

Universita Karlova v Praze

3. lékařská fakulta



NUDZ

Autoreferát disertační práce

Animální modely psychóz - hodnocení EEG a hladin monoaminů v CNS u potkana

MUDr. Michaela Lipski

2016

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České Republiky

Obor, předseda oborové rady: Neurovědy, prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc

Školící pracoviště: Psychiatrické Centrum Praha/Národní ústav duševního zdraví

Autor: MUDr. Michaela Lipski (roz. Fujáková)

Školitel: Prof. MUDr. Jiří Horáček PhD.

Školitel konsultant: MUDr. Tomáš Páleníček PhD.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne

Obhajoba se koná dne v hod.

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

OBSAH

SOUHRN	4
SUMMARY	5
ÚVOD	6
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	8
3. MATERIÁL A METODIKA	10
A/ Zvířata	10
B/ Látky	10
C/ Test otevřeného pole – lokomoční aktivita.....	10
D/ Test sensorického zpracování informací – prepulsní inhibice úlekové reakce (PPI ASR) a akustická úleková reakce (ASR)	11
E/ Hodnocení elektrické aktivity pomocí kvantitativního EEG	11
1/ Implantace elektrod:	11
2/ Nahrávání EEG:	12
3/ Analýza EEG signálu:	12
F/ Farmakokinetická studie	13
G/ Mikrodialyzační studie	13
4. VÝSLEDKY:	14
A/ Glutamátergní model.....	14
B/ Serotonergní model.....	14
C/ Dopaminergní model	15
5/ DISKUZE A ZÁVĚRY	15
6/ POUŽITÁ LITERATURA:.....	18
7/ SEZNAM PUBLIKACÍ.....	20
Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:	20
Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertace:.....	20

SOUHRN

V této disertační práci jsme se zabývali rolí serotonergního, glutamatergního a v menší míře dopaminergního přenosu ve farmakologických animálních modelech. K indukci jednotlivých psychóz jsme použili tři látky – v glutamatergním modelu to byla látka s antagonistickým účinkem na NMDA receptorech ketamin, v serotonergním modelu látka s parciálně agonistickým účinkem na 5-HT_{2A/C} a 5-HT_{1A} receptorech 2C-B a v dopaminergním modelu látku s agonistickým účinkem na D₂ receptory amfetamin. U serotonergního a glutamatergního modelu jsme se dále zaměřili na změny chování zvířat (lokomoce, sensorimotorické zpracování informací). Hlavním tématem této práce bylo posouzení EEG změn. Poznatky z kvantitativního EEG jsme dále korelovali se změnami v dopaminergní transmisi v mesolimbické oblasti (pouze u serotonergního modelu). V glutamatergním modelu jsme navíc porovnávali behaviorální a EEG změny s kinetikou ketaminu v séru a mozku potkana. V tomto modelu jsme taktéž porovnávali vliv agonisty metabotropních glutamatergních 2/3 receptorů na indukované behaviorální a EEG změny, kde jsme předpokládali jejich normalizaci. Ve všech experimentech jsme použili potkany kmene Wistar. Lokomoční aktivita se hodnotila v testu otevřeného pole. Sensorimotorické zpracování informací bylo měřeno pomocí prepulsní inhibice úlekové reakce. EEG experiment zahrnoval stereotaktickou implantaci elektrod, po období regenerace následovalo samotné nahrávání EEG signálu před a po aplikaci látek. Vlastní analýza zahrnovala porovnání dvou úseků (před a po) v rámci jednoho zvířete. V mikrodialyzačním experimentu byla stereotakticky naimplantována vodící kanyla a v den experimentu byly sbírány jednotlivé vzorky s 20 minutovým intervalem. V našich behaviorálních experimentech jsme potvrdili, že jak v glutamatergním, tak serotonergním modelu dochází po aplikaci látek k hyperlokomoci. V serotonergním modelu tento účinek předchází hypolokomoce (tzv. bifázický účinek). V testu prepulsní inhibice vedly aplikované látky k narušení této reakce. Kvantitativní EEG v serotonergním modelu potvrdilo změny jako u jiných psychedelik. V glutamatergním modelu vedla behaviorální inaktivita ke zvýšení výkonu ve vysokofrekvenčních pásmech, snížení výkonu v nízkofrekvenčních pásmech a ke snížení EEG koherencí. Agonista mGlu_{2/3} tyto změny částečně normalizoval. V dopaminergním modelu se zvýšil výkon ve frekvencích alfa/theta a došlo k nárůstu EEG koherencí ve vysokofrekvenčních pásmech beta. Farmakokinetická studie potvrdila vrchol koncentrace ketaminu v mozku a séru mezi 10 a 20 minutou po aplikaci. V mikrodialyzačním experimentech bylo zjištěno, že látka 2C-B zvyšuje dopamin v nukleus accumbens. Našimi behaviorálními a EEG pokusy jsme potvrdily věrohodnost glutamatergního a serotonergního modelu jako validního modelu SCHZ.

