

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Neurovědy



PharmDr. Iva Prokopová

**Neurofarmakologie prostorové navigace a testy
koordinace a flexibility v animálních modelech**

Neuropharmacology of spatial navigation, cognitive
coordination and flexibility tests in animal models

Disertační práce

Školitel: Doc. RNDr. Aleš Stuchlík, PhD

Praha, 2014

Prohlášení:

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

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

V Praze, 1.5.2014

Iva Prokopová

Identifikační záznam:

PROKOPOVÁ, Iva. *Neurofarmakologie prostorové navigace a testy koordinace a flexibility v animálních modelech*. [Neuropharmacology of spatial navigation, coordination and flexibility tests in animal models]. Praha, 2014. 97 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Fyziologický ústav, Akademie věd České republiky. Školitel Stuchlík, Aleš.

Poděkování

Ráda bych poděkovala Doc. Aleši Stuchlíkovi, mému školiteli, za jeho odborné vedení, profesionální a zároveň velmi lidský přístup, cenné rady a podporu během celého mého PhD studia. Velice obdivuji jeho vědeckou práci, je pro mě největší inspirací pro můj vlastní výzkum.

Velký dík patří mému nejbližšímu kolegovi, Mgr. Tomášovi Petráskovi, za jeho praktické rady, vědecké nadšení a spolupráci během experimentů. Za podporu během studia a rady při experimentální činnosti také děkuji Dr. Karlovi Valešovi.

V neposlední řadě děkuji všem spolupracovníkům a přátelům z Oddělení neurofyziologie paměti a také své rodině a kamarádům za jejich velkou podporu.

Abstrakt

Prostorová navigace, koordinace a behaviorální flexibilita patří mezi kognitivní funkce, které bývají často narušené u mnoha neuropsychiatrických onemocnění. K jejímu studiu slouží animální modely s farmakologickou či genetickou manipulací, jež lze testovat v behaviorálních úlohách. Naším prvním cílem bylo objasnit vliv interakce mezi β -adrenergním a α_1 -adrenergním či D₂-dopaminergním systémem na kognitivní funkce potkanů. V obou případech došlo k narušení prostorové navigace a koordinace zvířat již při koaplikaci subterapeutických dávek daných antagonistů. Naše poznatky mohou mít dopad i na klinickou praxi vzhledem k rozšíření daných typů látek.

Další studie byla zaměřená na určení efektu MK-801 (model schizofrenie) na behaviorální flexibilitu v bludišti Kolotoč a Morrisově vodním bludišti (MWM). Bludiště Kolotoč se zdá být senzitivnější na daný deficit, došlo k narušení výkonu potkanů již od dávek 0,08 mg/kg oproti 0,10 mg/kg v MWM. Naše nejnovější práce zkoumala vliv redukované exprese Nogo-A proteinu na prostorovou navigaci a behaviorální flexibilitu potkanů. Baterie testů v bludišti Kolotoč prokázala poškození daných parametrů, v MWM nebylo pozorováno poškození pracovní paměti. Nogo-A *knock-down* potkani mohou představovat endofenotyp podobný schizofrenii.

Klíčová slova: prostorová navigace, behaviorální flexibilita, adrenalin, dopamin, interakce, MK-801, Nogo-A, schizofrenie

Abstract

Spatial navigation, cognitive coordination and behavioral flexibility belong amongst cognitive functions, which play a role in many neuropsychiatric disorders. Behavioral tasks have proved to be useful paradigms to test these functions in pharmacological or genetic animal models. First aim was to determine a potential interaction between β -adrenergic and α_1 -adrenergic or D₂-dopaminergic systems. Spatial navigation and coordination were impaired in both studies during co-application of subthreshold doses of drugs. Used substances belong to group of widely prescribed drugs, thus our results could be implicated in clinical practice.

Another study examined an acute effect of MK-801 (animal model of schizophrenia) on behavioral flexibility in Carousel maze and the Morris water maze (MWM). Carousel maze showed higher sensitivity with impairments from 0.08 mg.kg⁻¹ compared to 0.10 mg.kg⁻¹ in MWM. The final experiment aimed at testing the effect of reduced expression of Nogo-A protein on spatial navigation and behavioral flexibility of rats. A battery of tests in the Carousel maze revealed impairment in cognitive functions, MWM showed unaffected working memory of rats. Our results support the hypothesis linking Nogo-A *knock-down* rats with neuropsychiatric symptoms and cognitive disorders.

Key words: spatial navigation, behavioral flexibility, adrenalin, dopamine, interaction, MK-801, Nogo-A, schizophrenia

Seznam zkratek

ADHD	<i>Attention deficit hyperactivity disorder</i> , hyperaktivita s poruchou pozornosti
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervová soustava
COMT	katechol-O-metyltransferáza
Glu	glutamát
GABA	kyselina gama-amino-máselná
L2	transgenní potkani s <i>down-regulací</i> proteinu Nogo-A (linie 2)
LC	locus coeruleus
LTD	long term depression (dlouhodobá deprese)
LTP	long term potentiation (dlouhodobá potenciace)
MAO	monoaminoxidáza
MWM	Morrisovo vodní bludiště
mGluR	metabotropní glutamátový receptor
NA	noradrenalin
NMDA	<i>N</i> -metyl- <i>D</i> -aspartát
PFC	prefrontální kůra (<i>prefrontal cortex</i>)

Obsah

I. Obecná část	9
1. Úvod.....	9
2. Neuropřenašečové systémy mozku využívající biogenní aminy	11
2.1 Dopamin.....	12
2.2 Noradrenalin.....	21
3. Glutamátergní systém.....	33
4. Animální modely schizofrenie	46
4.1 Farmakologické modely schizofrenie	48
4.2 Neurovývojové modely schizofrenie	50
4.3 Genetické modely schizofrenie	51
II. Cíle práce	53
III. Vložené články.....	56
IV. Diskuze	57
V. Závěr.....	69
VI. Seznam literatury	71
VII. Seznam publikovaných prací autorky.....	96

I. Obecná část

1. Úvod

Kognitivní funkce organismu zajišťují zpracování vnitřních i vnějších informací a zahrnují širokou skupinu mentálních procesů, mezi něž náleží například bdělost, pozornost, učení, paměť, motivace, vnímavost, flexibilita, koordinace, plánování a schopnost rozhodování. Mohou být vědomé i nevědomé a jejich společnou vlastností je závislost na účasti mnoha systémů neuropřenašečů a neuromodulátorů v různých částech mozku, selektivně distribuovaných v mozkových okruzích a strukturách. O významu neuroaktivních látek pro vyšší nervovou činnost svědčí projevy psychiatrických či neurodegenerativních onemocnění, které se vyskytují při jejich narušení (Carlsson et al., 1999; Myhrer, 2003).

Přestože tradičně byl za hlavní klíčovou molekulu determinující složku kognitivních funkcí považován cholinergní systém, nelze zpochybnit, že také ostatní mediátory s tímto systémem významně interagují, případně zajišťují specifické kognitivní činnosti v kooperaci s dalšími neuromediátorovými systémy. Mezi nejdůležitější modulátory kognice náleží též systém biogenních aminů (noradrenalin, dopamin) a glutamátergní systém, který je přímo zodpovědný za zpracování informací v mozku (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Stanford, 2001). O jejich roli bude pojednáno níže.

Základní experimentální nástroj pro sledování kognitivních funkcí představují behaviorální úlohy. Zabývají se animálními modely, které reprezentují vyšší kognitivní funkce lidí (např. paměť, flexibilita, koordinace). Tyto funkce lze testovat řadou úloh. Používané aparatury se obecně nazývají bludiště a objevují se v mnoha modifikacích, navržených pro studium konkrétních schopností sledovaného zvířete.

