (Oorschot et al. 2007, Miguel et al. 2015), prenatální expozice alkoholu (Gilbertson and Barron 2005).

Současné animální modely jsou velmi heterogenní. Bývají posuzovány na základě tří kritérií: „Face validity“, „Construct validity“ a „Predictive validity“ (Russell 2011, de la Peña et al. 2018). Je náročné určit, který zvířecí model nejlépe reprezentuje onemocnění nebo některý jeho podtyp. Proto se u většiny popsaných zvířecích modelů používá spíše termín „ADHD-like symptoms“, tedy příznaky podobné ADHD (Sontag et al. 2010).

MA je jednou z nejčastěji zneužívaných drog na světě. V současné době je MA v USA distribuován pod obchodním názvem Desoxyn[®], produkován italskou společností Recordati. Indikován je při terapii ADHD a obezity. MA je druhá nejrozšířenější droga v ČR po konopí. Ve věkové skupině 15 až 34 let se odhady uživatelů MA podle dostupných údajů pohybují okolo 3,6 %. Většinu závislých tvoří muži (2,6 %) (Mravčík et al. 2007, Mravčík 2019).

MA patří mezi psychomotorická stimulantia. Snadno prostupuje plazmatickou membránou buněk, placentární bariérou a také hematoencefalickou bariérou (Dattel 1990). Biologická dostupnost závisí na způsobu užití, nejvyšší je při intravenózním užití (až 100 %), (Cruickshank and Dyer 2009). Amfetaminy jsou díky své strukturní podobnosti s různými neurotransmitery (DA, NA, serotonin) schopné aktivovat jejich receptory v CNS i na periférii a tím způsobit nežádoucí i životu nebezpečné stavy (Panenka et al. 2013). Akutní účinky MA na CNS jsou stimulační. Pro tyto účinky je MA zneužíván (Cruickshank and Dyer 2009). Jeho uživatelé však trpí bludy, halucinacemi, agresí stereotypním chováním (Albertson et al. 1999, Bell 1973, Murray 1998). Opakovaná expozice amfetaminům vede k poškození dopaminergních a serotoninergních axonů (Riddle et al. 2006). MA také v akutní fázi zvyšuje krevní tlak, zvyšuje tepovou frekvenci, což se projeví bolestí na hrudi, srdeční arytmií, hypertenzí, způsobí vazokonstrikci cév mozku a koronárních tepen a také bronchodilataci. (Kaye et al. 2007). MA bývá zneužíván i těhotnými ženami pro své anorektické účinky (Marwick 2000). Navzdory zvyšující se prevalenci užívání MA mezi drogově závislými ženami v reprodukčním věku, dat z výzkumů v této oblasti máme stále málo (Metz et al. 2019, Perez et al. 2022).

Byly popsány abnormality CNS po prenatální expozici MA u člověka (Maya-Enero et al. 2018). Dále způsobuje opoždění psychomotorického vývoje, zejména u chlapců a neurokognitivní deficity – konkrétně poruchy paměti a pozornosti (Chang et al. 2004, Chang et al. 2007).

Co se týče účinků na animální model MA je pro zvířata teratogenní látka (Kasirsky et al. 1971). MA podávaný v dávkách 5 mg/kg odpovídá koncentracím u plodu drogově závislých matek (Acuff-Smith et al. 1996). MA podávaný opakovaně ve vyšších dávkách (20, 50 mg/kg) vedl k úmrtí březích samic nebo samovolnému potratu (Acuff-Smith et al. 1996). Samice,

kterým byl v době březosti podáván MA, měly kratší dobu březosti, jejich přírůstek na váze během březosti byl nižší než u kontrolních skupin (Šlamberová 2012). MA ovlivňuje vývoj jedince negativně nejen přímo, ale i skrze zhoršenou péči závislé matky o potomstvo během laktace (Malinová-Ševčíková et al. 2014). Způsobuje poruchy pupečníku a tím negativně ovlivňuje placentární zásobení plodu (Vavřínková et al. 2001), což vede k hypoxii a malnutrici plodu a následně i nízké porodní hmotnosti, která je jedním z hlavních rizikových faktorů ADHD (Henriksen et Clausen 2002).

Naše předchozí studie prokázaly poruchy vývoje plodu ovlivněním mezolimbického dopaminergního systému (Bubeníková-Valešová et al. 2009), změnám v expresi podjednotek NMDA receptorů v hippocampu (Šlamberová et al. 2014), dále potomstvo dosahovalo horších výsledků v testech negativní geotaxe, a vzpřimovacího reflexu nebo snížení spontánní motorické aktivity a explorační (Hrubá et al. 2008, Malinová-Ševčíková et al. 2014, Šlamberová et al. 2005) nebo i vedl k poruchám paměti a dalších kognitivních funkcí u dospělých jedinců (Fialová et al. 2015).

2. Hypotéza a cíl práce

Na základě zjištění předchozích studií naší laboratoře jsme definovali hypotézu, že prenatální expozice MA může vyvolat podobné symptomy jako ADHD a může být tudíž použita jako model.

Přesto, že již bylo publikováno mnoho studií dokazujících negativní účinky MA na potomky drogově závislých matek, dosud nebylo zjištěno, zda tyto expozice MA vyvolá přímo symptomy podobné ADHD. Jelikož jak zmíněno výše, může MA vyvolávat změny v pupečníku a placentě a následně tedy prenatální hypoxii a snížení výživy plodu, předpokládáme, že to by mohl být mechanismus účinku prenatální expozice MA vedoucí k podobným symptomům jako u ADHD. Proto jsme se rozhodli porovnat vliv prenatální expozice MA s prenatální hypoxií.

Naším cílem bylo:

1. Zjistit, zda prenatální expozice MA vyvolá změny podobné ADHD za použití behaviorálních testů.
2. Porovnat výsledky z již použitým modelem ADHD - prenatální hypoxií.
3. Analýza výsledků a dat. Vyvození závěrů a celkového významu pro společnost.

3. Materiál a Metodika

D-metamfetamin hydrochlorid byl podáván březím samicím kmene Wistar (s.c.) v dávce 5 mg/kg po celou dobu březosti (tato dávka vyvolá podobné změny chování jako u drogově závislých, také ji standardně používáme v našich experimentech) (Šlamberová et al. 2005). Další skupině byl podáván fyziologický roztok (1mg/kg) po celou dobu březosti. 4. Skupina byla vystavena vlivu prenatální hypoxie (10 % O₂) (H) vždy v 30s cyklech po 1 hodinu denně od 4. do 21. dne březosti. Použili jsme modifikovaný model dle Wei et al. 2016. Poslední skupina byla kontrolní.

Skupina	Prenatální aplikace	Dávka/koncentrace
1.	MA	5 mg/kg
2.	SA	1 ml/kg
3.	Hypoxie	10 % O ₂
4.	Kontrola	21 % O ₂

Tab.1. Experimentální skupiny

21. den březosti byly samice separovány do „mateřských“ klecí. Den porodu byl označen jako PD 0. Počet mláďat v hnízdě byl upraven na 12. Matky byly s mláďaty ponechány ve standardních laboratorních podmínkách. V PD 21 byla mláďata od matek odstavena a umístěna do klecí po 4 jedincích až do doby behaviorálních testů.

3.1. Behaviorální testy

a. Novel object recognition test (NORT)

NORT slouží k otestování krátkodobé paměti. Test byl proveden v PD (35-38) podle schématu (Fialová et al. 2015). Jedná se o test na trénování krátkodobé paměti. NORT se skládá ze tří částí: habituace, trénink a testování. Test probíhal v tmavé místnosti za použití infračerveného světla při natáčení. Vyhodnocení bylo provedeno za použití programu Ethovision XT7. Z naměřených hodnot jsme spočítali tzv. Investigační ratio (IR). Také jsme sledovali frekvenci navštěvování nového a starého objektu, celková délka strávená u objektů, délka trajektorie a rychlost pohybu.

b. Object location test (OLT)

Další skupina zvířat byla použita k OLT. Tento test slouží k testování krátkodobé prostorové paměti (Ennaceur et al. 1997) a taktéž jsme použili již dříve použité schéma (Fialová et al. 2015). OLT byl proveden v PD 40-43. Skládá se také ze tří částí: habituace, trénování, které jsou identické, jako u NORT. Třetí část se liší změnou polohy objektu. Vyhodnocované parametry jsou identické, jako u NORT.

c. Voluntary Running

Tento test slouží k měření pohybové aktivity u zvířat (Persson et. al 2004). Samci byli testováni v klecích s vloženým běhátkem. Zvířata byla do klece vložena třikrát, vždy na dobu pěti dnů, a to v PD 21 (tedy PD 21-PD 25), PD 30 (tedy PD 30-PD 34), a PD 90 (tedy PD 90-PD 94). V PD 21 i v PD 30 byla zvířata vkládána do klece ve skupině osmi sourozenců. V PD 90 byla zvířata už do klecí vkládána samostatně, po jednom z každé skupiny.

d. Laboras

Laboras je zařízení, které slouží k dlouhodobému monitorování chování malých hlodavců (Schutová et al. 2013). Zařízení automaticky vyhodnocuje pohybovou aktivitu potkana. Test je prováděn v tmavém prostředí. Na toto jsou zvířata 14 dní předem habituována (tzv. obrácený režim). Zvíře jsme vložili do zařízení na dobu 1 hodiny a aktivita byla zaznamenávána v šesti 10- minutových intervalech.

e. Morrisovo vodní bludiště

Morrisovo vodní bludiště slouží k testování kognitivních funkcí (učení a paměť) (Morris 1984). Doba testování je 12 dní, prvních 6 probíhá učení, 8. den jsou zvířata umístěna do bazénu bez ostrůvku (tzv. Probe test) a 12. den pak probíhá test paměti. Plavání potkanů bylo zaznamenáváno kamerou a hodnoceno automaticky systémem Ethovision XT10. Hodnotili jsme „search error“ neboli chybu hledání, celkovou uplavanou trajektorii, latenci, strategie – tigmotaxi a skenování a rychlost plavání. V Probe testu jsme hodnotili celkovou uplavanou trajektorii, rychlost plavání, čas strávený v kvadrantu s ostrůvkem (SV), frekvenci vstupů do kvadrantu a křížení polohy ostrůvku.