SUMMARY

In this thesis, we examined the role of serotonergic, glutamatergic and - to a lesser extent - dopaminergic transmission in pharmacological animal models of psychosis. To induce these states, ketamine (an NMDA antagonist) was used to model altered glutamatergic transmission, partial agonist of 5-HT_{2A} / C and 5-HT_{1A} receptor 2C-B was used to induce altered serotonergic transmission and the D₂ receptor agonist amphetamine was used to model excessive dopaminergic transmission in schizophrenia. Serotonergic and glutamatergic animal models were also accompanied with behavioral tests (locomotion, sensory processing). The main topic of this work was to evaluate EEG changes. Findings from the quantitative EEG were correlated with the changes in dopaminergic transmission in the mesolimbic region (only in serotonergic model). Further, we compared behavioral and EEG changes in the ketamine model assessing pharmacokinetic changes in serum and brain tissue of the rat. In this model, we also assessed the effect of an agonist of metabotropic glutamatergic 2/3 receptors on behavioral and EEG changes where normalization of these changes was expected. Wistar rats were used in all experiments. Locomotor activity was assessed in the open field test. Sensorimotor information processing was measured by prepulse inhibition (PPI) of the startle response. The EEG experiment included stereotactic implantation of electrodes, recording of the EEG signal before and after application of the substances and the subsequent analysis. EEG analysis included a comparison of the two EEG segments (before and after) within one animal. In the microdialysis experiment, guide cannula was stereotactically implanted. Following 7 days of recovery period, samples were collected with a 20 minute interval and stored for further processing. Behavioral experiments confirmed hyperlocomotion in both glutamatergic and serotonergic models. Additionally, 2C-B produced a biphasic effect (hypolocomotion followed by hyperlocomotion). Both substances disrupted PPI. Quantitative EEG analysis in the serotonergic model confirmed changes similar to other psychedelics. In the glutamatergic model, behavioral inactivity produced an increase in power of high frequency bands, a decrease in power of low frequency bands and a decrease in EEG coherence. mGlu_{2/3} agonist partially normalized these changes. Administration of amphetamine led to an increase in power in theta/alpha band and an increase in coherence. Pharmacokinetic study confirmed that the peak of concentration of ketamine in the brain and serum occurs between 10th and 20th minute after application. In the microdialysis experiments, 2C-B increased the release of dopamine in the nucleus accumbens. Our behavioral and EEG experiments confirmed the validity of the glutamatergic and serotonergic models of schizophrenia.

1. ÚVOD

Schizofrenie (SCHZ) je heterogenní onemocnění charakterizované na základě pozitivních, negativních a kognitivních symptomů. Obvykle se projevuje psychózou, ve které člověk ztrácí kontakt s realitou, kterou jinak vnímá (halucinace), hodnotí (bludy) a která ovlivňuje jeho chování. Pokud tyto příznaky přetrvávají nejméně jeden měsíc, je stanovena diagnóza SCHZ. Následný průběh onemocnění je u každého člověka jiný, nicméně charakteristické jsou opakované ataky psychózy, kdy většinou dochází k výraznému kognitivnímu úpadku a emoční oploštělosti.

Jednoznačná etiologie SCHZ je neznámá, předpokládá se genetický podklad a působení faktorů prostředí. Onemocnění má vliv na struktury a funkce mozku. Charakteristický je úbytek šedé mozkové kůry ve frontální a temporální oblasti (Shenton et al, 2001) a dále např. snížení kortikálního objemu v oblasti limbické a v hipokampu (Shepherd et al, 2012; Adriano et al, 2012). V patofyziologii SCHZ dominuje dopaminergní hyperaktivita společně s hyperglutamatergním stavem a inhibicí GABAergní neurotransmise. Roli v patofyziologii SCHZ hraje i změněný serotoninový přenos, který lze dobře modelovat pomocí halucinogenů (Horacek 2005).

Z neurobiologického hlediska lze SCHZ chápat jako diskonekční syndrom (Friston, 1998), při kterém dochází k narušení funkční konektivity mezi různými oblastmi mozku. Nejčastěji je zmiňována diskonekce fronto-temporální, která se objevuje v různých stádiích onemocnění (Pettersson-Yeo et al, 2011) stejně jako u chronických psychotických pacientů (Woodward et al, 2011; Zalesky et al, 2012). Dále je u SCHZ popisovaná i diskonekce interhemisferální (Arnone et al, 2008) a diskonekce mezi mozkovou kůrou a podkorovými strukturami (Stephan et al, 2001). Podklad této diskonekce je zřejmě založen na celkovém menším počtu synaptických spojů, snížené účinnosti přenosu informací a snížené místní konektivitě (Micheloyannis et al, 2006; Lynall et al, 2010). Celkovou funkční konektivitu lze měřit metodami zaměřenými na hemodynamické změny (např. fMRI, PET) nebo například pomocí multi-kanálového elektroencefalografického (EEG) nahrávání, kde se následně vypočítá stupeň podobnosti mezi dvěma mozkovými oblastmi v čase (tzv. EEG koherence).

Analýza EEG aktivity nám taktéž může přinést podrobnější průzkum vztahů mezi nervovými buňkami. Za neurofyziologický základ EEG oscilační aktivity se považuje vzájemné působení excitační (glutamát) a inhibiční (GABA) složky. Oscilační aktivita je posuzována v 4 základních frekvenčních pásmech – delta (0-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa (8-12

Hz), beta (12-30 Hz) a gamma (30 -90 Hz). Vzhledem k heterogenitě SCHZ onemocnění bývají EEG nálezy místy rozporuplné. Existují však konsistentní výsledky, které zahrnují např. snížení v alfa spektrálním výkonu nad prefrontálními oblastmi (Boutros et al, 2008) nebo zvýšení výkonu v pásmech delta a theta (Moran and Hong, 2011). Další konsistentní nález bývá zvýšení gamma výkonu ve frontálních a temporálních oblastech v klidovém EEG (Venables et al, 2009) a abnormality v gamma pásmu během řešení kognitivních úkolů (Sun et al, 2011)

Animální modely psychóz přináší řadu různorodých poznatků. Roli hraje závislost na čase podání, čase měření a dávka látky. K jiným nedostatečně vysvětleným poznatkům v animálních modelech patří vliv behaviorální aktivity na EEG parametry. K dalším diskutabilním výsledkům patří nálezy v rámci EEG koherencí, kde jedním z největších nedostatků je implantace max. 4-6 aktivních elektrod (tj. 2-3 na hemisféru), což komplikuje komparaci s humánními nálezy.