Pro studium krátkodobé i dlouhodobé paměti, prostorové koordinace či behaviorální flexibility jsme v našich experimentech využili Morrisovo vodní bludiště a bludiště Kolotoč (zvané též jako úloha aktivního vyhýbání se místu). Morrisovo vodní bludiště vyžaduje prostorovou navigaci a učení, které je závislé na koordinaci různých oblastí mozku a neurotransmitterových systémů. Zároveň patří již

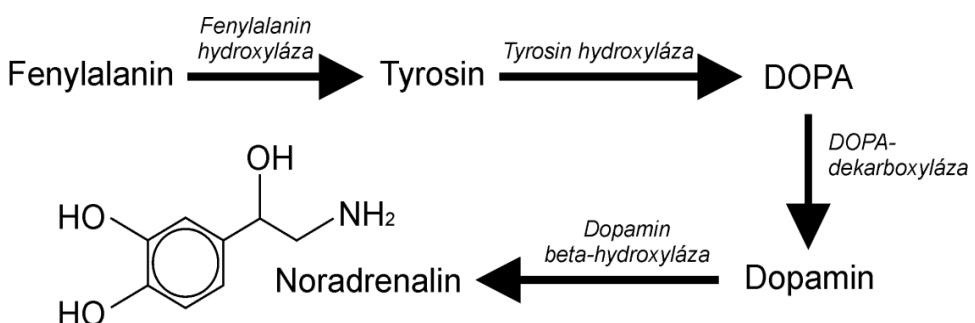
tří desítky let k nejčastěji využívaným laboratorním nástrojům behaviorálních neurověd, slouží k validaci zvířecích modelů pro kognitivní choroby, případně jejich léčbu (Hooge and Deyn, 2001). Baterie testů v bludišti Kolotoč je závislá na kontinuálním zpracovávání odlišných prostorových rámci a jejich segregaci, v různě upravených variantách pak klade zvláštní důraz na behaviorální flexibilitu (Abdel Baki et al., 2009).

K objasnění funkcí mozkových neuromediátorů a bližšímu studiu kognitivních funkcí včetně jejich ovlivnění lze použít animální modely. Tyto modely byly primárně založeny na manipulaci se systémy neurotransmitterů podílejících se na rozvoji konkrétního onemocnění (např. glutamátergní systém v patologii schizofrenie, GABA-ergní systém v patologii anxiety). Přibývají však také modely cílené na specifické proteiny mozku, ve snaze objasnit jejich úlohu v etiologii daného onemocnění (např. Nogo-A protein a jeho vliv na neuropsychiatrické onemocnění).

2. Neuropřenašečové systémy mozku využívající biogenní aminy

Dopamin (4-(2-aminoethyl)benzen-1,2-diol) a noradrenalin (1- β -3,4-dihydroxyphenyl- α -ethanolamin) patří do skupiny neuromediátorů nazývaných katecholaminy. Jejich strukturu tvoří benzenový kruh s dvěma navázanými hydroxylovými skupinami (zvaný též katechol) a postranní řetězec s aminovou skupinou.

Syntézu katecholaminů jako první popsal roku 1939 německo-britský biochemik a farmakolog Hermann Blaschko. Daný sled reakcí vychází z aminokyselin fenylalaninu a L-tyrosinu (Obr.1) a probíhá za pomocí enzymů, které jsou exprimovány v těle neuronu a následně anterográdně transportovány k nervovým zakončením. V těchto terminálách je pak syntetizován samotný neuropřenašeč.



Obrázek 1 Syntéza dopaminu a noradrenalinu (Prokopová, 2010)

Tvorba noradrenalinu je úzce spjatá s předchozí syntézou dopaminu, neboť vzniká jeho dekarboxylací *dopamin beta-hydroxylázou* na norepinefrin (neboli noradrenalin). Tato oxidáza je přednostně exprimována v noradrenergních neuronech a představuje klíčový rozdíl v enzymatických reakcích mezi dopaminergními a noradrenergními neurony. V některých neuronech centrální nervové soustavy (CNS) a také chromaffinních buňkách dřeně nadledvin je noradrenalin dále přeměňován N-methylací na adrenalin, přenašeč periferní nervové soustavy (Vallone et al., 2000).

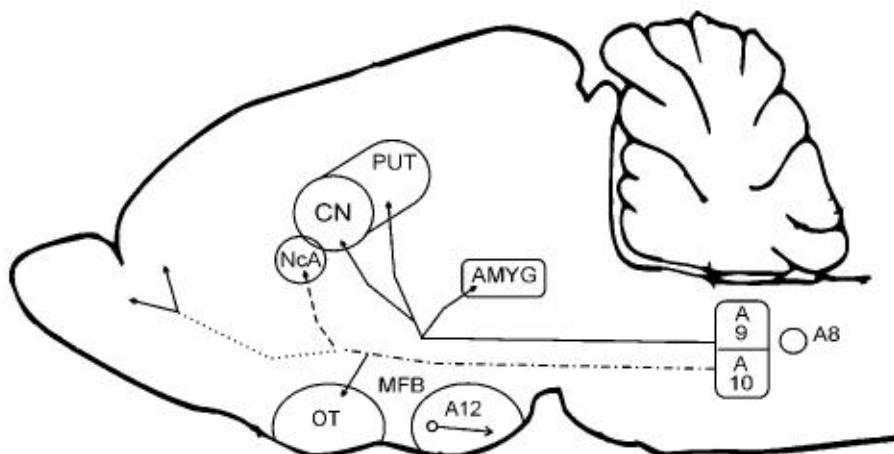
Na degradaci katecholaminů se podílí *monoaminoxidáza* (MAO) a *katechol-O-methyltransferáza* (COMT). MAO-A je enzym přítomný v dopaminových a noradrenalinových neuronech a preferenčně katalyzuje oxidativní deaminaci noradrenalinu, adrenalinu, serotoninu a melatoninu, zatímco MAO-B se nachází v serotonergních neuronech a degraduje preferenčně benzylamin a fenylethylamin. Obě formy pak deaminují dopamin, tyramin a tryptamin. MAO metabolizuje nor/adrenalin na 3,4-dihydroxymandlovou kyselinu a dopamin na 3,4-dihydroxyfenyloctovou kyselinu. Katechol-O-methyltransferáza (COMT) společně metabolizuje noradrenalin na normetanefrin a dopamin na kyselinu homovanilovou (Stanford, 2001; Webster, 2001).

Za zmínku také stojí carbidopa (α -methyldopa hydrazine) a benserazid, které blokují přeměnu levodopy na dopamin. Využívají se v kombinaci s levodopou v léčbě Parkinsonovy choroby, neboť zabraňují vzniku dopaminu na periferii (sami nepřechází mozkomíšní bariérou), snižují tak nežádoucí účinky léčby a zároveň zvyšují množství levodopy a dopaminu v CNS.

2.1 Dopamin

Jméno tohoto nejčetnějšího mozkového katecholaminu bylo odvozeno od levodopy (L-DOPA), která sloužila v roce 1910 jako prekurzor v Barger-Ewensově syntéze, první reakci, jež dopamin popsala. Zprvu byl však považován za pouhý prekurzor noradrenalinu a adrenalinu, jako o neurotransmitteru se o něm začalo uvažovat až o téměř 50 let později (Carlsson et al., 1957). Díky tomuto významnému objevu se dostalo švédskému farmakologovi Arvidovi Carlssonovi Nobelovy ceny za fyziologii a medicínu (Carlsson, 2000).