4. Statistická analýza dat

Při statistickém vyhodnocení dat jsme nejdříve určili, jestli bylo rozložení dat v jednotlivých skupinách normální (Gaussovské). Data byla analyzována pomocí parametrického testu pro 3 a více skupin. Za signifikantní jsme považovali rozdíly $p < 0,05$.

V testu NORT a OLT jsme použili jedno-faktorovou ANOVU (*Prenatální expozice*) a následným Bonferroniho *post-hoc* testem. V testu „Voluntary running“ jsme použili jednofaktorovou ANOVU (*Prenatální expozice*) a následným Fischerovým *post-hoc* testem.

V testu Laboras jsme naměřená data vyhodnocovali v 6 10-minutových intervalech. Data jsme hodnotili jednofaktorovou ANOVOU (*Prenatální expozice*) s opakovaným měřením a následným Bonferroniho *post-hoc* testem.

V testu učení jsme použili jednofaktorovou ANOVU (*Prenatální expozice*) s víceúrovňovým opakovaným měřením (*Dny x Pokusy*) a následným Bonferroniho *post-hoc* testem. „Probe“ test jsme vyhodnocovali pomocí jednofaktorového ANOVA testu (*Prenatální expozice*) s následným Bonferroniho *post-hoc* testem. Při vyhodnocení testu paměti jsme použili jednofaktorový test ANOVA (*Prenatální expozice*) s opakovaným měřením (*Pokusy*) a následným Bonferroniho *post-hoc* testem.

5. Výsledky

5.1. Novel object recognition test (NORT)

Statisticky významné výsledky byly zaznamenány v parametru vzdálenosti. Zvířata vystavená vlivu prenatální hypoxie urazila větší vzdálenost než zvířata vystavená vlivu SA a MA. Zvířata vystavená vlivu SA urazila větší vzdálenost než zvířata kontrolní skupina. Statisticky signifikantní výsledky jsme zaznamenali také u rychlosti, jakou se jedinci pohybovali. Jedinci prenatálně vystaveni vlivu hypoxie se pohybovali rychleji, než jedinci vystaveni vlivu SA a MA. V parametru IR, tedy hlavním parametru hodnoceném při NORT testu jsme nezjistili statisticky významné rozdíly u žádné skupiny zvířat. Výsledky u parametru frekvence navštěvování nového objektu byly statisticky významné. Jedinci prenatálně vystaveni hypoxii navštěvovali nový objekt častěji než jedinci vystaveni vlivu prenatálního SA.

5.2. Object location test (OLT)

Statisticky významné rozdíly jsme zaznamenali v parametru vzdálenosti, kterou jedinci urazili. Jedinci vystaveni vlivu prenatální expozice MA urazili větší vzdálenost než kontrolní skupina a jedinci vystaveni hypoxii urazili větší vzdálenost než kontrolní skupina. Rozdíly

v rychlosti, kterou se jedinci pohybovali, nebyly statisticky významné u žádné sledované skupiny. V parametru IR se hodnoty přiblížily významnosti pouze mezi skupinami SA a hypoxií. Ostatní sledované parametry nebyly statisticky významné.

5.3. Voluntary running

Statisticky významné rozdíly jsme zaznamenali ve všech sledovaných obdobích. Ve 21. PD jedinci prenatálně vystavení hypoxii urazili větší vzdálenost než jedinci vystavení vlivu SA a kontrolní skupina. Ve 30. PD jedinci vystavení vlivu prenatálního MA urazili větší vzdálenost než jedinci prenatálně vystavení vlivu SA a kontrolní skupina. Jedinci prenatálně vystavení hypoxii urazili větší vzdálenost než jedinci vystavení vlivu SA a kontrolní skupina. V 90. PD jedinci vystavení vlivu prenatálního MA urazili větší vzdálenost než kontrolní skupina. Jedinci prenatálně vystavení hypoxii urazili větší vzdálenost než jedinci vystavení vlivu SA a kontrolní skupina. Podobně jako v 30. PD jedinci měli jedinci skupiny MA tendenci uběhnout větší vzdálenost než SA skupina, ale tento výsledek nebyl významný.

5.4. Laboras

Prenatální aplikace MA významně ovlivnila délku času, který jedinci strávili lokomocí v neznámém prostředí. Jedinci prenatálně vystavení MA strávili více času lokomocí než jedinci vystavení prenatální aplikaci SA a než kontrolní skupina. Taktéž prenatální aplikace MA významně ovlivnila délku času, který jedinci strávili bez pohybu. Jedinci vystavení vlivu MA strávili výrazně méně času bez pohybu než kontrolní skupina. Dále prenatální aplikace MA ovlivnila délku času, který jedinci strávili čištěním se. Jedinci vystavení vlivu MA strávili výrazně více času čištěním se než kontrolní skupina. Rozdíly v ostatních parametrech nebyly statisticky významné.

5.5. Morrisovo vodní bludiště

Prenatální expozice neovlivnila u zvířat délku uplavané trajektorie ani rychlost plavání v procesu učení v Morrisově vodním bludišti. Prenatální expozice MA a SA měla vliv na latenci tedy čas, který zvířata strávila hledáním ostrůvku. Jedinci prenatálně exponovaní MA strávili hledáním ostrůvku méně času než jedinci prenatálně exponovaní SA nebo Hypoxii. Prenatální expozice MA a SA dále ovlivnila chybu hledání. Jedinci prenatálně exponovaní MA měli menší chybu hledání než jedinci prenatálně exponovaní SA nebo Hypoxii.

Co se týče strategií použitých při hledání ostrůvku, jedinci vystavení prenatálnímu vlivu hypoxie používali k hledání ostrůvku tigmotaxi častěji než jedinci vystavení prenatálnímu vlivu

MA. Jedinci vystavení prenatalnímu vlivu hypoxie také mnohem méně často používali k hledání ostrůvku strategii skenování v porovnání s jedinci vystavenými prenatalně MA a kontrolní skupinou.

Probe test

Prenatální expozice ovlivnila u zvířat v „Probe“ testu v Morrisově vodním bludišti délku uplavané trajektorie. Jedinci prenatalně exponovaní MA uplavali delší vzdálenost než jedinci prenatalně exponovaní SA. Kontrolní skupina jedinců uplavala větší vzdálenost než jedinci prenatalně exponovaní SA. Rychlost plavání byla taktéž ovlivněna prenatalní expozicí. Jedinci prenatalně exponovaní MA plavali větší rychlostí než jedinci prenatalně exponovaní SA. Kontrolní skupina jedinců plavala větší rychlostí než jedinci prenatalně exponovaní SA.

Čas strávený v SV kvadrantu, tedy kvadrantu kde byl umístěn ostrůvek v testu učení, byl taktéž ovlivněn prenatalní expozicí. Jedinci prenatalně exponovaní MA strávili v SV kvadrantu více času než jedinci prenatalně exponovaní hypoxií. Jedinci prenatalně exponovaní SA strávili v SV kvadrantu více času než jedinci prenatalně exponovaní hypoxií.

Frekvence vstupů do SV kvadrantu, byla taktéž ovlivněn prenatalní expozicí. Jedinci prenatalně exponovaní MA vstupovali do SV kvadrantu častěji než jedinci prenatalně exponovaní hypoxií. A také jedinci prenatalně exponovaní MA vstupovali do SV kvadrantu častěji než jedinci prenatalně exponovaní SA. Frekvence křížení ostrůvku nebyla prenatalní expozicí ovlivněna.

Test paměti

Prenatální expozice neměla žádný vliv na test paměti v Morrisově vodním bludišti.

6. Diskuze

6.1.NORT a OLT

Data v našem případě neprokázala žádné významné rozdíly v IR, který je hlavním hodnotícím parametrem u obou testů. Nebyly tedy pozorovány žádné poruchy paměti u dospívajících zvířat v obou testech paměti (NORT a OLT), které jsme provedli. Zaznamenali jsme pouze jeden statisticky významný výsledek. U testu NORT navštěvovali jedinci vystavení hypoxií nový objekt častěji než jedinci prenatalně vystavení SA, více času zkoumáním objektu ale nestrávili. Statisticky významné rozdíly jsme ale zaznamenali v dalších parametrech – rychlosti a vzdálenosti. Jedinci vystavení prenatalnímu vlivu hypoxie se pohybovali v testovací aréně rychleji a také urazili větší vzdálenost než jedinci vystavení vlivu SA nebo MA v testu

NORT. Jedinci vystavení vlivu hypoxie a MA urazili za stejný časový úsek větší vzdálenost v testu OLT v porovnání s kontrolní skupinou.