Hlavním cílem této disertační práce je rozšířit poznatky u animálních modelů psychóz. Práce se zaměřuje na popisování lokomoční aktivity, deficitu ve zpracování informací, biochemických změn a zejména změn v kvantitativním EEG (výkonové spektra a EEG koherence). Inovativním aspektem této práce bylo sledování chování potkana a následná kvantitativní EEG analýza v behaviorálně pasivních a aktivních úsecích. Jiným metodickým přínosem našich EEG pokusů bylo naimplantování 12 aktivních elektrod s cílem možného translačního porovnání s nálezy u osob s psychózou.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

A/ CÍL: charakteristika behaviorálních účinků NMDA antagonisty ketaminu a serotonergního agonisty 2C-B v testu lokomoční aktivity a v testu prepulsní inhibice úlekové reakce

HYPOTÉZA: Použité látky povedou k hyperlokomoci a navodí deficit v sensorimotorickém zpracování informací

b/ CÍL: zhodnocení účinku ketaminu, 2C-B a amfetaminu v qEEG tj. v spektrálním výkonu a v koherencích u volně běhajících potkanů

HYPOTÉZA: použité modely psychózy povedou ke změnám spektrálního výkonu podobným u psychózy a budou indukovat diskonekci mezi jednotlivými oblastmi (tj. snížení koherencí)

C/ CÍL: porovnání vlivu vyšší a nižší dávky ketaminu/2C-B na chování a funkční konektivitu mozku a spektrální výkon v rámci kvantitativního EEG

HYPOTÉZA: Vyšší dávky budou indukovat výraznější změny jak v chování, tak v qEEG

D/ CÍL: zhodnocení vlivu behaviorální aktivity na qEEG (aktivita vs inaktivita)

HYPOTÉZA: Po aplikaci látek bude behaviorální inaktivita způsobovat změny více podobné klidovému EEG.

E/ CÍL: zhodnocení potencionálního antipsychotického účinku mGlu2/3 agonisty v behaviorálních testech a následné zhodnocení účinku agonisty u behaviorálně aktivní dávky v qEEG

HYPOTÉZA: Agonista mGlu2/3 bude normalizovat behaviorální a qEEG změny v glutamátergním modelu psychózy

F/ CÍL: korelace EEG změn s farmakokinetickým profilem behaviorálně aktivní dávky ketaminu

HYPOTÉZA: Maximum qEEG a behaviorálních změn bude během vrcholu účinku ketaminu

G/ CÍL: objasnění účinku 2C-B na hladiny dopaminu a jeho metabolitů v mesolimbické oblasti a korelace s behaviorálními a qEEG účinky

HYPOTÉZA: Vzhledem k mechanismu účinku bude 2C-B zvyšovat hladinu dopaminu a jeho metabolitů v mesolimbické oblasti

3. MATERIÁL A METODIKA

V našich experimentech jsme u potkanů měřili lokomoci v testu otevřeného pole, prepulsní inhibici akustické úlekové reakce, kortikální EEG, farmakokinetiku látky v mozku a séru a množství dopaminu v nucleus accumbens.

A/ Zvířata

Potkaní samce kmene Wistar (Konárovice) o hmotnosti 250-300 g. Každý potkan byl použit pouze jednou.

B/ Látky

V glutamátergním modelu jsme použili 2 subanestetické dávky ketaminu – nižší (9 mg/kg) a vyšší (30 mg/kg). Obě dvě dávky jsme použili jak v behaviorálních, tak v qEEG experimentech. Subanestetické dávky ketaminu jsou klasickými reprezentanty modelování jak pozitivních (např. hyperlokomoce), tak kognitivních příznaků (např. kognitivní deficit v AAPA). Glutamátergní model je taktéž nejčastěji používán k predikci antipsychotického účinku. Jako látku s potencionálním antipsychotickým účinkem, která měla normalizovat změny navozené subanestetickým ketaminem jsme na základě literatury vybrali agonistu metabotropních glutamátergních 2/3 receptorů LY379 268 v dávce 3 mg/kg (Imre et al, 2006).

V serotonergním modelu jsme použili několik dávek parciálního agonisty 5-HT_{2A/C} a 5-HT_{1A/B} receptorů 2C-B. V behaviorálních experimentech jsme použili 4 dávky 2C-B: 2,5 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg a 50 mg/kg, v qEEG experimentech pouze dávky 10 a 50 mg/kg. 2C-B patří do skupiny fenyletylaminových halucinogenů, kteří dobře modelují pozitivní příznaky, zejména deficit v sensorimotorickém zpracování. Vzhledem k tomu, že se dopamin podílí na stimulačním účinku drog, regulaci sensorimotorického zpracování a adiktivnímu potenciálu, zjišťovali jsme dále do jaké míry 2C-B stimuluje výdej dopaminu v nucleus accumbens.

V dopaminergním modelu jsem použili amfetamin v dávce 4 mg/kg. Dopaminergní modely simulují zejména pozitivní symptomatiku psychóz. Pomocí tohoto modelu je možné studovat vliv dopaminu na behaviorální a EEG změny.