Dopamin představuje přibližně 80 % všech katecholaminů vyskytujících se v mozku. Z místa svého vzniku se distribuuje čtyřmi základními dráhami (Obr. 2) – nigrostriatální, mezolimbickou, mezokortikální a tuberoinfundibulární, které vedou ze skupin dopaminergních buněk A9 (nigrostriatální dráha), A10 (mezolimbická a mezokortikální dráha, někdy souhrnně pojmenované jako mezokortikolimbická dráha) a A12 (tuberoinfundibulární dráha). Nejvíce dopaminergních buněk (tj. přibližně 400 000) nalezneme v jádru A9, které tvoří *zona compacta* – dorzální část *substantia nigra* (Vallone et al., 2000; Webster, 2001).



Obrázek 2 Dopaminergní dráhy v mozku (Webster, 2001) AMYG – amygdala, CN – *nucleus caudatus*, MFB – *medial forebrain bundle*, NcA – *nucleus accumbens*, OT – *tuberculum olfactorium*, PUT – *putamen*, SN – *substantia nigra*

Dopaminergní neurony jsou zapojeny do mnoha životně důležitých funkcí centrální nervové soustavy, jako jsou příjem potravy, systém motivace a odměny, učení a paměť, volný pohyb, spánek, impulsivnost, emoce nebo například pozornost. V periferii hraje dopamin důležitou fyziologickou roli v regulaci čichových funkcí, funkcí retiny, hormonů, kardiovaskulární soustavy, sympatického systému, imunitního systému, renálních funkcí aj. (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

Projekce nigrostriatální dráhy vycházejí z jader v mesencephalu, ze *substantia nigra compacta*, které inervují dorzální striatum (*nc. caudatus – putamen*). Tyto neurony jsou zapojeny do kontroly pohybu. Z oblasti ventrálního tegmenta vycházejí neurony dráhy mezokortikální, které inervují různé regiony frontální kůry. Jsou zapojené do procesů spojených s učením a utvářením paměti. Neurony ventrálního tegmenta také projikují do *nucleus accumbens*, *tuberculum olfactorium* a částí limbického systému. Tato dráha se nazývá mesolimbická a účastní se například behaviorálních procesů spojených s motivací a odměnou.

Další separátní dopaminová dráha začíná neurony oblasti A12 v *nucleus arcuatus* a periventrikulární oblasti hypothalamu a formuje tuberoinfundibulární trakt vedoucí k hypofýze. Dopamin uvolněný hypothalamo-hypofyzárním portálním systémem inhibuje laktotrof, buňky vylučující prolaktin (Vallone et al., 2000).

Dopaminergní dysfunkce

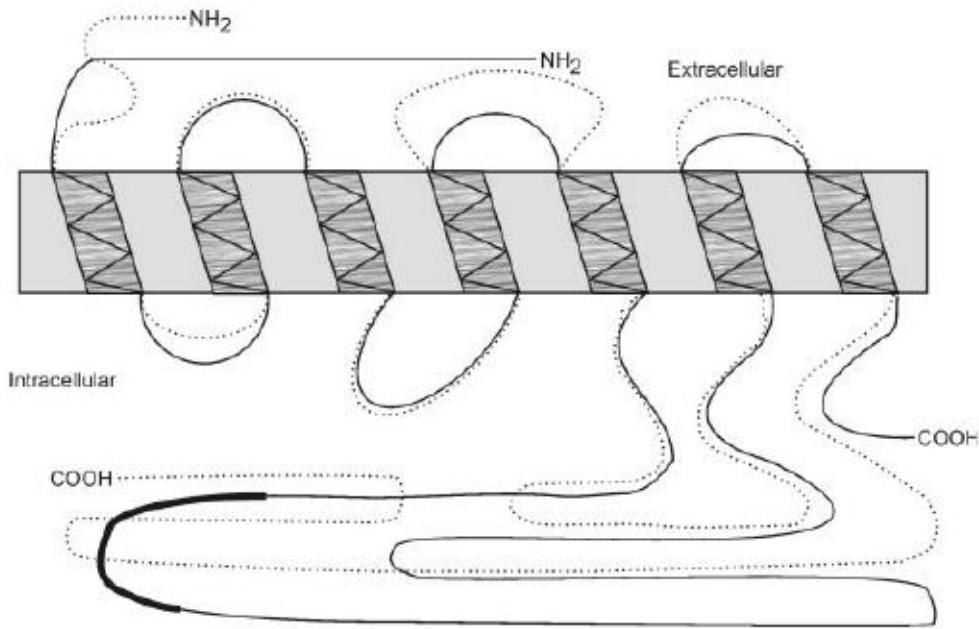
Vzhledem k zapojení dopaminergních drah do mnoha fyziologických funkcí, není překvapením, že jejich abnormality ústí v celou řadu neurologických onemocnění. Jednou z nejlépe a nejdéle studovanou nemocí související s úbytkem dopaminergních neuronů v *substantia nigra*, místa s nejvyšší koncentrací dopaminergních inervací, je Parkinsonova choroba. Experimenty s léčbou tohoto onemocnění nalezneme také na pozadí objasnění funkce samotného dopaminu jako neurotransmiteru (Carlsson A., 2000).

Psychotomimetický efekt dopaminergních drog zároveň s faktem, že většina klinicky používaných antipsychotik blokuje D₂ receptory, přispěl ke vzniku dopaminergní hypotézy schizofrenie. Poruchy v regulaci dopaminu se podílí na patologii ADHD (*attention deficit hyperactivity disorder* – hyperaktivita s poruchou pozornosti) a Gilles de la Touretteova syndromu (Snyder et al., 1970). Zranitelnost specifických neuronů striata se objevuje u pacientů s Huntingtonovou chorobou. Abnormální plasticitu systému odměny, taktéž spojeného s dopaminem, nalezneme u závislostí a zneužívání drog, poruchy v dopaminergní signalizaci pak u bipolární poruchy, deprese, dyskinezí, ale také u somatických onemocnění - hypertenze, poruchy ledvin aj. (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Dailly et al., 2004).

Dopaminové receptory

Účinky dopaminu, ať už se jedná o volní pohyb nebo například ovlivnění krevního tlaku, zprostředkovávají specializované receptory (Obr.3). Charakterizuje je 7 transmembránových domén a jsou spřažené s G-proteiny (guanin-nukleotid regulační protein).

Rozlišujeme celkem 5 typů dopaminových receptorů, které na základě svých biochemických a farmakologických vlastností dále spadají do dvou podtříd: *D₁-like* receptory (tj. D₁ a D₅ receptory – původně zvané také jako D_{1B}) a *D₂-like* receptory (tj. D₂, D₃ a D₄ receptory). Tato klasifikace byla založena na biochemických pozorováních, která prokázala, že dopamin může modulovat aktivitu adenylylcyclázy (Sealfon and Olanow, 2000; Vallone et al., 2000).



Obrázek 3 Struktura dopaminových receptorů (Webster, 2001) Obrázek D₁ (přerušovanou čára) a D₂ (plná čára) receptoru zdůrazňuje hlavní rozdíly mezi extra- a intracelulárními kličkami mezi transmembránovými částmi 5 a 6 a C-terminálním koncem, který je mnohem delší u D₁-receptorů v porovnání s D₂. Tučně zvýrazněná část kličky D₂-receptoru reprezentuje sekvenci aminokyselin, která chybí u krátké formy tohoto receptoru.

Receptory skupiny D₁ aktivují G_{as/olf} rodinu G-proteinů, čímž stimulují adenylcyklázu a zvyšují tak produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Receptory D_{2-like} působí skrze G-proteiny G_{ai/o}, inhibují tedy adenylcyklázu a snižují množství cAMP (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

C-konec dopaminových receptorů v obou podtřídách obsahuje místa fosforylace (a palmitoylace), která jsou pravděpodobně zodpovědná za receptorovou desenzitizaci agonisty. Dopaminergní ligandy se ve většině případů odlišují vazbou k D_{1-like} nebo D_{2-like} skupině receptorů, v rámci dané podtřídy již však nebývají natolik specifické (Vallone et al., 2000). Dopamin aktivuje receptory D₁ až D₅ s různou afinitou (v rozsahu nanomolární až mikromolární koncentrace).