Co z těchto našich zjištění vyplývá? Častější navštěvování nového objektu jedinci s hypoxií můžeme dát do souvislosti s dalšími výsledky získanými v testech - tedy zvýšené pohybové aktivitě jedinců. Co se týče výsledků v této oblasti, naše zjištění se shodují se závěry předchozích studií. Podle jedné z předchozích studií byla u potkanů vystavených vlivu prenatální hypoxie zjištěna zvýšená pohybová aktivita, i když byli tito na prostředí arény předem habituováni. U potkanů vystavených vlivu prenatální hypoxie byly pozorovány změny chování v open-field testu. Samci vykazovali známky hyperaktivity (Hermans et al. 1992) nebo u nich byla pozorována zvýšená anxieta a nevykazovali známky habituace na neznámé prostředí (Sab et al. 2013). Obdobné druhy hyperaktivity byly popsány také po prenatálním hypoxickém inzultu, který trval pouze jeden den (17. den gestace). V dospělosti pak potomci vykazovali spontánní motorickou hyperaktivitu a také hyperaktivitu při exploraci neznámého prostředí v open-field testu. Na rozdíl od našich výsledků u nich byly popsány i poruchy krátkodobé paměti. Hypoxie způsobila poruchy bílé hmoty v mozkové kůře v *corpus callosum* a mozkovém kmeni, ale ne v motorické kůře (Delcour et al. 2012). Hyperaktivita v open-field testu po prenatální hypoxii byla rovněž popsána u velmi mladých jedinců (PD 15) (Cai et al. 1999). Existuje ale i studie, která u mláďat po prenatální hypoxii (PD 21-24) naopak popisuje hypoaktivitu. Spojitost mezi hyperaktivitou a prenatální hypoxií tak tato studie nepotvrdila (Zhuravin et al. 2019). Rozdílné výsledky souvisí velmi pravděpodobně s použitým modelem hypoxie.

Prenatální hypoxie způsobila poruchy v maturaci neuronů a zvýšila neurodegeneraci v kortexu a *striatu* u jedinců starých měsíc, avšak tyto strukturální změny nebyly u dospělých jedinců už pozorovány (Dubrovskaya and Zhuravin 2010).

Naopak jedinci vystavení prenatální aplikaci MA v dávce 5 mg/kg hyperaktivitu v pohybu po aréně vykazovali pouze u OLT testu. V tomto experimentu tedy dochází k částečné shodě s našimi předchozími studiemi, kdy prenatální expozice MA neovlivnila chování potkanů v open-field testu ani testu anxiety (Schutová et al. 2009), naopak studie jiných autorů jsou ve shodě s našimi současnými zjištěními (Diaz et al. 2014). V tomto experimentu byli testováni dospělí jedinci, zatímco v našem případě se jednalo o adolescenty. Roli tedy může hrát i vyzrávání nervové soustavy.

V našem experimentu nebyla prokázána žádná porucha paměti v NORT nebo OLT testu, což je v rozporu s našimi předchozími výsledky. Avšak v této studii jsme testovali jedince dospívající – adolescenty, zatímco v předchozí studii Fialové et al. 2015 byla použita dospělá

zvířata. Maturace hipokampu by mohla být jedním z vysvětlení tohoto zjištění. Poruchy učení a paměti po prenatální aplikaci MA byly u dospělých jedinců prokázány i v dalších studiích (Acuff-Smith et al. 1996, Williams et al. 2003, Herring et al. 2008).

Hippokampus potkanů a člověka má anatomicky podobnou strukturu. Liší se však hlavními funkcemi. U potkanů se podílí na prostorové orientaci, krátkodobé, střednědobé i dlouhodobé paměti (Kesner et al. 2010). Vliv na dozrávání hipokampu a jeho cytoarchitekturu má u potkanů i mateřská péče (Liu et al. 2000). U člověka i u potkanů dochází k postnatálnímu dozrávání hipokampu. Zatímco většina pyramidových buněk vzniká prenatálně, granulárních buněk je v *gyrus dentatus* u potkanů postnatálně přítomno pouze 15 % (Diamond 1990). Růst a dozrávání jednotlivých částí hipokampu je ukončen během prvních 2 týdnů postnatálního vývoje. V 90 PND je už hipokampus plně vyvinutý (Abdelrahim and Eltony 2011). U člověka je oproti tomu 80% granulárních buněk *gyrus dentatus* vytvořeno již před porodem (Rakic and Nowakowski 1981).

Fakt, že v našem experimentu nebyla prokázána souvislost mezi prenatální hypoxií a poruchami paměti je v rozporu s výsledky jiných autorů (Cunha-Rodrigues et al. 2018, Zhuravin et al. 2019). Prenatální hypoxie podle dřívějších výsledků stejného autora vedla ke změnám hipokampu, konkrétně ke změnám v CA1 oblasti (Zhuravin et al. 2009). Stejný autor také v další ze svých studií prokázal, že prenatální hypoxie vyvolána 14. den gestace ovlivnila synapse v hipokampu a také kognitivní funkce spojené s hipokampem. Konkrétně se jednalo o narušený bazální synaptický přenos v CA1-CA3 synapsích u mladých jedinců, také pokles hladin GluN2B podjednotek NMDA receptoru. Tyto změny vedly k signifikantním deficitům v NORT testu (Zhuravin et al. 2019). Prenatální hypoxie dále podle jiné studie snížila expresi tří podjednotek NMDA receptoru v hipokampu (Wei et al. 2016)

Spojitosť mezi anatomickými změnami hipokampu a vznikem ADHD byla prokázána v řadě studií. U dětí trpících ADHD bylo měřením magnetickou rezonancí prokázáno, že mají větší objem hipokampu než běžná populace, a to bilaterálně. Pravděpodobně se jedná o kompenzační odpověď na přítomnost poruch vnímání času nebo neustálé hledání stimulů, které jsou spojeny s ADHD (Plessen et al. 2006).

6.2. Voluntary running test

Naše výsledky prokázaly, že prenatální expozice MA v dávce 5 mg/kg a také prenatální hypoxie vedla ke zvýšené motorické aktivitě jedinců ve 30 PD. V 90 PD jsme sledovali podobnou tendenci.

Prenatální aplikace MA způsobuje trvalé změny CNS. Aplikace MA, zejména v 1. a 3. trimestru má trvalé následky zejména na serotoninergní i dopaminergní systém, které ovlivňují učení a vývoj mozku. MA ovlivňuje CNS skrze zvýšení katecholaminů v cytosolu neuronů. Zvýšení koncentrace katecholaminů je způsobeno nižším množstvím DA a NA na synapsích, jejich reaktivní metabolity navíc produkují volné radikály, které poškozují DNA a způsobují apoptózu buněk (Quinton and Yamamoto 2006). Nižší dávky MA (2-5 mg/kg) způsobily snížení absorpce DA a serotoninu, zatímco vyšší dávky (10 mg/kg) zvýšily vychytávání DA i serotoninu (Won et al. 2001). U dospělých jedinců prenatálně (mezi 7. a 18. dnem březosti) exponovaných MA bylo prokázáno zvýšené uvolňování DA ve striatu (Heller et al. 2000). V jednom z našich předchozích experimentů byly prokázány vyšší hladiny DA v nucleus accumbens u potkanů prenatálně exponovaných MA (Bubeníková-Valešová et al. 2009).

Neexistují žádné biologické markery spojované s ADHD, existují pouze určité průvodní znaky, které se vyskytují u části pacientů s ADHD (Medin et al. 2019). Jeden z nich je dysfunkčnost dopaminergního systému v CNS. Dysfunkčnost dopaminergního systému způsobuje mimo jiné také nedostatek motivace, který je rovněž jeden z průvodních jevů ADHD (Volkow et al. 2011).

U dalších zvířecích modelů ADHD, jako např. SHR nebo NHE byly taktéž prokázány změny v dopaminergním systému. U juvenilních SHR byly prokázány zvýšené hladiny DA ve striatu a prefrontálním kortexu společně s upregulací D1 receptorů v prefrontálním kortexu a hypofunkcí D2 receptorů. Také u nich byla prokázána hyperexprese integrálního DAT zodpovědného za clearance DA (Viggiano et al. 2004).

Existují modely myši vykazující spontánní hyperaktivitu ve „Voluntary runnig“ testu, avšak nevykazují žádné jiné poruchy chování spojované s ADHD (Rhodes et al. 2001). Podávání apomorfínu (neselektivní DA agonista) vedlo u tohoto kmene myši k vymizení hyperaktivity, podání SCH 23390 (selektivní D1 antagonist) vedlo k snížení aktivity u kontrolních, nikoli u selektované hyperaktivní linie myši. Blokátory DAT receptorů – amfetamin, kokain a GR13909 snížily aktivitu u selektované linie, nikoli u kontrolní skupiny. Hyperaktivita může být tedy spojená s poruchou dopaminergní transmise, konkrétně D1 receptoru a DAT (Rhodes and Garland 2003).

Naše výsledky také ukázaly, že prenatální hypoxie vedla ke zvýšené motorické aktivitě jedinců ve všech třech sledovaných obdobích života. Zvýšená lokomoční aktivita byla u zvířat prenatálně exponovaných hypoxii zjištěna i v jiných studiích (Hermans et al. 1992), naše zjištění ohledně vlivu prenatální hypoxie na hyperaktivitu potkanů jsou tedy v souladu s předchozími.