C/ Test otevřeného pole – lokomoční aktivita

Test otevřeného pole je nejčastěji používaný test ke sledování spontánní aktivity zvířat. Kromě samotné lokomoce se v něm hodnotí i jiné behaviorální prvky – např. čas trávený v různých částech arény, čenichání, čištění apod. Hyperaktivita je často pozorována po

aplikaci stimulačních drog a NMDA agonistů a souvisí s nadměrnou funkcí dopaminergního systému v mesolimbické oblasti. Test otevřeného pole se skládá z čtvercové arény o rozměrech 68 x 68 x 30 cm, která je rozdělená na několik identických čtverců. Bývá umístěna v odhlučněné a rovnoměrně osvětlené místnosti. Po aplikaci látky je potkan umístěn doprostřed arény, odkud je jeho aktivita (chování, lokomoce) snímána pomocí elektronického systému Ethovision Color Pro v.3.1.1. Dále lze hodnotit lokomoci v 5-ti minutových intervalech, frekvenci výskytu a dobu strávenou v jednotlivých zónách.

D/ Test senzorického zpracování informací – prepulsní inhibice úlekové reakce (PPI ASR) a akustická úleková reakce (ASR)

PPI ASR je reakce, při které slabší akustický podnět (stimul) zeslabuje úlekovou odpověď na následný (zpravidla silnější) akustický podnět. Tato zeslabená reakce je měřítkem adaptace a její deficit naznačuje neschopnost filtrovat irelevantní podněty. PPI ASR se měřila v boxech firmy SR-LAB. Intenzita šumu pozadí byla 62 dB. Aklimatizační doba trvala 5 minut, poté následovalo sekvence 4 typů sekvencí podnětu v pseudonáhodném pořadí. 1/ úlekový podnět p120 – 120dB, 20 ms trvání; 2/ předpodnět (prepulz) + úlekový podnět pp13 – 13 dB nad šum 3/ samotný předpodnět p13 4/ žádný podnět. Celkově během jednoho pokusu bylo aplikováno 20 sekvencí s intervalem 30 sekund. Mimo prepulsní inhibici se hodnotila úleková reakce potkanů na samotný úlekový podnět (120 dB).

E/ Hodnocení elektrické aktivity pomocí kvantitativního EEG

Metodika se skládá ze tří kroků: 1/ implantace elektrod 2/ registrace EEG 3/ analýza záznamu. Kortikální elektrody implantujeme do 3 oblastí mozku – nad frontální, parietální a temporální kůru.

1/ Implantace elektrod:

Sedm dní před registrací EEG bylo potkanům v celkové isofluroanové/halothanové anestézii stereotakticky implantováno 14 stříbrných elektrod (12 aktivních + referenční + zemnicí). Elektrody byly implantovány na povrch kortexu a připevněny pomocí zubního cementu. Stereotaktické koordináty byly následující: frontální asociační kortex (F3/4): 5,0 mm anteriorně (A), $\pm 2,0$ mm laterálně (L) od bregmy, primární motorický kortex (C3/4): 2,2 mm A, $\pm 3,2$ mm L od bregmy, parietální asociační kortex (P3/4): 3,8 mm posteriorně (P), $\pm 2,5$ mm L od bregmy, parietální asociační kortex (P5/6): 4,5 mm P, $\pm 4,5$ mm L od bregmy, spánkový asociační kortex (T3/4): 3,6 mm P, $\pm 7,2$ mm L od bregmy, sekundární sluchový kortex (T5/6): 8,8 mm P, $\pm 5,8$ mm L od bregmy, referenční elektroda (REF): subdurální

lokalizace nad čichový lalok, zemní elektroda (GND): subkutánní implantace nad okcipitální oblast. Po operaci byla zvířata umístěna do vlastních akvárií, kde setrvala do dne registrace EEG.

2/ Nahrávání EEG:

V den EEG pokusu byli potkani zapojeni pomocí kabelu k digitálnímu zesilovači (BrainScope, Unimedis, Praha). Nahrávání trvalo celkem 45-100 minut v závislosti na kinetice látky. Během registrace se mohli potkani volně pohybovat po svém akváriu (boxu). Po 10 minutovém klidovém záznamu byla potkanům aplikována látka – buď ketamin nebo 2C-B. V případě registrace dvou látek (Fujakova et al, 2014) byl nejdříve administrován agonista LY379268 a teprve 10 minut poté ketamin. Pouze u studie od Fujáková et al, 2014 bylo po celou dobu registrace u potkanů zaznamenáváno chování programem Activities, kde aktivní chování zahrnovalo běhání, chození, čištění, lezení na stěnu akvária, stereotypie, třepání hlavou apod. a pasivní se skládalo z jiných, drobných aktivit/inaktivit (např. imobilita, čenichání bez pohybu těla, malé pohyby hlavou). Při podezření na spánek byli potkani buzeni. V případě použití programu Activities byly následně analyzovány úseky odpovídající jak pasivnímu, tak aktivnímu chování (pouze u glutamátergního modelu, publikace Fujakova et al, 2014)

3/ Analýza EEG signálu:

Analýza probíhala pomocí programu WaveFinder (UniMedis), kde byly odděleny úseky aktivního a pasivního chování. Během oddělování úseků byl použit příslušný FIR (Finite Impulse Response) filtr. Úseky odpovídající pasivnímu/aktivnímu chování byly následně převedeny do softwaru Neuroguide v.2.4.6 (Applied Neuroscience Inc.). Vlastní analýza zahrnovala porovnávání 2 úseků v rámci jednoho zvířete – tj. úsek před aplikací látky (tzv. kontrolní úsek, prvních 10 minut) a úsek po aplikaci látky/látek. Úseky po aplikaci látky/látek byly vybrány na základě kinetiky látek -tj. během zbývajících 65 minut (pro 2C-B 10 nebo 50 mg/kg), 35 minut (amfetamin 4 mg/kg) nebo 90 minut (ketamin, LY379268)). V každém úseku bylo pečlivě vizuálně selektováno několik epoch nejvíc odpovídající dané situaci. Vybrané epochy musely být čisté od artefaktů, s minimální délkou 30 sekund a maximální délkou 3 minuty. Po pečlivém výběru reprezentativních úseků prošla data rychlou Fourierovou transformací (FFT). Z každého analyzovaného úseku se následně vypočítaly absolutní a relativní výkonové spektra mezi 1 a 40 Hz s rozlišením 0,5 Hz. Výkonové spektra jednotlivých elektrod a elektrodových párů byly vypočítány v následujících frekvenčních pásmech: delta (1-4 Hz), theta (4-7 Hz), alfa (8-12 Hz), beta (12-25 Hz), vysoká beta (25-30

Hz) a nízká gamma (30-40 Hz). EEG koherence tj. kvantitativní měření shody mezi dvěma EEG signály naměřenými nad různými oblastmi mozku, se vypočítaly pro 30 intrahemisferálních elektrodových párů (F3-C3, F3-P3, F3-P5, F3-T3, F3-T5, C3-P3, C3-P5, C3-T3, C3-T5, P3-P5, P3-T3, P3-T5, P5-T3, P5-T5, T3-T5 na levé hemisféře a analogicky na pravé) a 6 inter-hemisferálních elektrodových párů (F3-F4, C3-C4, P3-P4, P5-P6, T3-T4, T5-T6).

F/ Farmakokinetická studie

V kinetických studiích byla potkanům intraperitoneálně aplikována jedna dávka ketaminu 30 mg/kg a následně bylo potkanům odebráno sérum a mozková tkáň v intervalech 5, 10, 20, 30, 60, 120 a 240 minut po aplikaci. Vzorky séra a mozky byly analyzovány pomocí plynové chromatografie - hmotnostní spektrometrie (GC-MS).

G/ Mikrodialyzační studie

Sedm dní před vlastní mikrodialýzou byla potkanům zavedena vodící kanyla, jejíž poloha byla 1,2 mm anteriorně, 2,0 mm laterálně a -6,0 mm vertikálně od bregmy pro nukleus accumbens shell a 2,0 mm anteriorně, 1,2 mm laterálně a -6,2 mm vertikálně od bregmy pro nukleus accumbens core. Po týdenní regeneraci byla v den experimentu zavedena dialyzační proba. Po napojení všech potkanů se daná oblast 60 minut proplachovala s 20 minutovým sbíráním dialyzátů (baseline). Po 60 minutách byla aplikována látka 2C-B 25 mg/kg s.c. a následně bylo odebráno u každého zvířete 12 vzorků (opět s 20ti minutovými intervaly). Po skončení odběru vzorků byli potkaní mozky fixovány v 10% formalínu. Následně se určila správná poloha mikrodialyzační proby. Pomocí kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie (LC-MS) byla změřena hladina dopaminu a jeho metabolitů - kyseliny homovanilové (HVA), 3-metoxytyraminu (3-MT) a kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové (DOPAC).

4. VÝSLEDKY:

A/ Glutamátergní model

Z našich výsledků vyplývá, že pouze vyšší subanestetická dávka ketaminu (30 mg/kg) způsobovala hyperlokomoci. Zároveň však obě dvě dávky (9 i 30 mg/kg) indukovaly deficit v PPI a snižovaly ASR. Agonista mGlu2/3 LY379268 3 mg/kg normalizoval ketaminem-indukovanou hyperlokomoci, avšak prohluboval ketaminem navozený deficit v PPI (u obou dávek). Samotný agonista způsoboval deficit v PPI. Změny v EEG experimentu odpovídaly farmakokinetice ketaminu – tj. nejvíc byly patrné 10-15 minut po aplikaci. Ve výkonovém spektru během kterého se *nesledovala behaviorální aktivita* (Páleníček et al, 2013), obě dvě dávky ketaminu (tj. 9 a 30 mg/kg) zvyšovaly absolutní výkon v delta, beta a gamma pásmu. Vyšší dávka navíc indukovala zvýšení ve výkonu ve všech frekvenčních pásmech nad všemi elektrodami. Při podrobné analýze vlivu chování na EEG změny se ukázalo, že v *behaviorálně aktivních úsecích* dochází ke zvýšení ve všech frekvenčních pásmech a v theta a alfa koherencích. *Analýza behaviorálně neaktivních úseků* (u ketaminu 30mg/kg) odhalila snížení v nízkofrekvenčních pásmech a zvýšení v gamma pásmu. Taktéž tato dávka způsobila povšechné snížení intra- a inter-hemisferálních koherencí (obrázek 1.). Agonista mGlu2/3 částečně normalizoval změny ve výkonovém spektru a EEG koherencích, jeho aplikace však vedla ke zvýšení koherencí ve vysokofrekvenčních pásmech.