D₁ receptory

Geny pro D₁ receptory jsou v nejvyšší míře exprimovány v nigrostriatální, mesolimbické a mesokortikální oblasti, jako jsou *nucleus caudatus-putamen* (striatum), *nucleus accumbens*, *substantia nigra*, *tuberculum olfactorium*, amygdala, frontální kůra, a v menší míře také v hipokampu, mozečku, thalamu a hypothalamu (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Vallone et al., 2000; Webster, 2001).

Aktivace D₁ receptorů, exprimovaných na postsynaptických neuronech, má stimulační efekt na pohybovou aktivitu. Navíc jejich stimulace je nezbytná pro plnou manifestaci lokomotorické aktivity zprostředkované D₂ receptory (ne však naopak) (Vallone et al., 2000; White et al., 1988).

Spolupráci D₁ a D₂ dopaminových receptorů můžeme pozorovat i v procesech učení a paměti, dlouhodobé potenciace a konsolidace paměťové stopy v oblasti prefrontální kůry (PFC), při níž dochází k interakci s GABA interneurony (Xu and Yao, 2010). Naopak při dlouhodobé potenciaci na synapsích mezi hipokampem a PFC se zdají být klíčovými receptory D₁, které v tomto případě kontrolují NMDA receptory zprostředkovanou synaptickou odpověď na specifické excitační vstupy do PFC (Gurden et al., 2000; Takahashi et al., 2008). Další výzkumy naznačují, že středně silná D₁ blokáda může posílit paměťové mechanismy v prefrontálních pyramidálních neuronech, zatímco příliš slabá nebo silná blokáda je ruší (tuto regulaci lze vyjádřit tzv. inverzní U-křivkou), dopamin zajišťuje integritu pracovní paměti (Floresco, 2013; Stuchlik and Vales, 2006; Williams and Castner, 2006).

D₁ receptory, společně s D₂ a D₃ receptory, jsou také nezbytnou složkou mechanismu odměny a závislosti, jejichž patologie se uplatňuje u drogově závislých (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Sokoloff et al, 2006).

D₂ receptory

Nejvyšší hladiny D₂ receptorů pozorujeme podobně jako D₁ receptorů ve striatu, *nucleus accumbens*, *tuberculum olfactorium*, nacházejí se také v *substantia nigra*, amygdale, ventrálním tegmentu, hypothalamu, kortexu, septu, hipokampu a dokonce také v epifýze (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Vallone et al., 2000; Webster, 2001).

Role D₂ receptorů (podobně jako D₃ receptorů) je poměrně komplexní, neboť závisí na aktivaci presynaptických či postsynaptických receptorů. Presynaptické autoreceptory poskytují negativní zpětnou vazbu, která upravuje neuronální výboje, syntézu a uvolňování neurotransmiterů v závislosti na změnách extracelulárních koncentrací těchto látek (Sibley, 1999). Aktivace presynaptických D₂ receptorů tedy

logicky vede k poklesu uvolňování dopaminu a tak i například k poklesu lokomotorické aktivity, zatímco stimulace postsynaptických receptorů tuto aktivitu zvyšuje. D₂ receptory se zdají být predominantním typem autoreceptorů ovlivňující presynaptickou regulaci uvolňování a syntézy dopaminu (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). Je také známo, že k aktivaci presynaptických D₂ autoreceptorů dostačují nižší koncentrace agonisty než k aktivaci postsynaptických receptorů. Často tedy dochází k tzv. bifázickému efektu, kdy nízké dávky podané substance aktivitu potlačují, zatímco vyšší koncentrace způsobí behaviorální aktivaci (Beaulieu and Gainetdinov, 2011).

D₂ receptory kromě jiného ovlivňují také kognici, zprostředkovávají efekt dopaminu na mnemonické funkce, účastní se procesů prostorového učení a dlouhodobé potenciace během konsolidace paměti a také jsou zapojeny do regulace uvolňování acetylcholinu v hipokampusu (Fujishiro et al., 2005; Xu and Yao, 2010), modulují činnost frontálního laloku (dráhy hipokampus-PFC) a jsou tedy zároveň nezbytné pro exekutivní funkce včetně pracovní paměti (Takahashi et al., 2008).

Jednou z příčin rozvoje pozitivních příznaků schizofrenie (deziluze, halucinace aj.) se zdá být zvýšená senzitivita D₂ receptorů či jejich odlišné množství, například snížení počtu presynaptických D₂ receptorů v thalamu schizofreniků nebo zvýšený výskyt tzv. D_{2High} receptorů – receptorů ve stavu zvýšené affinity či funkčnosti (Seeman and Seeman, 2014). Klinicky se také využívá fakt, že antagonisté D₂ receptorů (včetně antipsychotik) mají antiemetický efekt, agonisté D₂ receptorů (např. bromokryptin) redukují hladinu prolaktinu (Webster, 2001).

D₃ receptory

D₃ receptory nejsou tak široce distribuovány v mozkové tkáni, nalezneme je však v limbické oblasti, tj. v zevní části *nucleus accumbens*, *tuberculum olfactorium*, Callejových ostrůvcích, hypothalamu a odlehlych oblastech thalamu a mozečku. Dále se vyskytují v oblasti *substantia nigra compacta*, což signalizuje jejich presynaptické uložení (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Sokoloff et al., 2006; Vallone et al., 2000; Webster, 2001).

D_3 receptory působící jako autoreceptory regulují aktivitu dopaminových neuronů, např. senzitizaci k působení nepřímých agonistů dopaminu. Tento proces se zdá být původcem nežádoucích účinků levodopy (dyskinezia) při léčbě Parkinsonovy choroby, nebo také hraje roli při navykání si na drogu u závislých jedinců. D_3 receptor zřejmě také zprostředkovává behaviorální abnormality způsobené blokádou glutamátových NMDA receptorů, což předurčuje jeho selektivní antagonisty jako slibná nová antipsychotika, případně léky drogově závislých (Heidbreder, 2008; Sokoloff et al., 2006). Co se týče pohybové aktivity, D_3 receptor zajišťuje středně silnou inhibici lokomoce, buď působením negativní zpětnou vazbou nebo skrze své postsynaptické receptory (Sibley, 1999).

D₄ receptory

D_4 receptor má z dopaminových receptorů nejnižší míru exprese v mozku. Tento typ receptorů byl dokumentován ve frontální kůře, amygdale, hipokampusu, hypothalamu, *globus pallidus*, *substantia nigra pars reticulata* a v thalamu. Společně s D_1 a D_2 receptory se nachází také v retině (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Vallone et al., 2000; Webster, 2001). Jelikož D_4 receptory (ani D_5 receptory) nejsou příliš hojně zastoupeny v primárních motorických oblastech mozku, jejich role v kontrole pohybu se zdá být minimální (Sibley, 1999).

Zajímavé je však jeho zastoupení právě v PFC, klíčové oblasti pro kognici a emocionální procesy, kde hraje roli u rozmanitých mentálních poruch (např. u ADHD nebo schizofrenie). Nedávno byl také popsán mechanismus homeostatické regulace synaptické transmise AMPA-receptory (AMPA - kyselina amino-hydroxy-methyl-isoxazol-propionová) v pyramidálních neuronech PFC právě prostřednictvím D_4 receptorů (Yuen et al., 2013). Polymorfismus D_4 receptorů a genů pro zpětný návrat dopaminu (DAT) se podílí na vzniku ADHD, svou roli však také hraje porucha regulace noradrenalinu a serotoninu (Vallone et al., 2000).