6.3. Laboras

Naše výsledky ukázaly, že prenatalní expozice MA v dávce 5mg/kg vedla ke zvýšené motorické aktivitě jedinců v neznámém prostředí. Toto zjištění je v rozporu s výsledky z našich předchozích studií, které přímý vliv prenatalní expozice MA na chování samců v neznámém prostředí nepotvrdily (Schutová et al. 2009, Schutová et al. 2010, Schutová et al. 2013). Dokonce jsme předpokládali, že změny vyvolané prenatalní expozicí MA jsou patrné pouze v období raného postnatálního vývoje (Hrubá et al. 2008) a nepřetrvávají do dospělosti (Schutová et al. 2009). Tento výsledek nás tedy překvapil.

Nabízí se zde srovnání s prenatalními účinky amfetaminu, tedy drogy, od které je MA odvozen. V případě amfetaminu totiž existuje několik studií, které popisují vliv prenatalní aplikace amfetaminu na zvýšenou motorickou aktivitu jedinců (Middaugh et al. 1974, Hitzemann et al. 1976). Stejně tak ale existují i studie, které tento vliv nepotvrdily (Vorhees 1985). Také podle Monder 1981 nevedla prenatalní aplikace této drogy ke změnám aktivity jedinců v testu open-field. Změny chování způsobené amfetaminem jsou, stejně jako u MA připisovány jeho vlivem na monoaminergní systém (Tan 2003) Podle jedné studie měla prenatalní expozice amfetaminu vliv na denzitu dopaminových receptorů zejména v dorsolaterální arei putamen a v nucleus accumbens, a dále také vedla ke snížení lokomoce u těchto jedinců (Flores et al. 2011).

Také v případě MA existují ale studie, které jeho vliv na aktivitu jedinců potvrzují. Jedná se však o utlumující efekt pozorovaný u mláďat (Sato and Fujiwara 1986). Lokomoce je ovlivňována zejména mezolimbickým dopaminergním systémem. Jak už bylo zmíněno, v jedné z našich předchozích studií jsme prokázali, že prenatalní expozice MA způsobí u samců zvýšenou hladinu DA v nucleus accumbens (Bubeníková-Valešová et al. 2009). Hlavní funkcí DA je modulovat rychlou ionotropní synaptickou neurotransmisi zprostředkovanou glutamátem. Další studie pak prokázala, že injekční aplikace DA do nucleus accumbens, tedy terminální části mezolimbického dopaminergního systému, vedla u potkanů k stimulaci lokomoce. Efektivnější ve stimulaci lokomoce byla už jen aplikace d-amfetaminu do nucleus accumbens (Pijnenburg et al. 1976).

Co se týče výsledků u hypoxických jedinců, naše výsledky neprokázaly žádné statisticky významné změny chování v experimentu Laboras. Tato zjištění jsou v rozporu s přechozími studii věnujícími se vlivu prenatalní hypoxie. Avšak námi použitý model prenatalní hypoxie není totožný, jako v těchto experimentech. Prenatalní hypoxie zvyšuje hladinu kortikosteronu, která má za následek snížení glukokortikoidních receptorů mimo jiné i

v hipokampu (Vetrovoy et al. 2021). Jiná studie prokázala, že prenatální hypoxie v 14. - 16. dnu gestace vyvolaná sníženým množstvím kyslíku po dobu 3 hodin ovlivňuje chování mláďat (samců i samic) v open-field testu (Vataeva et al. 2005).

6.4. Morrisovo vodní bludiště

Z našich výsledků vyplývá, že prenatální expozice MA a prenatální hypoxie neměly žádný vliv na délku uplavané trajektorie ani na rychlost v testu učení. Dále jsme prokázali, že proces učení byl zhoršen u prenatální expozice SA a hypoxie ve srovnání s prenatální expozicí MA. Byla zjištěna prodloužená latence, tedy doba, po jakou jedinci ostrůvek hledali. Totožné výsledky jsme zaznamenali i u chyby hledání. Tato zjištění jsou ve shodě s našimi předchozími výsledky, kdy bylo taktéž zjištěno, že prenatální expozice MA nemá vliv na rychlost plavání, délku trajektorie ani latenci v procesu učení (Schutová et al. 2008, Hrubá et al. 2010, Macúchová et al. 2013). Taktéž dřívější studie Acuff-Smith et al. z roku 1996 neprokázala vliv nízké dávky (5 mg/kg) MA u potkanů na proces učení, ale naopak prokázala vliv vyšších dávek (15 a 20 mg/kg). Podle Aghazadeh et al. 2022 však prenatální expozice MA na proces učení v Morrisově vodním bludišti má. Konkrétně se podařilo prokázat vliv na prodloužení doby latence u adolescentních jedinců (PD 21).

Jak už bylo zmíněno v úvodu, existují studie potvrzující vliv prenatální expozice MA na proces učení u člověka. Děti ve věku 6-7 let prenatálně exponované MA vykázaly horší výsledky v testech učení než zdravé kontroly. Problémem studie však byl fakt, že některé matky užívaly během těhotenství i další látky (alkohol a tabák), které mohly mít také negativní dopad na výsledky dětí (Kwiatkowski et al. 2018).

Co se týče prenatálního vlivu SA, bylo prokázáno, že injekce placebo podávána březím samicím může způsobit stres a nepřímo tím ovlivnit vývoj mláďat (Šlamberová et al. 2002). Stres je taktéž spojený s vyššími koncentracemi glukokortikoidů. Jejich vyšší koncentrace je zodpovědná za buněčnou smrt v *gyrus dentatus*. Tímto mechanismem může být ovlivněna funkce hipokampu (Gould et al. 1991). K podobným závěrům došly i další studie. Prenatální stres zhoršil výsledky v Morrisově vodním bludišti u dospělých samců. U samic pak byla zjištěna vyšší hladina kortikosteroidů a nižší hladina kortikosteroidních receptorů v hipokampu (Szuran et al. 2000). V dalším experimentu s použitím prenatálního stresu byly také změřeny vyšší hladiny kortikosteroidů (Modir et al. 2014).

Dále jsme zaznamenali statisticky významné rozdíly v použitých strategiích při hledání ostrůvku. Jedinci vystavení prenatálnímu vlivu hypoxie používali k hledání ostrůvku tigmotaxi

častěji než jedinci vystavení prenatalnímu vlivu MA. Dále také jedinci vystavení prenatalnímu vlivu hypoxie mnohem méně často používali k hledání ostrůvku strategii skenování v porovnání s jedinci vystavenými prenatalně MA a kontrolní skupinou.

Tigmataxe je jeden z nejčastějších typů chování, které se vyskytuje u hlodavců při exploraci neznámého prostředí. Je považována za jeden z příznaků anxiety nebo přímo strachu (Huang et al. 2012). Jedná se o plavání po okraji bazénu, kdy jedinec vstupuje do středu pouze ojedinele. Tento typ strategie je charakteristický pro první dva dny procesu učení. Naopak strategie skenování představuje neorganizované plavání uprostřed bazénu, kdy k nalezení ostrůvku dochází náhodně. Tato strategie se vyskytuje 3-4. den učení (Janus 2004). Pokud tedy jedinec používá k nalezení ostrůvku tigmataxi i v dalších dnech, zřídka kdy se mu to podaří. Tímto bývá proces učení narušen. Často tak četnost využití tigmataxe jako strategie hledání ostrůvku přímo souvisí s parametry latence a chybou hledání (Goodman and McIntyre 2017). A přesně tak je tomu i v našem případě, kdy jedinci vystavení prenatalní hypoxii častěji používali tigmataxi, méně skenování, měli prodlouženou dobu latence nalezení ostrůvku a častější chybu hledání.

Naše výsledky tedy prokazují, že prenatalní hypoxie způsobila poruchy učení a změny v strategiích hledání ostrůvku. K podobným závěrům došly i předchozí studie (Wei et al. 2016). Prenatální hypoxie vyvolaná v 17. gestační den operativně na dobu 30 minut, způsobila prodloužení doby latence v Morrisově vodním bludišti. Prenatální hypoxie měla taktéž vliv na snížení exprese a aktivity NO-syntázy v mozku (Cai et al. 1999). Inhibice NO-syntázy je jedním z možných vysvětlení mechanismu účinku prenatalní hypoxie na proces učení. Inhibice NO-syntázy v mozku potkana totiž vedla k poruchám učení a také paměti (Estall et al. 1993, Mysliveček et al. 1996). K podobným závěrům, tedy že prenatalní hypoxie vedla k poruchám učení v Morrisově vodním bludišti, dospěly i další studie (Vataeva et al. 2005). Další z možných vysvětlení poruchy učení je poškození hipokampu. V hipokampu byly popsány dvě zóny, nervové projekce, účastníci se procesem učení v Morrisově vodním bludišti a passive avoidance testu. Jedná se spoje axonů granulárních neuronů gyrus dentatus s pyramidovými buňkami CA3 regionu hipokampu: první intra- a infrapyramidová a druhá suprapyramidová. Existuje totiž pozitivní korelace mezi velikostí intra- a infrapyramidové zóny a úspěšnosti v testu učení (Wimer et al. 1971, Vataeva et al. 2005). Jelikož prenatalní hypoxie má negativní vliv na funkci hipokampu (Golan et al. 2009, Nalivaeva et al. 2018, Zhuravin et al. 2019), je toto další z možných vysvětlení mechanismu účinku prenatalní hypoxie na proces učení. Předchozí studie potvrzují, že léze hipokampu se projevují zhoršenými výsledky v Morrisově

vodním bludišti (Morris et al. 1982) a to zejména ve variantách se skrytým ostrůvkem (Brandeis et al. 1989, McNaughton et al. 1996).