B/ Serotonergní model

V našich pokusech jsme došli k závěru, že serotonergně působící látka 2C-B v dávkách 10mg/kg, 25mg/kg a 50 mg/kg indukovala hypolokomoci (po 15 minutách od aplikace) následovanou hyperlokomocí (po 60 minutách od aplikace). Dále jsme potvrdili, že všechny dávky 2C-B způsobily deficit v PPI a na počátku působení snižovaly úlekovou reakci. V mikrodialyzačním experimentu jsme ukázali, že látka 2C-B v dávce 25 mg/kg zvyšovala dopamin v NAc a snižovala hladinu metabolitu DOPAC a zvyšovala hladinu metabolitu HVA a 3-MT. V EEG spektrální analýze došlo k poklesu výkonu ve vysokých frekvenčních pásmech u dávky 10 mg/kg ve všech měřených intervalech. U vyšší dávky 2C-B 50 mg/kg došlo k podobným změnám jako u nižší dávky, navíc se mezi 55-65 minutou objevil nárůst výkonu v theta pásmu – tj. opět se potvrdil bifázický efekt. V koherencích byl patrná trvalá diskonekce po nižší dávce 2C-B 10 mg/kg oproti vyšší dávce. U této dávky (50 mg/kg) docházelo ke zvýšení konektivity ve vyšších částech spektra (tj u beta a gamma pásma).

C/ Dopaminerní model

V behaviorálních testech amfetamin vyvolával hyperlokomoci, snižoval ASR a způsobil deficit v PPI. Amfetamin významně zvýšil průměrný výkon v pásmech theta a alfa nad parietálními elektrodami obou hemisfér. EEG koherence byly po aplikaci látek zvýšeny zejména v pásmech theta a alfa, méně i v pásmech beta, vysoká beta a gama.

Obrázek 1. Signifikantní změny v EEG koherencích – vše porovnáváno s epochami před administrací látek. Významné změny (zvýšení/snížení) v EEG koherencích během behaviorální inaktivity u vehikula, ketaminu 30 mg/kg, LY379268 3 mg/kg a kombinace ketaminu a LY379268. Červená značí zvýšení koherencí, modrá značí snížení koherencí. Tloušťka čáry značí statistickou významnost (párový t-test).



5/ DISKUZE A ZÁVĚRY

V této práci jsem prezentovala výsledky našich studií zaměřených na farmakologické animální modely psychóz. V těchto modelech jsme hodnotili parametry chování, sensorimotorického zpracování a elektroencefalografické nálezy.

Našimi behaviorálními pokusy jsme potvrdili věrohodnost glutamátergního a serotonergního modelu schizofrenie, kdy hyperlokomoce je odrazem pozitivních symptomů psychózy (Lipska a Weinberger, 2000). Menší dávka ketaminu (9 mg/kg) navozovala hypolokomoci, která je pravděpodobně odrazem počáteční ataxie pozorované u psychedelik (Palenicek et al, 2010). Blokádu ketaminem-navozené (30 mg/kg) hyperlokomoce by mohl mít agonista mGlu2/3 receptorů potencionální antipsychotický účinek. V serotonergním modelu způsobila látka 2C-B počáteční hypolokomoci následovanou hyperlokomocí, která souvisela s očekávanou nejvyšší mozkovou koncentrací a schopností 2C-B uvolňovat dopamin (Rohanova et al, 2008). Hypolokomoce následovaná hyperlokomocí stejně jako závislost účinku na čase a dávce je popisována taktéž u jiných psychedelik (Palenicek et al, 2010).

Dále jsme potvrdili, že téměř všechny dávky 2C-B a obě dvě dávky ketaminu narušují PPI. Deficit v PPI souvisí s narušeným dopaminergním a serotonergním přenosem a reflektuje změny v informačním zpracování (Swerdlow et al, 2003). Překvapujícím zjištěním byla neschopnost agonisty mGlu2/3 receptorů nenormalizovat narušenou PPI v glutamátergním modelu. Vzhledem k tomu, že samotný agonista způsobuje deficit v PPI, lze prohloubení PPI deficitu vysvětlit jako prosté sečtení účinku těchto dvou látek.

V dalších částech našich experimentů jsme se zaměřili na to, jakým způsobem všechny farmakologické modely schizofrenie mění parametry kvantitativního EEG – spektra a koherence.

V serotonergním a dopaminergním modelu nárůst theta výkonu po 2C-B, theta/alfa výkonu po amfetaminu a pokles ve vysokofrekvenčních pásmech po aplikaci 2C-B pravděpodobně odráží jejich lokomoční aktivitu (Young 1988) a zvýšenou bdělost (Ambrosini et al. 1994). Bdělost a pozornost u potkanů zostřuje jejich vysoce vyvinutý olfaktorický systém a zároveň tvoří hipokampální theta aktivitu. Z tohoto hlediska lze usoudit, že vzhledem k tomu, že ve stejný čas dochází k nejvyššímu výdeji dopaminu odráží theta

aktivita neurobiologický substrát těchto změn. Zvýšené koherence po 2C-B 50 mg/kg (a po amfetaminu) mohou mít opět souvislost s jejich hyperlokomočním účinkem a mohou být vztahovány ke zvýšení dopaminu v NAc u psychózy. Zvýšený dopamin může napomáhat disrupci sensorimotorického zpracování (Geyer et al, 2001) a přispívat k jeho potenciálu indukovat psychotické symptomy (Vollenweider et al, 1999). Stejný účinek – tj. zvýšení celkové funkční konektivity- byl pozorován i v nedávných studiích s lidskými dobrovolníky (Driesen et al, 2013; Carhart Harris et al, 2013). Naopak snížení koherencí u dávky 2C-B 10 mg/kg se spíše jeví jako nedostatečné k navození diskonekce.