D₅ receptory

Geny D_5 receptorů jsou exprimované v menším množství v rozličných mozkových oblastech, včetně pyramidálních neuronů PFC, v premotorické kůře, kůře cingula, entorhinální kůře, *substantia nigra*, hypothalamu, thalamu, hipokampusu

a *gyrus dentatus* (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Vallone et al., 2000; Webster, 2001). Jejich fyziologická role zatím nebyla uspokojivě objasněna, ve studiích bývají navíc často užívány substance ovlivňující celou skupinu D₁-like receptorů.

Centonze et al (2003) popisuje ve své studii dopaminových receptorů ve striatu určité odlišnosti mezi D₁ a D₅ receptory. Zatímco ablace D₁ receptorů poškodila kortikostriatální dlouhodobou potenciaci (LTP), farmakologická blokáda D₅ receptorů zabránila dlouhodobé depresi (LTD). Blokáda D₁ a D₅ receptorů jejich společným antagonistou SCH23390 snížila lokomoční aktivitu u kontrolních myší i myší s chybějícími D₁ receptory (genetická ablace D₁ receptorů naopak zvýšila lokomoční aktivitu). Je také možné, že subthalamicke D₅ receptory jsou součástí patofyziologie u Parkinsonovy choroby, podání inverzního agonisty těchto receptorů (flupentixol) zmírnilo její motorické projevy (Cherit et al., 2013).

Agonisté a antagonisté D-receptorů

Postupem času byly vyvinuty stovky farmakologicky aktivních sloučenin, které interferují s funkcí dopaminových receptorů na úrovni vazby ligandu a které nám tímto způsobem dopomohly k objasnění funkce různých typů receptorů. Mnohé z nich pak byly klinicky aplikovány při léčbě výše zmiňovaných onemocnění.

Tabulka 1 Vybraní selektivní agonisté dopaminových receptorů (podle Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Vallone et al., 2000; iuphar-db.org, 2013).

Receptor	G-protein	Selektivní agonista	Selektivní antagonista	Neselektivní agonista	Neselektivní antagonista
D ₁	G _{αs} , G _{αolf}	fenoldopam	SCH-23390	dopamin quinpirol (D ₂ -like)	klozapin chlorpromazin domperidon (D ₂ , D ₃) remoxiprid
D ₂	G _{αi} , G _{αo}	bromokryptin pergolid kabergolin ropinirol	haloperidol rakloprid sulpirid spiperon risperidon	apomorfin	
D ₃	G _{αi} , G _{αo}	pramipexol rotigotin	nafadotrid		
D ₄	G _{αi} , G _{αo}	A-412997	A-381393		
D ₅	G _{αs} , G _{αq}	fenoldopam	SCH-23390		

Zkratky: A-381393: 2-[4-(3,4-dimethylphenyl)piperazin-1-ylmethyl]-1H benzimidazole; A-412997: N-(3-methylphenyl)-2-(4-pyridin-2-ylpiperidin-1-yl)acetamide; SCH-23390: 7-chloro-3-methyl-1-phenyl-1,2,4,5-tetrahydro-3-benzazepin-8-ol

Z klinicky využívaných agonistů dopaminových receptorů nutno jmenovat nepřímého agonistu dopaminových receptorů a zároveň jeho prekurzor L-DOPA, jež náleží mezi standardní léčbu Parkinsonovy choroby. Symptomatická léčba využívá také další agonisty dopaminových receptorů: pramipexol, ropinirol, apomorfín, v zahraničí je užívaný piribedil. Mezi další užívané agonisty náleží např. rotigotin indikovaný kromě terapie Parkinsonovy choroby též k léčbě syndromu neklidných nohou, kabergolin u hyperprolaktinémie, v zahraničí je to fenoldopam v léčbě hypertenze (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Dailly et al., 2004; Webster, 2001; sukl.cz, 2013).

Antagonisté dopaminových receptorů se nejčastěji využívají v terapii schizofrenie, bipolární poruchy či deprese. Existují již v mnoha generacích, které se liší selektivitou účinku a aktivitou na různé podskupiny receptů (dopaminové, serotoninové, adrenergní α_1 i multireceptoroví antagonisté tzv. MARTA). Mezi nejznámější řadíme amisulpirid, aripiprazol, chlorpromazin, clozapin, haloperidol, quetiapin, risperidon, sertindol, sulpirid, tiaprid, ziprasidon, zotepin. V léčbě nauzey, zvracení, gastroparézy se hojně využívají domperidon, metoklopramid a thiethylperazin (Beaulieu and Gainetdinov, 2011; Dailly et al., 2004; Webster, 2001; sukl.cz, 2013).

2.2 Noradrenalin

Noradrenalin, zvaný též norepinefrin nebo levarterenol, hraje velmi důležitou úlohu v mnoha činnostech mozku včetně učení a paměti. O jeho syntézu se nezávisle na sobě zasloužili Stolz a Dakin, název noradrenalin odkazuje na *nitrogen ohne radikal* indukující absenci methylové skupiny v porovnání s adrenalinem. V této době byl však jeho význam přehlédnutý, noradrenalin byl považován za pouhý mezistupeň pro syntézu adrenalinu. Teprve Ulf von Euler dokázal v experimentech oddělit noradrenalin od adrenalinu a v roce 1949 pak prokázal, že také tento katecholamin je základním sympatomimetickým neurotransmitterem u člověka (Rubin, 2007; Sneider, 2005).

Oproti adrenalinu, převážně perifernímu hormonu, má noradrenalin větší význam v CNS, noradrenergní nervy inervují prakticky celý mozek (Nicholas et al., 1996). Tím umožňují neuronům přesné zpracování a vybavení informace. V předním mozku dochází k poklesu inhibiční odpovědi a naopak zvýraznění excitačních signálů, tj. zvýšení poměru signálu k šumu. Noradrenalin taktéž ovlivňuje účinnost synaptického přenosu (např. dlouhodobou potenciaci), reguluje pozornost, bdělost, adaptační reakce, učení, paměť či zotavení po traumatech (Sara, 2009; Sirviö and MacDonald, 1999).

Lokalizace a distribuce noradrenalinu

Na pomezí prodloužené míchy a Valorova mostu leží těla noradrenergních neuronů uskupená do dvou bilaterálních klastrů, skupin jader známých pod zkratkami A1-A7. Téměř polovina všech jader noradrenergních neuronů náleží do oblasti zvané *locus coeruleus* (LC, v překladu „tmavě modrá skvrna“), protáhlé skupinky namodralých buněk ve stěně horní části IV. mozkové komory. Jejich barva je způsobena vysokou koncentrací melaninu. Další skupiny buněk nalezneme v *locus subcoeruleus* (skupiny A5, A6, A7), v oblastech retikulární formace (A1 a C1) a v jádřech *tractus solitarius* (A2 a C2) (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).

Přestože u člověka čítá LC pouze okolo 10 000 - 15 000 noradrenergních nervových buněk v každé hemisféře (u potkana přibližně 1 500), neurony se extenzivně větví a vybíhají v oblasti celé nervové osy. Představují tak hlavní zdroj difúzních noradrenergních projekcí zasahujících do páteřní míchy, hipokampu, amygdaly, septa, thalamu, hypothalamu a také do mozkové kůry. Některé z těchto projekcí vybíhají do obou polovin mozku, nicméně ve více než 95 % převládá inervace ipsilaterální. (Berridge and Waterhouse, 2003; Stanford, 2001). Společně s noradrenalinem bývají uvolňovány i jiné neuromodulátory, například galanin nebo neuropeptid Y (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).