Naše výsledky z „Probe“ testu ukázaly signifikantní rozdíly. Jednalo se zejména o rychlost plavání a delší vzdálenost u MA jedinců. Vyšší rychlost plavání jsme u prenatalní expozice MA zaznamenali už dříve, jednalo se však o experiment s použitím samic, zatímco v našem experimentu jsme použili pouze samce (Macúchová et al. 2013). Vyšší rychlost plavání může znamenat vyšší motivaci k nalezení ostrůvku. Jelikož ale v našem experimentu nebyla prokázána porucha učení ani paměti u MA exponovaných jedinců může se jednat pouze o jeden z projevů motorické hyperaktivity, který jsme zaznamenali ve Voluntary running testu. Delší trajektorie, kterou MA jedinci urazili, jen podporuje tuto naši teorii.

Co se týče času stráveného v SV kvadrantu, tedy kvadrantu, kde byl umístěn ostrůvek, prokázali jsme, že jedinci prenatalně exponovaní MA strávili více času než jedinci prenatalně exponovaní hypoxií. Jedinci prenatalně exponovaní SA strávili v SV kvadrantu více času než jedinci prenatalně exponovaní hypoxií. Toto zjištění je v částečné shodě s předchozími (Modir et al. 2014). Ukázalo se tedy, že jedinci vystavení hypoxií měli horší výsledky než ostatní skupiny s prenatalním inzultem. Toto podporuje naše zjištění z testu učení, který byl prenatalní hypoxií také ovlivněn. Naopak frekvence křížení ostrůvku nebyla prenatalní expozicí ovlivněna.

Z našich dat vyplývá, že prenatalní expozice MA neměla žádný vliv na paměť. Což je v souladu s předchozími výsledky z naší laboratoře (Schutová et al. 2008, Hrubá et al. 2010, Macúchová et al. 2013), ale také s předchozími výsledky ostatních autorů (Acuff-Smith et al. 1996).

Novější výzkumy však ukazují, že prenatalní expozice MA paměť může ovlivnit. V experimentu s použitím myši bylo zjištěno, že prenatalní expozice MA zpomaluje neuronální růst a synaptogenezi a tím zhoršuje paměť u dospívajících a dospělých jedinců. Březím samicím byl podáván MA s.c. v rozmezí 8.-15. den gestace. Přičemž důsledky prenatalní expozice MA byly zjišťovány na vzorcích z buněčných kultur mozku 15 dní starých embryí. Z buněčných kultur embryí bylo zjištěno, že jedinci prenatalní expozice MA zmenšila délku a průměr axonů, dále bylo sníženo množství presynaptického proteinu v hipokampu. Naopak u buněčných kultur izolovaných z mozku dospělých jedinců byl presynaptický faktor zvýšen. Také byl u MA jedinců zvýšený BDNF v prefrontálním kortexu a striatu. Poruchy paměti byly pozorovány u adolescentních i dospělých jedinců (Benya-aphikul et al. 2021).

Také podle další studie došlo po prenatalní aplikaci MA k ovlivnění paměti. Konkrétně se jednalo o prodloužení doby latence hledání ostrůvku u adolescentních jedinců (PD 21 a PD

33). V tomto experimentu navíc autor dále prokázal, že po prenatální aplikaci MA dochází k útlumu dlouhodobé potenciace v hipokampu, taktéž u adolescentních jedinců (Aghazadeh et al. 2022). Rozdílné výsledky tohoto a našich experimentů mohou být způsobeny jak věkem pokusných jedinců (v našem případě byl experiment prováděn na dospělých jedincích), tak i rozdílnou metodikou Morrisova vodního bludiště.

V našem experimentu se nepodařilo prokázat, že by prenatální hypoxie měla jakýkoliv vliv na paměť v Morrisově vodním bludišti nebo další ze sledovaných parametrů v tomto testu. Tyto naše výsledky se opět shodují s předchozími studiemi, kdy prenatální inzultem vyvolaná hypoxie poruchu paměti nezpůsobila (Cai et al. 1999).

Existují ale i studie dokazující opak. Hypoxie vyvolaná mezi 14.-16. dnem gestace prodloužila u exponovaných jedinců dobu latence hledání ostrůvku. Ve stejném experimentu ale autoři prokázali, že hypoxie vyvolaná mezi 11.-13. dnem gestace nebo mezi 18.-20. dnem gestace dobu latence hledání ostrůvku vůbec neovlivnila (Vataeva et al. 2005).

7. Shrnutí vlivu prenatální aplikace MA a hypoxie na příznaky podobné ADHD

Zvířecí modely psychiatrických onemocnění a tedy i ADHD onemocnění bývají posuzovány na základě tří kritérií: „Face validity“, „Construct validity“ a „Predictive validity“ (Russell 2011, de la Peña et al. 2018).

„Face validity“ se týká podobných symptomů člověka a u zvířete. Tedy hyperaktivita, impulzivita a nepozornost. (Russell 2011, Sagvolden et al. 2012). „Construct validity“ se týká podobného patofyziologického mechanismu. Zejména odchylky monoaminergního systému (Leo and Gainetdinov et al. 2013). „Predictive validity“ zahrnuje podobnou odpověď na farmakologickou, psychologickou nebo chirurgickou terapii. (de la Peña et al. 2018).

Co se týče „Face validity“ v našem experimentu se podařilo prokázat, že prenatální expozice MA v dávce 5 mg/kg vede zejména ke zvýšené pohybové aktivitě, která se projevila hned v několika testech (OLT, Voluntary running, Laboras). Klíčovým je v našem případě hyperaktivita ve „Voluntary running“ testu. Naopak poruchy učení a paměti prenatální expozice MA v našem případě nezpůsobila.

Prenatální hypoxie vedla jednak k hyperaktivitě v testech NORT, OLT a „Voluntary running“ a také k poruše učení v testu Morrisova vodního bludiště. Avšak samotnou přítomností hyperaktivního chování nelze zvíře charakterizovat jako model ADHD. Jelikož se jedná o modelové situace, je nutné si položit otázku, jestli by například dítě s diagnózou ADHD

bylo hyperaktivní v podobné situaci nebo podobném testu. Definice ADHD totiž dle DSM nezahrnuje samotnou hyperaktivitu, doslova uvádí, že jedinec není vždy hyperaktivní, ale popisuje, že chování jedince trvalo po dobu 6 měsíců a vyústilo do stavu maladaptace a inkonzistence s vývojovou úrovní jedince (Sagvolden et al. 2009).

Co se týče „Construct validity“ a tedy zejména poruch monoaminergního systému, v jedné z našich předchozích studií bylo zjištěno, že prenatální expozice MA zvyšuje hladinu DA v nucleus accumbens (Bubeníková-Valešová et al. 2009). Hlavní funkcí DA je modulovat rychlou ionotropní synaptickou neurotransmisi zprostředkovanou glutamátem. Nejužívanější zvířecí model ADHD, tedy SHR mají sníženou aktivaci DRD1 ve striatu, což vede ke zhoršení funkce NMDA receptoru (Papa et al. 1998). Další z našich předchozích experimentů prokázal, že prenatální expozice MA vede ke změnám v NR1 podjednotce NMDA receptoru v hipokampu (Šlamberová et al. 2014). Prenatální hypoxie způsobila snížení exprese několika podjednotek NMDA receptoru v hipokampu (Wei et al. 2016). Co se týče „Predictive validity“-terapie ADHD nebyla předmětem našeho výzkumu.

Nejrelevantnějším zvířecím modelem ADHD tak zůstávají SHR, u kterých se projevují všechny behaviorální parametry ADHD a také většina neurobiologických. SHR mají vyšší hladinu DA v nucleus accumbens shell a juvenilní SHR mají vyšší hladinu DA ve striatu a prefrontální kůře společně s upregulací D1 receptorů (DRD1) v prefrontální kůře a hypofunkcí D2 receptorů nebo hyperexpresí integrálního plasmalemnálního proteinu v dopaminovém transportéru zodpovědném za clearance DA (Viggiano et al. 2004).

Podle jedné z nejnovějších teorií o původu ADHD jde o deficit energie v těle způsobený nedostatečnou produkcí laktátu astrocyty v mozku. Děti trpící ADHD svou hyperaktivitou zvyšují produkci laktátu ve svalech a kompenzují tím nedostatečnou produkci laktátu astrocyty mozku. Toto tvrzení bylo podpořeno i u zvířecího modelu ADHD. U SHR byla zjištěna vyšší hladina MCT-1, transportéru, který se podílí na transportu laktátu skrze hematoencefalickou bariéru (Medin et al. 2019).

V současném experimentu jsme však v několika případech dosáhli odlišných výsledků než v předchozích experimentech prováděných v naší laboratoři. Naše studie z roku 2009 neprokázala žádný významný vliv prenatální MA expozice na chování zvířat v open-field testu (Schutová et al. 2009). Dále naše předchozí studie prokázala vliv prenatální expozice MA na poruchy paměti a dalších kognitivních funkcí u dospělých jedinců (Fialová et al. 2015). Tyto rozdílné výsledky nás překvapily a ukazují na nutnost provedení dalších experimentů v této oblasti.

Otázka, jestli je prenatální expozice MA možno považovat za vhodný model ADHD tak zůstává nezodpovězena. ADHD je choroba heterogenního původu s různými behaviorálními symptomy. Heterogenita symptomů pravděpodobně pochází z kombinace genetických a environmentálních faktorů, které nemoc způsobují.