V glutamátergním modelu, kde se nesledovala behaviorální aktivita, docházelo ke zvýšení v delta a gamma pásmu, což pravděpodobně souvisí s hyperlokomocí. Podobné změny jsou pozorovány u SCHZ pacientů (Moran a Hong 2011, Venables et al, 2009). V souladu s předchozími studii (Nagy et al, 2016, Dworak et al, 2011) jsme potvrdili, že v obou našich studiích (analyzovaná vs neanalyzovaná beh. aktivita) a u všech látek vyplynulo zvýšení výkonu v gamma pásmu. Z toho lze dojít k závěru, že gamma aktivita je charakteristická pro látku samotnou a je nezávislá na behaviorální aktivitě. Zvýšení koherencí – zejména patrné u dávky 30 mg/kg – opět odpovídá spíše akutnímu psychotickému stavu pozorovaného u lidských dobrovolníků (Driesen et al, 2013; Carhart Harris et al, 2013). Zcela zásadním a novým výsledkem bylo, že analýza EEG koherencí v behaviorálně neaktivních úsecích odhalila snížení koherencí, které naopak spíše odpovídá většině studií u SCHZ pacientů. Rovněž úplně nové zjištění bylo, že agonista mGlu2/3 toto snížení v koherencích po ketaminu normalizoval.

Na základě našich experimentů můžeme konstatovat, že každý námi použité modely mohou sloužit jako modely psychózy. Z tohoto hlediska naše behaviorální a qEEG experimenty mohou taktéž přispět k testování potenciálních látek s antipsychotickými účinky.

6/ POUŽITÁ LITERATURA:

Adriano F, Caltagirone C, Spalletta G (2012). Hippocampal volume reduction in first-episode and chronic schizophrenia: a review and meta-analysis. *Neuroscientist* 18:180-200.

Ambrosini MV, Gambelunghe C, Mariucci G, Bruscelli G, Adami M, Giuditta A (1994). Sleep-wake variables and EEG power spectra in Mongolian gerbils and Wistar rats. *Physiol Behav* 56:963-968.

Arnone D, McIntosh AM, Tan GM, Ebmeier KP (2008). Meta-analysis of magnetic resonance imaging studies of the corpus callosum in schizophrenia. *Schizophr Res* 101:124-132.

Boutros NN, Arfken C, Galderisi S, Warrick J, Pratt G, Iacono W (2008). The status of spectral EEG abnormality as a diagnostic test for schizophrenia. *Schizophr Res* 99:225-237.

Carhart-Harris RL1, Leech R, Erritzoe D, Williams TM, Stone JM, Evans J, Sharp DJ, Feilding A, Wise RG, Nutt DJ. (2013) Functional connectivity measures after psilocybin inform a novel hypothesis of early psychosis. *Schizophr Bull.* Nov;39(6):1343-51

Driesen NR, McCarthy G, Bhagwagar Z, Bloch M, Calhoun V, D'Souza DC, Gueorguieva R, He G, Ramachandran R, Suckow RF, Anticevic A, Morgan PT, Krystal JH (2013). Relationship of resting brain hyperconnectivity and schizophrenia-like symptoms produced by the NMDA receptor antagonist ketamine in humans. *Mol Psychiatry* 18:1199-1204.

Dworak M, McCarley RW, Kim T, Basheer R (2011). Delta oscillations induced by ketamine increase energy levels in sleep-wake related brain regions. *Neuroscience* 197:72-79.

Friston KJ (1998). The disconnection hypothesis. *Schizophr Res* 30:115-125.

Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156:117-154.

Horacek J. (2005) Neurobiologie působení halucinogenních látek. *Adiktologie* August, 5(2), 134-150

Imre G, Salomons A, Jongsma M, Fokkema DS, Den Boer JA, Ter Horst GJ (2006). Effects of the mGluR2/3 agonist LY379268 on ketamine-evoked behaviours and neurochemical changes in the dentate gyrus of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 84:392-399.

Lipska BK, Weinberger DR (2000). To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23:223-239.

Lynall ME, Bassett DS, Kerwin R, McKenna PJ, Kitzbichler M, Muller U, Bullmore E.(2010). Functional connectivity and brain networks in schizophrenia. *J Neurosci.* 2010 Jul 14;30(28):9477-87

Micheloyannis S, Pachou E, Stam CJ, Breakspear M, Bitsios P, Vourkas M, Erimaki S, Zervakis M.(2006) Small-world networks and disturbed functional connectivity in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2006 Oct;87(1-3):60-6.