Noradrenergní receptory

Americký farmakolog Raymond Ahlquist jako první upozornil na fakt, že adrenergní efekty, a to excitační i inhibiční, jsou zajištěny dvěma odlišnými typy receptorů. Vycházel například z toho, že podobně excitačně i inhibičně může působit i cholinergní systém parasympatiku, jenž taktéž nedisponuje dvěma typy mediátorů. To bylo v roce 1948. Receptory zajišťující vasokonstrikci, dilataci zorniček, kontrakci svaloviny dělohy či močové trubice (excitační působené katecholaminů) pojmenoval Ahlquist alfa-adrenotropní receptory (α). Tyto receptory však plnily i inhibiční úlohu a to relaxaci střev. Receptory zajišťující inhibiční působení – vazodilataci, relaxaci svaloviny dělohy, bronchodilataci – a excitační potenciály pro srdce byly nazývány beta (β) (Ahlquist, 1948; Bylund, 2007).

Další, přesnější rozdelení na sebe nenechalo dlouho čekat. Lands se svou výzkumnou skupinou pozorovali, že kontrola lipolýzy a funkcí srdce jsou řízeny stejným typem receptoru, který pojmenovali β_1 . Receptor regulující glykogenolýzy kosterních svalů či bronchodilataci dodnes nazýváme β_2 (Calzada a De Artinano, 2001). Alfa receptory byly rozděleny do podskupin α_1 a α_2 , z nichž obě obsahují ještě několik podtříd, objeveny byly taktéž dva atypické β receptory – β_3 a β_4 (Tab. 2).

Tabulka 2 Farmakologická charakteristika adrenergních receptorů včetně některých specifických agonistů a antagonistů jednotlivých skupin receptorů (podle Prokopová, 2010)

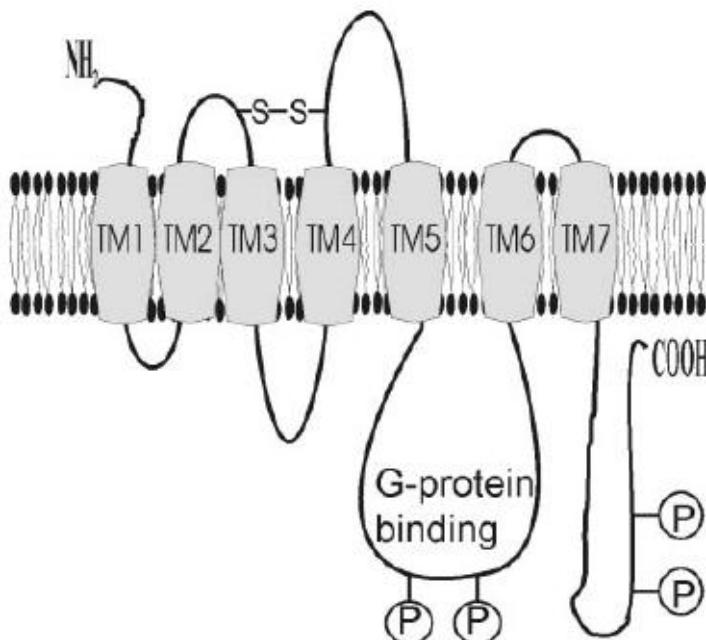
Receptor	Podtyp	Účinnost agonistů	G protein	Mechanismus účinku	Selektivní agonista	Selektivní antagonist
α_1	α_{1A}	NOR \geq ADR	G _{q/G₁₁}	aktivace fosfolipázy C (\uparrow IP ₃ , DAG, \uparrow Ca ²⁺)	fenylephrin methoxamin cyrazolin oxymetazolin	prazosin WB 4101 tamsulosin(α_{1A})
	α_{1B}	ADR = NOR				
	α_{1D}	ADR = NOR				
α_2	$\alpha_{2A/D}$	ADR \geq NOR \gg ISO	G _i	inhibice AC (\downarrow cAMP, \downarrow Ca ²⁺), aktivace K ⁺ kanálu	klonidin guanfacin oxymetazolin ST-91	rauwolscin BRL 44408 JP-1302 yohimbin imiloxan
	α_{2B}					
	α_{2C}					
β	β_1	ISO > ADR \geq NOR	G _s	aktivace adenylylcyclázy (\uparrow cAMP), \uparrow Ca ²⁺	dobutamin	metoprolol betaxolol atenolol
	β_2	ISO > ADR \gg NOR		aktivace adenylylcyclázy (\uparrow cAMP)	terbutalin salbutamol	ICI 118,551 butoxamin
	β_3	ISO = NOR > ADR		aktivace adenylylcyclázy (\uparrow cAMP)	BRL 37344 BRL 35135	SR 58894 SR 59230

Zkratky: ADR – adrenalin, cAMP – cyklický adenosin-monofosfát, DAG – diacylglycerol, ISO – isoprenalin, IP₃ – inositol-trifosfát, NOR – noradrenalin, BRL 37344: 2-[4-[(2R)-2-[(2R)-2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]amino]propyl]phenoxy] acetic acid; BRL 35135: Methyl 4-(2-(2-hydroxy-2-(3-chlorophenyl)ethylamino)propyl)phenoxyacetate; BRL 44408: 2-((4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl)methyl)-2,3-dihydro-1-methyl-1H-isooindole; ICI 118,551: (2R,3S)-1-[(7-methyl-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl)oxy]-3-(propan-2-ylamino)butan-2-ol; JP-1302: N-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]acridin-9-amine;dihydrochloride; SR 58894: (3-(2-allylphenoxy)-1-[(1S)-1,2,3,4 tetrahydronaphth-1-ylamino]-(2S)-2-propanol hydrochloride); SR 59230: (3-(2-ethylphenoxy)-1-[(1S)-1,2,3,4 tetrahydronaphth-1-ylamino]-(2S)-2-propanol oxalate; ST-91: N-(2,6-Diethylphenyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-amine hydrochloride; WB4101: 2-(2,6-dimethoxyphenoxy)-N-[(2R,3R)-3-phenyl-2,3-dihydro-1,4-benzodioxin-2-yl]methyl]ethanamine

Mechanismus účinku

Všechny typy adrenoceptorů patří, podobně jako dopaminové receptory, do skupiny metabotropních membránových receptorů spřažených s G-proteiny a tvořených 7 transmembránovými α -helixy (viz obrázek č. 4). α_1 adrenoceptory jsou spřažené s G_{q/G₁₁} typem proteinu a aktivují fosfolipázu C, která produkuje dva odlišné druhé posly: lipofilní diacylglycerol a hydrofilní inositoltrifosfát. Oba dva

ovlivňují metabolismus buňky, ale efekt IP_3 je navíc zprostředkován zvýšením hladiny biologicky dostupného Ca^{2+} v cytoplazmě (Ruffolo and Hieble, 1994; von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).



Obrázek 4 Topologie 7-transmembránového β -adrenoceptoru (podle Gibb, 2001) K navázání agonisty dochází pravděpodobně v prostoru transmembránových domén. Extracelulární strukturu stabilizují disulfidické můstky spojující první a druhou extracelulární kličku. Mistem vazby G-proteinu je třetí intracelulární klička. Tato klička může být společně s karboxylovým koncem receptoru cílem fosforylace (působení kináz zodpovědných za iniciaci receptorové desenzitizace).