Podobný neurobiologický původ ADHD a deficitů způsobených prenatální expozicí MA však nemůžeme i vzhledem k našim aktuálním výsledkům vyloučit, jelikož obojí vykazují podobné behaviorální a také biochemické charakteristiky.

8. Závěr

Z našich výsledků vyplývá, že prenatální expozice MA v dávce 5 mg/kg není možno použít jako validní animální model ADHD, přestože vyvolává některé ze symptomů tohoto onemocnění, konkrétně hyperaktivní chování. Hyperaktivní chování se nám podařilo prokázat v testech Voluntary running, Laboras i OLT. Také některé patofyziologické charakteristiky jsou podobné (zvýšená hladina dopaminu). Avšak poruchy učení ani paměti podle našich zjištění nezpůsobuje. K upřesnění našich závěrů by bylo třeba provést řadu dalších experimentů. Proto můžeme pouze konstatovat, že lze prenatální expozici MA u potkana využít k vyvolání hyperaktivního chování.

Přestože prenatální hypoxie byla už v minulosti použita jako model ADHD v našem případě se také neosvědčila. Námi získané výsledky z působení prenatální hypoxie 10 % O₂ trvající jednu hodinu denně po celou dobu březosti, prokázaly, že způsobuje poruchy učení, poruchy paměti však prokázány nebyly a to jak v testu Morrisova vodního bludiště, tak i v testu NORT a OLT. Co se týče hyperaktivního chování i zde nejsou výsledky tak jednoznačné. Ačkoliv bylo hyperaktivní chování prokázáno v testu Voluntary running i NORT a OLT, v testu Laboras hyperaktivita hypoxických jedinců prokázána nebyla. Z tohoto důvodu podle našich závěrů také plně nevyhovuje.

9. Seznam použité literatury:

1. ABDELRAHIM EA, ELTONY SA. Postnatal development of the hippocampal formation in male albino rats: histological, immunohistochemical, and morphometric studies. *Egyptian Journal of Histology*, 34(2): 346-64, 2011
2. ACKERMAN JP, LLORENTE AM, BLACK MM, ACKERMAN CS, MAYES LA, NAIR P: The effect of prenatal drug exposure and caregiving context on children's performance on a task of sustained visual attention. *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP*, 29.6: 467, 2008
3. ACUFF-SMITH KD, SCHILLING MA, FISHER JE, VORHEES CV. Stage-specific effects of prenatal d-methamphetamine exposure on behavioral and eye development in rats. *Neurotoxicology and teratology*, 18(2):199-215, 1996
4. AGHAZADEH R, ROSHAN-MILANI S, DERAFFSHPOUR L, SABOORY E. Effects of prenatal methamphetamine exposure on spatial cognition and hippocampal synaptic plasticity in adolescent rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 82(6): 471-85, 2022
5. ALBERTSON TE, DERLET RW, VAN HOOZEN BE. Methamphetamine and the expanding complications of amphetamines. *Western Journal of Medicine*, 170(4): 214, 1999
6. BENYA-APHIKUL H, PONGRAKHANANON V, CHETPRAYOON P, SOOKSAWATE T, RODSIRI R. Neuronal growth and synaptogenesis are inhibited by prenatal methamphetamine exposure leading to memory impairment in adolescent and adult mice. *Toxicology Letters*, 351:99-110, 2021
7. BOUCHARD MF, BELLINGER DC, WRIGHT RO, WEISSKOPF MG: Attention deficit/hyperactivity disorder and urinary metabolites of organophosphate pesticides in US children 8–15 years. *Pediatrics*, 125.6: e1270, 2010
8. BRANDEIS R, BRANDYS Y, YEHUDA S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *International Journal of Neuroscience*; 48(1-2): 29-69, 1989

9. BUBENIKOVA-VALESOVA V, KACER P, SYSLOVA K, RAMBOUSEK L, JANOVSKY M, SCHUTOVA B, HRUBA L, SLAMBEROVA R: Prenatal methamphetamine exposure affects the mesolimbic dopaminergic system and behavior in adult offspring. *Int J Dev Neurosci*, 27: 525-530, 2009
10. CAI Z, XIAO F, LEE B, PAUL IA and RHODES PG: Prenatal hypoxia-ischemia alters expression and activity of nitric oxide synthase in the young rat brain and causes learning deficits. *Brain research bulletin*, 49.5: 359-365.1999
11. CUNHA-RODRIGUES MC, DO NASCIMENTO BALDUCI CT, TENÓRIO F, BARRADAS PC. GABA function may be related to the impairment of learning and memory caused by systemic prenatal hypoxia-ischemia. *Neurobiology of Learning and Memory*; 149: 20-7, 2018
12. CRUICKSHANK CC, DYER KR. A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. *Addiction*; 104(7): 1085-99, 2009
13. DATTEL BJ: Substance abuse in pregnancy. *Seminars in perinatology*, 14.2: 179-187, 1990
14. DE LA PEÑA JB, DELA PEÑA IJ, CUSTODIO RJ, BOTANAS CJ, KIM HJ, CHEONG JH. Exploring the validity of proposed transgenic animal models of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Molecular Neurobiology*; 55: 3739-54, 2018
15. DELCOUR M, RUSSIER M, AMIN M, BAUD O, PABAN V, BARBE MF, COQ JO: Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behavioural brain research*, 232.1: 233-244, 2012
16. DIAMOND A. Rate of maturation of the hippocampus and the developmental progression of children's performance on the delayed non-matching to sample and visual paired comparison tasks. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990

17. DIAZ SD, SMITH LM, LAGASSE LL, DERAUF C, NEWMAN E, SHAH R and LESTER, BM: Effects of prenatal methamphetamine exposure on behavioral and cognitive findings at 7.5 years of age. *The Journal of pediatrics*, 164.6: 1333-1338.2014
18. DUBROVSKAYA NM and ZHURAVIN IA: Ontogenetic characteristics of behavior in rats subjected to hypoxia on day 14 or day 18 of embryogenesis. *Neuroscience and behavioral physiology*, 40.2: 231-238, 2010
19. ENNACEUR A, NEAVE N and AGGLETON JP: Spontaneous object recognition and object location memory in rats: The effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp. Brain Res*, 113-3: 509–519, 1997
20. ESTALL LB, GRANT SJ, CICALA GA. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*; 46(4): 959-62, 1993
21. EUBIG PA, AGUIAR A, SCHANTZ SL. LEAD AND PCBS: Lead and PCBs as risk factors for attention deficit/hyperactivity disorder. *Environmental health perspectives*, 118.12: 1654-1667, 2010
22. FIALOVÁ M, ŠÍROVÁ J, BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ V, ŠLAMBEROVÁ R: The effect of prenatal methamphetamine exposure on recognition memory in adult rats. *Prague Med Rep*, 116.1: 31-39, 2015
23. FLORES G, DE JESÚS GÓMEZ-VILLALOBOS M, RODRÍGUEZ-SOSA L. Prenatal amphetamine exposure effects on dopaminergic receptors and transporter in postnatal rats. *Neurochemical research*; 36: 1740-9, 2011
24. GILBERTSON R. A J. AND BARRON S: Neonatal ethanol and nicotine exposure causes locomotor activity changes in preweanling animals. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 81.1: 54-64, 2005
25. GIZER IR, FICKS C, WALDMAN ID. Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Human genetics*; 126: 51-90, 2009

26. GOLAN MH, MANE R, MOLCZADZKI G, ZUCKERMAN M, KAPLAN-LOUSON V, HULEIHEL M, PEREZ-POLO JR. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. *Neuropharmacology*; 57(5-6):511-22, 2009
27. GOODMAN J, MCINTYRE CK. Impaired spatial memory and enhanced habit memory in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Frontiers in pharmacology*; 8:663, 2017
28. GOULD E, WOOLLEY CS, CAMERON HA, DANIELS DC, MCEWEN BS. Adrenal steroids regulate postnatal development of the rat dentate gyrus: II. Effects of glucocorticoids and mineralocorticoids on cell birth. *Journal of Comparative Neurology*; 313(3): 486-93, 1991
29. HALMØY A, KLUNGSØYR K, SKJÆRVEN R, HAAVIK J. "Pre-and perinatal risk factors in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder." *Biological psychiatry*, 71.5: 474-481, 2012
30. HELLER A, FREENEY A, LEW R, WON L. Fetal exposure to methamphetamine in utero enhances methamphetamine induced release of striatal dopamine in the mouse. *InSoc Neurosci Abstr*, 26: 269, 2000
31. HENRIKSEN T AND CLAUSEN T: The fetal origins hypothesis: placental insufficiency and inheritance versus maternal malnutrition in well-nourished populations. *Acta Obstet Gyn Scan*, 81: 112–114, 2002
32. HERMANS RH, HUNTER DE, MCGIVERN RF, CAIN CD, LONGO LD: Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. *Neurotoxicology and teratology*, 14.2: 119-129, 1992
33. HERRING NR, SCHAEFER TL, GUDELSKY GA, VORHEES CV, WILLIAMS MT. Effect of (+)-methamphetamine on path integration learning, novel object recognition, and neurotoxicity in rats. *Psychopharmacology*; 199: 637-50, 2008