- Moran LV, Hong LE (2011). High vs low frequency neural oscillations in schizophrenia. *Schizophr Bull* 37:659-663.
- Nagy D, Stoiljkovic M, Menniti FS, Hajós M. Differential Effects of an NR2B NAM and Ketamine on Synaptic Potentiation and Gamma Synchrony: Relevance to Rapid-Onset Antidepressant Efficacy. *Neuropsychopharmacology*. 2015 Sep 25.
- Palenicek T, Hlinak Z, Bubenikova-Valesova V, Novak T, Horacek J (2010). Sex differences in the effects of N,N-diethyllysergamide (LSD) on behavioural activity and prepulse inhibition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:588-596.
- Pettersson-Yeo W, Benetti S, Marquand AF, Dell'acqua F, Williams SC, Allen P, Prata D, McGuire P, Mechelli A (2013). Using genetic, cognitive and multi-modal neuroimaging data to identify ultra-high-risk and first-episode psychosis at the individual level. *Psychol Med* 43:2547-2562.
- Rohanova M, Palenicek T, Balikova M (2008). Disposition of 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) and its metabolite 4-bromo-2-hydroxy-5-methoxyphenethylamine in rats after subcutaneous administration. *Toxicol Lett* 178:29-36.
- Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW (2001). A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res* 49:1-52.
- Shepherd AM, Matheson SL, Laurens KR, Carr VJ, Green MJ (2012). Systematic meta-analysis of insula volume in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 72:775-784.
- Stephan KE, Magnotta VA, White T, Arndt S, Flaum M, O'Leary DS, Andreasen NC (2001). Effects of olanzapine on cerebellar functional connectivity in schizophrenia measured by fMRI during a simple motor task. *Psychol Med* 31:1065-1078.
- Sun Y, Farzan F, Barr MS, Kirihara K, Fitzgerald PB, Light GA, Daskalakis ZJ (2011). gamma oscillations in schizophrenia: mechanisms and clinical significance. *Brain Res* 1413:98-114.
- Swerdlow NR, Stephany N, Wasserman LC, Talledo J, Shoemaker J, Auerbach PP (2003). Amphetamine effects on prepulse inhibition across-species: replication and parametric extension. *Neuropsychopharmacology* 28:640-650.
- Venables NC, Bernat EM, Sponheim SR (2009). Genetic and disorder-specific aspects of resting state EEG abnormalities in schizophrenia. *Schizophr Bull* 35:826-839.
- Vollenweider FX, Vontobel P, Hell D, Leenders KL (1999). 5-HT modulation of dopamine release in basal ganglia in psilocybin-induced psychosis in man--a PET study with [¹¹C]raclopride. *Neuropsychopharmacology* 20:424-433.
- Young GA (1988). Relationship between amphetamine-induced effects on EEG power spectra and motor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 30:489-492.

7/ SEZNAM PUBLIKACÍ

Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace:

Fujáková, M., Páleníček, T., Brunovský, M., Gorman, I., Tylš, F., Kubešová, A., Řířpová, D., Krajča, V., Horáček, J. The effect of ((-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid (LY379268), an mGlu2/3 receptor agonist, on EEG power spectra and coherence in ketamine model of psychosis. *Pharmacol Biochem Behav* 2014; 122C: 212-221. **IF (2013) 2.820**

Páleníček, T., **Fujáková, M.**, Brunovský, M., Horáček, J., Gorman, I., Balířková, M., Rambousek, L., Syslová, K., Kačer, P., Zach, P., Bubenířková-Valešová, V., Tylš, F., Kubešová, A., Puskarčířková, J., Höschl, C. Behavioral, Neurochemical and Pharmacology-EEG Profiles of the Psychedelic Drug 4-bromo-2,5-dimethoxyphenethylamine (2C-B) in Rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2013; 225 (1): 75-93. **IF (2013) 3.988**

Páleníček T., **Fujáková M.**, Brunovský M., Balířková M., Horáček J., Gorman I., Tylš F., Tišlerová B., Šoš P., Bubenířková-Valešová V., Höschl C., Krajča V. Electroencephalographic Spectral and Coherence Analysis of Ketamine in Rats: Correlation with Behavioral Effects and Pharmacokinetics. *Neuropsychobiology*, 2011; 63:202-218 **IF (2011) 2.147**

Fujáková, M., Páleníček, T., Bubenířková-Valešová, V., Horáček, J. Ketamin – klinické a experimentální využití a zneužívání. *Psychiatrie*, 2010; 14(1): 47-53.

Páleníček, T., **Fujáková, M.**, Tylš, F., Kubešová, A., Brunovský, M., Horáček, J. Srovnání vlivu halucinogenů psilocinu a mezkalinu na kvantitativní EEG a senzomotorické zpracování informací - animální model psychózy. *Psychiatrie* 2011; 15 (suppl. 2): 44-48.

Publikace in extenso, které nejsou podkladem disertace:

Tylš F, Páleníček T, Kadeřábek L, **Lipski M**, Kubešová A, Horáček J. Sex differences and serotonergic mechanisms in the behavioural effects of psilocin. *Behav Pharmacol.* 2016 Jun;27(4):309-20 **IF (2015) 2.000**

Páleníček, T., Balířková, M., Rohanová, M., Novák, T., Horáček, J., **Fujáková, M.**, Höschl, C. Behavioral, hyperthermic and pharmacokinetic profile of para-methoxymethamphetamine (PMMA) in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010; **IF (2010) 2.967**

Kubesova, A., Tejkalova, H., Syslova, K., Kacer, P., Vondrousova, J., Tyls, F., **Fujakova, M.**, Palenicek, T., Horacek, J. Biochemical, histopathological and morphological profiling of a rat model of early immune stimulation: relation to psychopathology. PLoS ONE 2015; 10(1): e0115439. **IF (2013) 3.534**

Sirova J, Kristofikova Z, Vrajova M, **Fujakova-Lipski M**, Ripova D, Klaschka J, Slamberova R. Sex-Dependent Changes in Striatal Dopamine Transport in Preadolescent Rats Exposed Prenatally and/or Postnatally to Methamphetamine. Neurochem Res. 2016 Aug;41(8):1911-23. **IF (2015) 2.68**

Fujáková, M., Kopeček M.: Antidepressiva - od teorie ke klinické praxi. Klin Farmakol Farm 2012; 26(1): 29-37

Nováková, P., Tylš, F., Kubešová, A., Kadeřábek, L., **Fujáková, M.**, Páleníček, T. Role kanabinoidů a kanabinoidního systému v indukci, neurobiologii a terapii psychotických onemocnění. Psychiatrie, 2014; 18(4):186-192.