α_2 receptory inhibují adenylycyklázu a tím i množství cAMP (působí na G_i protein, sensitivní na toxin *Pertussis*), což vede k vzrůstu K^+ a redukci Ca^{2+} proudu a tedy k celkovému inhibičnímu efektu - hyperpolarizaci. Zdá se však, že tato cesta platí pouze pro α_{2C} receptor, zatímco ostatní podtypy mají poněkud odlišné mechanismy účinku. Všechny receptory β naproti tomu adenylycyklázu aktivují, mechanismus je zprostředkován G_s proteiny. Prolongované působení agonistů β receptorů redukuje citlivost receptorů a způsobuje jejich desenzitizaci spočívající v odpojení G-proteinu od receptoru a odstranění receptoru z membrány (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).

Distribuce noradrenergních receptorů v mozku

Variabilita noradrenergních odpovědí v konkrétních oblastech mozku je způsobena rozdílným rozmístěním jednotlivých noradrenergních receptorů. Distribucí adrenoceptorové mRNA v centrální nervové soustavě potkana se zabýval

Nicholas et al. (1996): α_1 receptory se nejvíce vyskytovaly v *bulbus olfactorius*, mozkové kůře, hipokampu, thalamu, hypothalamu, dorzální *raphe*, epifýze, *nc. olivarius inferior* a v míše. Receptory α_2 měly nejvyšší hustotu v *locus coeruleus*, intermediolaterálním sloupcí, *bulbus olfactorius*, hipokampu, striatu, gangliích zadních kořenů míšních a sympatiku. β receptory byly distribuovány převážně v epifýze, dále v *bulbus olfactorius*, mozkové kůře. Poměrně nízká hustota β receptorů byla nalezena také v oblastech hipokampu, thalamu, hypothalamu, kůře mozečku a v míše. Zajímavé je také rozmístění různých typů β adrenoceptorů. Někteří autoři uvádějí, že v neuronech se vyskytují primárně receptory β_1 , zatímco v gliových buňkách β_2 (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006). V oblasti neokortexu převažuje β_1 podtyp, v mozečku jsou naopak dominantní β_2 receptory (Stanford, 2001).

Alfa adrenoceptory

Zpočátku se α adrenoceptory rozdělovaly podle své distribuce na presynaptické (α_2), autoregulační - ovlivňující negativní zpětnou vazbou výdej noradrenalinu, a postsynaptické (α_1) zprostředkovávající odpověď efektorových orgánů (Langer, 1974). Brzy však bylo zjištěno, že oba typy receptorů se mohou nacházet pre- i postsynapticky (Stanford, 2001). Také rozdelení dle excitačních či inhibičních efektů nebylo jednoznačné a upustilo se od něj. Dnes dělíme tyto receptory dle jejich farmakologických vlastností a afinitity k ligandům – jejich přehled shrnuje tabulka 2.

Agonisté a antagonisté alfa₁ adrenoceptorů

Většina agonistů α_1 -receptorů je odvozená od substituovaných fenylethylaminů nebo imidazol(in)ů. Nejlépe prozkoumanou látkou zůstává fenylefrin, který působí jako sympathomimetikum, ale uplatňuje se i experimentálně, byť neproniká do CNS. Dobrý průnik do mozkové tkáně mají deriváty imidazolu (oxymetazolin a cirazolin) a imidazolingu (ST 587), které jsou parciálními agonisty α_1 -receptorů, ale interagují i s jinými receptory (Pichler and Kobinger, 1985; Sirviö and MacDonald, 1999).

Z klinické praxe je známý modafinil, taktéž agonista α_1 -receptorů a zároveň jedna z nejpředepisovanějších látek k léčbě narkolepsie, při poruchách pozornosti i závislosti na kokainu. Ač modafinil pravděpodobně indukuje bdělost skrze alfa-adrenergní receptory, podílí se na jeho účinku také množství dalších mechanismů (Dongsoo, 2012). Široké uplatnění nalezli bezesporu také antagonisté α_1 -receptorů. Mezi látky dodnes používané v terapii hypertenze i hypertrofie prostaty naleží doxazosin. Experimentální využití nalezly také terazosin a prazosin. Mezi další antagonisty α_1 -adrenergních receptorů řadíme tamsulosin a alfuzosin, užívané v terapii hypertrofie prostaty (Sirviö and MacDonald, 1999).

Agonisté a antagonisté α_2 adrenoceptorů

Mezi známé selektivní agonisty α_2 -receptorů řadíme oxymetazolin a guanfacin. Nelze nezmínit ani clonidin, který se dříve využíval v terapii hypertenze a v některých zemích slouží k léčbě různých neurologických poruch, např. ADHD, Touretteova syndromu. Někteří autoři zmiňují i analgetikum dexmedetomidin a ST-91 (Kato et al., 2008; Nazarian et al., 2008).

K selektivním antagonistům α_2 -receptorů naleží BRL 44408 a BRL 48962 (blokují $\alpha_{2A/D}$ receptory), rauwolscin, MK 912, JP-1302 (výhradně podtyp α_{2A}), imiloxan a ARC 239 (α_{2B}). Mezi méně selektivními pak lze zmínit yohimbin, idazoxan a atipamezol (Calzada a Artinano, 2001; Imaki et al., 2009; Kovacs and Hernádi, 2006; Salinen et al., 2007).

Beta adrenoceptory

Ač se v centrální nervové soustavě vyskytují β -adrenergní receptory převážně postsynapticky, existují důkazy i o jejich presynaptické lokalizaci. Presynaptické β_2 -receptory mohou stimulovat výdej noradrenalinu a způsobovat esenciální hypertenzi (Berridge a Waterhouse, 2003; Misu a Kubo, 1986). Základní rozlišení β -adrenergních receptorů je na podtypy β_1 a β_2 , existují však i β_3 receptory a atypické β receptory, svoji funkci mají spíše na periferii nervového systému. Oproti α_1 -adrenoceptorům není nejsilnějším agonistou pro β receptory noradrenalin, s výjimkou β_3 receptorů (Stanford, 2001).

Agonisté a antagonisté beta adrenoceptorů

Za selektivního β_1 -agonistu považujeme dobutamin (má však také slabou β_2 a α_1 aktivitu), klinicky hojně využívaný lék v akutní medicíně pro svůj silný inotropní efekt. Mezi parciální selektivní β_1 -agonisty se řadí denopamin a xamoterol (Hieble et al., 1995; von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006). Mnoho ze známých antagonistů β_1 receptorů patří mezi antihypertenziva. K těm, které jsou lipofilní a dobře tedy pronikají do centrální nervové soustavy (CNS), řadíme například metoprolol, acebutol a labetalol, ještě vyšší míru lipofility vykazují penbutol, propranolol a oxprenolol, v ČR se však užívají již jen experimentálně (Řiháček et al., 2005).