34. HITZEMANN BA, HITZEMANN RJ, BRASE DA, LOH HH. Influence of prenatal d-amphetamine administration on development and behavior of rats. *Life Sciences*; 18(6): 605-12, 1976
35. HRUBÁ L, SCHUTOVÁ B, ŠLAMBEROVÁ R, POMETLOVÁ M: Does cross-fostering modify the impairing effect of methamphetamine on postnatal development of rat pups. *Prague medical report*, 109.1: 50-61, 2008
36. HUANG Y, ZHOU W, ZHANG Y. Bright lighting conditions during testing increase thigmotaxis and impair water maze performance in BALB/c mice. *Behavioural brain research*; 226(1): 26-31, 2012
37. INFANTE MA, MOORE EM, NGUYEN TT, FOURLIGAS N, MATTSON SN, RILEY EP: Objective assessment of ADHD core symptoms in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Physiology & behavior*, 148: 45-50, 2015
38. CHANG L, SMITH LM, LOPRESTI C, YONEKURA ML, KUO J, WALOT I, ERNST T: Smaller subcortical volumes and cognitive deficits in children with prenatal methamphetamine exposure. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 32.2: 95-106, 2004
39. CHANG L, ALICATA D, ERNST T, VOLKOW N. Structural and metabolic brain changes in the striatum associated with methamphetamine abuse. *Addiction*; 102: 16-32, 2007
40. JANUS C. Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learning & memory*; 11(3): 337-46, 2004
41. KASIRSKY G, TANSY MF. Teratogenic effects of methamphetamine in mice and rabbits. *Teratology*; 4(2): 131-4, 1971
42. KAYE S, MCKETIN R, DUFLOU J, DARKE S. Methamphetamine and cardiovascular pathology: a review of the evidence. *Addiction*; 102(8): 1204-11, 2007
43. KESNER RP, GOODRICH-HUNSAKER NJ. Developing an animal model of human amnesia: the role of the hippocampus. *Neuropsychologia*; 48(8): 2290-302, 2010

44. KIBLAWI ZN, SMITH LM, LAGASSE LL, DERAUF C, NEWMAN E, SHAH R, ARRIA A, HUESTIS M, DELLAGROTTA S, DANSEREAU LM, NEAL C: The effect of prenatal methamphetamine exposure on attention as assessed by continuous performance tests: Results from the infant development, environment, and lifestyle (IDEAL) study. *Journal of developmental and behavioral pediatrics: JDBP*, 34.1: 31, 2013
45. KNOPIK VS, HEATH AC, JACOB T, SLUTSKE WS, BUCHOLZ KK, MADDEN PA, WALDRON M, MARTIN NG: Maternal alcohol use disorder and offspring ADHD: disentangling genetic and environmental effects using a children-of-twins design. *Psychological medicine*, 36.10: 1461-1472, 2006
46. KWIATKOWSKI MA, DONALD KA, STEIN DJ, IPSE J, THOMAS KG, ROOS A. Cognitive outcomes in prenatal methamphetamine exposed children aged six to seven years. *Comprehensive psychiatry*; 80: 24-33, 2018
47. LAMBERT BL AND CR BAUER: Developmental and behavioral consequences of prenatal cocaine exposure: a review. *Journal of Perinatology*, 32.11: 819-828, 2012
48. LIU D, DIORIO J, DAY JC, FRANCIS DD, MEANEY MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature neuroscience*; 3(8): 799-806, 2000
49. LOU HC: Etiology and pathogenesis of Attention-deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): Significance of prematurity and perinatal hypoxic-haemodynamic encephalopathy. *Acta Paediatrica* 85.11: 1266-1271, 1996
50. MACÚCHOVÁ E, NOHEJLOVÁ-DEYKUN K, ŠLAMBEROVÁ R. Effect of methamphetamine on cognitive functions of adult female rats prenatally exposed to the same drug. *Physiological Research*. 62 (Suppl. 1): S89-S98, 2013
51. MALÁ E: Pharmacotherapy ADHD, Dostupné online: <http://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/farmakoterapie-adhd-462916>

52. MALINOVÁ-ŠEVČÍKOVÁ M, HREBÍČKOVÁ I, MACÚCHOVÁ E, NOVÁ E, POMETLOVÁ M, ŠLAMBEROVÁ R. Differences in maternal behavior and development of their pups depend on the time of methamphetamine exposure during gestation period. *Physiological Research*, 63, Suppl. 4: S559-S572, 2014
53. MARWICK C: NIDA seeking data on effect of fetal exposure to methamphetamine. *Jama*; 283(17): 2225-6, 2000
54. MAYA-ENERO S, CANDEL-PAU J, REBOLLO-POLO M, CANDELA-CANTÓ S, DE LA TORRE R, LÓPEZ-VÍLCHEZ MÁ. Central nervous system malformation associated with methamphetamine abuse during pregnancy. *Clinical Toxicology*; 56(8): 795-7, 2018
55. MCNAUGHTON BL, BARNES CA, GERRARD JL, GOTHARD K, JUNG MW, KNIERIM JJ, KUDRIMOTI H, QIN Y, SKAGGS WE, SUSTER M, WEAVER KL. Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *Journal of Experimental Biology*; 199(1): 173-85, 1996
56. MEDIN T, MEDIN H, HEFTE MB, STORM-MATHISEN J, BERGERSEN LH: Upregulation of the lactate transporter monocarboxylate transporter 1 at the blood-brain barrier in a rat model of attention-deficit/hyperactivity disorder suggests hyperactivity could be a form of self-treatment. *Behav Brain Res*, 360: 279-285, 2019
57. METZ TD, GORDON AJ. Stimulant use in pregnancy—An under-recognized epidemic among pregnant women. *Clinical obstetrics and gynecology*; 62(1): 168, 2019
58. MIDDAGH LD, BLACKWELL LA, SANTOS III CA, ZEMP JW. Effects of d-amphetamine sulfate given to pregnant mice on activity and on catecholamines in the brains of offspring. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*; 7(5): 429-38, 1974
59. MIGUEL PM, SCHUCH CP, ROJAS JJ, CARLETTI JV, DECKMANN I, MARTINATO LH, PIRES AV, BIZARRO L, PEREIRA LO. Neonatal hypoxia-ischemia induces attention-deficit hyperactivity disorder-like behavior in rats. *Behavioral neuroscience*; 129(3): 309, 2015

60. MODIR F, SALMANI ME, GOUDARZI I, LASHKARBOLUKI T, ABRARI K. Prenatal stress decreases spatial learning and memory retrieval of the adult male offspring of rats. *Physiology & behavior*; 129: 104-9, 2014
61. MONDER H. Effects of prenatal amphetamine exposure on the development of behavior in rats. *Psychopharmacology*; 75: 75-8, 1981
62. MORRIS RG, GARRUD P, RAWLINS JA, O'KEEFE J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*; 297(5868): 681-3, 1982
63. MRAVČÍK, V. et al. (2016). Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2015. Praha: Úřad vlády ČR.
64. MRAVČÍK, V. et al. (2019). Výroční zpráva o stavu ve věcech drog v České republice v roce 2019. Praha: Úřad vlády ČR.
65. NALIVAEVA, NN., ANTHONY J. TURNER, AND IGOR A. ZHURAVIN: Role of prenatal hypoxia in brain development, cognitive functions, and neurodegeneration. *Frontiers in neuroscience*: 825, 2018
66. OORSCHOT DE, VOSS L, COVEY MV, BILKEY DK, SAUNDERS SE: ADHD-like hyperactivity, with no attention deficit, in adult rats after repeated hypoxia during the equivalent of extreme prematurity. *Journal of neuroscience methods*, 166.2: 315-322, 2007
67. PANENKA WJ, PROCYSHYN RM, LECOMTE T, MACEWAN GW, FLYNN SW, HONER WG, BARR AM: Methamphetamine use: a comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug and alcohol dependence* 129.3: 167-179, 2013
68. PAPA M, SERGEANT JA and SADILE AG: Reduced transduction mechanisms in the anterior accumbal interface of an animal model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Behavioural brain research*, 94.1: 187-195, 1998

69. PEREZ FA, BLYTHE S, WOULDDES T, MCNAMARA K, BLACK KI, OEI JL. Prenatal methamphetamine—impact on the mother and child—a review. *Addiction*. 2022
70. PERSSON AI, NAYLOR AS, JONSDOTTIR IH, NYBERG F, ERIKSSON PS, THORLIN T: Differential regulation of hippocampal progenitor proliferation by opioid receptor antagonists in running and non-running spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Neuroscience*, 19(7): 1847-55, 2004
71. PIJNENBURG AJ, HONIG WM, VAN DER HEYDEN JA, VAN ROSSUM JM. Effects of chemical stimulation of the mesolimbic dopamine system upon locomotor activity. *European journal of pharmacology*; 35(1): 45-58, 1976
72. PLESSSEN KJ, BANSAL R, ZHU H, WHITEMAN R, AMAT J, QUACKENBUSH GA, MARTIN L, DURKIN K, BLAIR C, ROYAL J, HUGDAHL K. Hippocampus and amygdala morphology in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Archives of general psychiatry*; 63(7): 795-807, 2006
73. PŘÍHODOVÁ I: Porucha pozornosti s hyperaktivitou (attention deficit/hyperactivity disorder – ADHD), Dostupné online: http://www.csmn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/porucha-pozornosti-s-hyperaktivitou-attention-deficit-hyperactivity-disorder-adhd-35776?confirm_rules=1
74. QUINTON MS, YAMAMOTO BK. Causes and consequences of methamphetamine and MDMA toxicity. *The AAPS journal*; 8:E337-E347, 2006
75. RAKIC P, NOWAKOWSKI RS. The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*; 196(1): 99-128, 1981
76. RHODES J, HOSACK G, GIRARD I, KELLEY A, MITCHELL G, GARLAND T. Differential sensitivity to acute administration of cocaine, GBR 12909, and fluoxetine in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology*; 158: 120-31, 2001

77. RHODES JS, GARLAND T. Differential sensitivity to acute administration of Ritalin, apomorphine, SCH 23390, but not raclopride in mice selectively bred for hyperactive wheel-running behavior. *Psychopharmacology*; 167: 242-50, 2003
78. RIDDLE EL, FLECKENSTEIN AE, HANSON GR. Mechanisms of methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *The AAPS journal*, (2): E413-8, 2006
79. RUSSELL VA. Overview of animal models of attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Current protocols in neuroscience*; 54(1): 9-35, 2011
80. SAB IM, FERRAZ MMD, AMARAL TAS, RESENDE AC, FERRAZ MR, MATSUURA C and MENDES-RIBEIRO AC: Prenatal hypoxia, habituation memory and oxidative stress. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 107: 24-28, 2013
81. SAGVOLDEN T, JOHANSEN EB, WØIEN G, WALAAS SI, STORM-MATHISEN J, BERGERSEN LH, HVALBY Ø, JENSEN V, AASE H, RUSSELL VA, KILLEEN PR. The spontaneously hypertensive rat model of ADHD—the importance of selecting the appropriate reference strain. *Neuropharmacology*; 57(7-8): 619-26, 2009
82. SAGVOLDEN T, JOHANSEN EB: Rat models of ADHD. *Behavioral neuroscience of attention deficit hyperactivity disorder and its treatment*, 301-315, 2012
83. SATO M, FUJIWARA Y. Behavioral and neurochemical changes in pups prenatally exposed to methamphetamine. *Brain and Development*; 8(4): 390-6, 1986
84. SCIBERRAS E, MULRANEY M, SILVA D, COGHILL D: Prenatal risk factors and the etiology of ADHD—review of existing evidence. *Current psychiatry reports*, 19.1: 1-8, 2017
85. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, POMETLOVÁ M, DEYKUN K, ŠLAMBEROVÁ R. Impact of methamphetamine administered prenatally and in adulthood on cognitive functions of male rats tested in Morris water maze. *Prague Med Rep*; 109(1): 62-70, 2008
86. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, POMETLOVÁ M, ŠLAMBEROVÁ R. Impact of prenatal and acute methamphetamine exposure on behaviour of adult male rats. *Prague Med Rep*; 110(1): 67-78, 2009

87. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, POMETLOVÁ M, ROKYTA R, ŠLAMBEROVÁ R. Responsiveness to methamphetamine in adulthood is altered by prenatal exposure in rats. *Physiology & behavior*; 99(3): 381-7, 2010
88. SCHUTOVÁ B, HRUBÁ L, ROKYTA R AND ŠLAMBEROVÁ R: Gender differences in behavioral changes elicited by prenatal methamphetamine exposure and application of the same drug in adulthood. *Developmental psychobiology*, 55(3): 232-42, 2013
89. SMITH TF, SCHMIDT-KASTNER R, MCGEARY JE, KACZOROWSKI JA, KNOPIK VS: Pre-and perinatal ischemia-hypoxia, the ischemia-hypoxia response pathway, and ADHD risk. *Behavior genetics*, 46.3: 467-477, 2016
90. SONTAG TA, TUCHA O, WALITZA S, LANGE KW: Animal models of attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD): a critical review. *ADHD Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*, 2.1: 1-20, 2010
91. SZURAN TF, PLIŠKA V, POKORNY J, WELZL H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiology & behavior*; 71(3-4): 353-62, 2000
92. ŠLAMBEROVÁ R, SCHINDLER CJ, VATHY I. Impact of maternal morphine and saline injections on behavioral responses to a cold water stressor in adult male and female progeny. *Physiology & behavior*. 75(5): 723-32, 2002
93. ŠLAMBEROVÁ R, VRAJOVÁ M, SCHUTOVÁ B, MERTLOVÁ M, MACÚCHOVÁ E, NOHEJLOVÁ K, HRUBÁ L, PUSKARČÍKOVÁ J, BUBENÍKOVÁ-VALEŠOVÁ V, YAMAMOTOVÁ A: Prenatal methamphetamine exposure induces long-lasting alterations in memory and development of NMDA receptors in the hippocampus. *Physiological research*, 63: S547-S558, 2014
94. ŠLAMBEROVÁ R: Drugs in pregnancy: the effects on mother and her progeny. *Physiol research* 61: 123-135, 2012

95. ŠLAMBEROVÁ R, CHAROUSOVÁ P AND POMETLOVÁ M: Maternal behavior is impaired by methamphetamine administered during pre-mating, gestation and lactation. *Reproductive toxicology*, 20.1: 103-110, 2005
96. TAN SE. Prenatal amphetamine exposure alters behavioral reactivity to amphetamine in rats. *Neurotoxicology and teratology*; 25(5): 579-85, 2003
97. TRIPP G, WICKENS JR. Research review: dopamine transfer deficit: a neurobiological theory of altered reinforcement mechanisms in ADHD. *Journal of child psychology and psychiatry*; 49(7): 691-704, 2008
98. VATAEVA LA, TYULKOVA EI, KHOZHAI LI, SAMOILOV MO, OTELLIN VA. Training in the Morris water maze of female and male rats exposed to hypoxia at various periods of prenatal development. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*; 41: 660-4, 2005
99. VAVŘÍNKOVÁ B, BINDER T, VÍTKOVÁ I AND ŽIVNÝ J: Changes of Placenta and Umbilical Cord in Drug-Addicted Women. *Ceska Gynekol*, 66.5: 345-49, 2001
100. VETROVOY O, TYULKOVA E, STRATILOV V, BARANOVA K, NIMIRITSKY P, MAKAREVICH P, RYBNIKOVA E. Long-term effects of prenatal severe hypoxia on central and peripheral components of the glucocorticoid system in rats. *Developmental Neuroscience*; 42(2-4): 145-58, 2021b
101. VIGGIANO D, VALLONE D and SADILE A. Dysfunctions in dopamine systems and ADHD: evidence from animals and modeling. *Neural plasticity*, 11: 97-114, 2004
102. VOLKOW ND, WANG GJ, KOLLINS SH, WIGAL TL, NEWCORN JH, TELANG F, FOWLER JS, ZHU W, LOGAN J, MA Y, PRADHAN K. Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. *Jama*; 302(10): 1084-91, 2009
103. VOLKOW ND, WANG GJ, NEWCORN JH, KOLLINS SH, WIGAL TL, TELANG F, FOWLER JS, GOLDSTEIN RZ, KLEIN N, LOGAN J, WONG C. Motivation deficit in ADHD

is associated with dysfunction of the dopamine reward pathway. *Molecular psychiatry*; 16(11): 1147-54, 2011

104. VORHEES CV. Behavioral effects of prenatal d-amphetamine in rats: a parallel trial to the Collaborative Behavioral Teratology Study. *Neurobehavioral Toxicology and Teratology*; 7(6): 709-16, 1985
105. WILLIAMS MT, BLANKENMEYER TL, SCHAEFER TL, BROWN CA, GUDELSKY GA, VORHEES CV: 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. *Developmental brain research*; 147(1-2): 163-75, 2003
106. WIMER CC, WIMER RE, RODERICK TH. Some behavioral differences associated with relative size of hippocampus in the mouse. *Journal of comparative and physiological psychology*; 76(1): 57, 1971
107. WEI B, LI L, HE A, ZHANG Y, SUN M AND XU Z: Hippocampal NMDAR-Wnt-Catenin signaling disrupted with cognitive deficits in adolescent offspring exposed to prenatal hypoxia. *Brain research*, 1631: 157-164, 2016
108. WON L, BUBULA N, MCCOY H, HELLER A. Methamphetamine concentrations in fetal and maternal brain following prenatal exposure. *Neurotoxicology and teratology*; 23(4): 349-54, 2001
109. ZHURAVIN IA, TUMANOVA NL, VASILIEV DS. Structural changes of the hippocampus nervous tissue in rat ontogenesis after prenatal hypoxia. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology*; 45(1): 156, 2009
110. ZHURAVIN IA, DUBROVSKAYA NM, VASILEV DS, POSTNIKOVA TY and ZAITSEV AV: Prenatal hypoxia produces memory deficits associated with impairment of long-term synaptic plasticity in young rats. *Neurobiology of learning and memory*, 164: 107066, 2019

10. Publikace autora

1. Šlamberová R, Nohejlová K, **Ochozková A**, Mihalčíková L. What is the role of subcutaneous single injections on the behavior of adult male rats exposed to drugs?. *Physiological Research*. 67: S665-72, 2018 **IF 2.139**
2. **Ochozková A**, Mihalčíková L, Yamamotová A, Šlamberová R. ADHD symptoms induced by prenatal methamphetamine exposure. *Physiological Research*. 68(Suppl 3): S347-52, 2019 **IF 2.139**
3. Mihalčíková L, **Ochozková A**, Šlamberová R. Effect of methamphetamine exposure on sexual behavior and locomotor activity of adult male rats. *Physiological Research*. 68: S339-46, 2019 **IF 2.139**
4. **Ochozková A**, Mihalčíková L, Yamamotová A, Šlamberová R. Can prenatal methamphetamine exposure be considered a good animal model for ADHD? *Physiological Research*. 70(Suppl 3): S431, 2021 **IF 2.139**
5. Mihalčíková L, **Ochozková A**, Šlamberová R. Does paternal methamphetamine exposure affect the behavior of rat offspring during development and in adulthood? *Physiological Research*. 70(Suppl 3): S419, 2021 **IF 2.139**