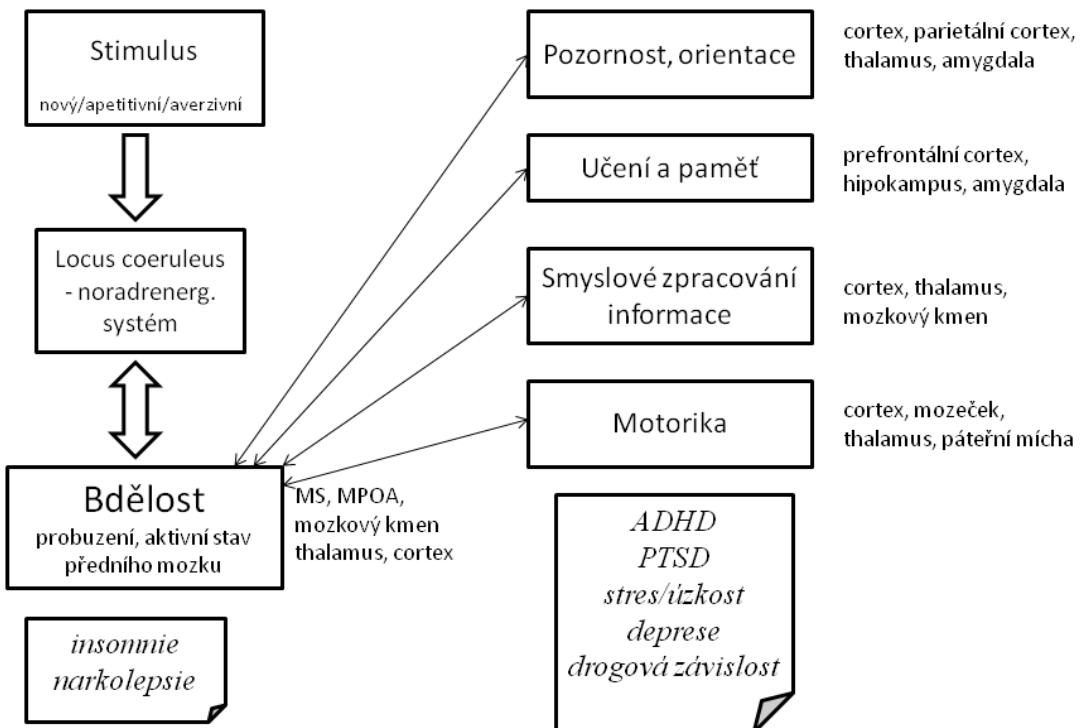
K další v praxi často užívané skupině patří β_2 -agonisté, známá antiastmatika a tokolytika, jako jsou terbutalin, salbutamol, fenoterol, hexoprenalin nebo clenbuterol. Antagonismus β_2 receptorů byl prokázán u butoxaminu a ICI 118,551 (Hieble et al., 1995; von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006). Antagonisté β_3 receptorů se zatím v praxi příliš nerozšířili, jejich přehled poskytuje tabulka 2.

Funkční význam noradrenalinu v mozku

Noradrenalin zastává v centrální nervové soustavě velké množství úloh. Aktivace jeho receptorů má vliv (excitační i inhibiční účinek) na chování v závislosti na exponované mozkové struktuře, načasování její aktivace, typu a hustotě receptorů. Vztahy mezi fyziologickými procesy, jichž se účastní noradrenergní inervace, shrnuje obrázek č. 5.

Výdej noradrenalinu je závislý na síle stimulu, který způsobí vzestup tonické a/nebo fázické aktivity *locus coeruleus* a díky němuž dojde k regulaci bdělosti organismu (aktivita předního mozku a mozkového kmene). Nadbytečná stimulace se klinicky projeví jako insomnie, naopak nedostatečná aktivita jako narkolepsie. V bdělém stavu interaguje noradrenergní systém s okruhy pozornosti a orientace, učení a paměti, smyslovým zpracováním informace a s motorikou. Descendentní dráhy z kortikálních a subkortikálních oblastí předního mozku modulují mozkovou činnost pozitivní i negativní zpětnou vazbou. Všechny tyto reciproční vztahy pomáhají organismu s přizpůsobením se neustále se měnícím vnějším i vnitřním

podmínkám. Jejich nerovnováha se projeví jako neuropsychiatrické onemocnění, například ADHD, posttraumatická stresová porucha, úzkost, stres, deprese či drogová závislost (Berridge and Waterhouse, 2003).



Obrázek 5 Funkční význam noradrenergního systému v mozku (upraveno dle Berridge and Waterhouse, 2003; Prokopová, 2010)

Úloha alfa receptorů

Bdělost a pozornost

Zdá se, že centrální noradrenergní neurony jsou součástí tzv. *alarm systému*, svoji aktivitu zvyšují na základě senzorických stimulů. Klíčová je nejenom novost a přitažlivost, ale také jakási nápadnost (angl. *salience*) daného podnětu. Tento systém je stěžejní pro adaptaci a behaviorální přizpůsobení jedince (McQuade and Stanford, 2000). Noradrenalin však také dokáže ovlivnit emoční sílu daných stimulů. Přiměřená aktivita vyvolává zájem a pozornost, její nadbytek kumuluje v úzkost a neklid, nedostatek se pak projeví jako deprese. V prefrontální kůře je situace poněkud odlišná, nízké a střední hladiny mají na její funkci prospěšný vliv (aktivace

α_{2a} adrenoceptorů, hlavně postsynapticky), ale vysoká hladina noradrenalinu, která se objevuje například při stresu, funkci prefrontální kůry inhibují v důsledku nižší affinity α_1 receptorů (Arnsten and Li, 2005).

V patofyziologii ADHD se kromě poruchy dopaminergní transmise také vyskytuje nedostatečná stimulace α_{2A} receptorů právě v PFC. K terapii se využívá například methylfenidát, který mimo jiné způsobuje snížení počtu adrenoceptorů. Při léčbě narkolepsie nalezl uplatnění modafinil, jež naopak stimuluje α_1 receptory. Stejně tak účinná se zdají být psychostimulancia, např. amfetamin zvyšující extracelulární hladiny noradrenalinu a aktivující α_1 i β receptory (Berridge et al., 2012; Sirviö and MacDonald, 1999; Umehara et al., 2013).

Učení a paměť

Paměť lze definovat jako schopnost organismu modifikovat své chování na základě předchozí zkušenosti. O roli noradrenalinu v tomto procesu se spekulovalo již od sedmdesátých let minulého století. Seymour Kety přišel s hypotézou, že bdělý stav indukovaný významným stimulem ovlivňuje mozkové synapse, a ty přenášející důležitou informaci jsou propouštěny dál, ba přímo podporovány. Noradrenergní neurony se podílí na rozhodování, zda bude informace uchována či ne, a posilují její uchování reprezentované působením klasických neuropřenašečů (Harley, 1987). Noradrenalin nachází uplatnění v akviziční fázi paměti, ale také při její konsolidaci. Aktivace *locus coeruleus* zvyšuje poměr signálu k šumu v postsynaptických neuronech a zvyšuje odpověď na vybrané signály (Gibbs and Summers, 2002; Smythies, 2005).

Přestože v případě paměťových procesů hrají významnější úlohu β -adrenergní receptory, bylo prokázáno, že aktivace α_1 adrenoceptorů v asociační oblasti předního mozku má vliv na konsolidaci dlouhodobé paměti společně s β -receptory (v některých studiích byla dokonce na současně aktivaci β receptorů závislá) a aktivace α_2 receptorů v putamen a *nc. caudatus* hraje roli v posílení paměti vedoucí k této konsolidaci (Ferry et al., 1999; Gibbs and Summers, 2002). Blokáda α_1 receptorů prazosinem nezpůsobila kognitivní deficit v Morrisově vodním bludišti (Riekkinen et al., 1996), v radiálním bludišti (Liao et al., 2002) ani v operantrních testech prostorové paměti (Levcik et al., 2013).

Reikkinen et al. se zabýval možnými efekty stimulace α_2 receptorů u pacientů s kognitivními deficitami. Zatímco podání klonidinu (α_2 agonista) zhoršovalo cílenou pozornost a krátkodobou paměť u pacientů s Alzheimerovou chorobou (Riekkinen et al., 1999b), u pacientů s Parkinsonovou nemocí klonidin zlepšoval prostorovou pracovní paměť, u pozornosti ani vizuální paměti příznivý efekt pozorován nebyl (Riekkinen et al., 1999a). Přesto noradrenergní neurotransmise zůstává jedním z příštích cílů pro rozvoj nových terapeutických možností u pacientů s Parkinsonovou chorobou (LeWitt, 2012). Bardgett et al. (2008) také prokázal, že agonismus α_2 receptorů klonidinem může zmírnit paměťový deficit způsobený podáním látky MK-801, antagonisty NMDA-receptorů.

Lokomotorická aktivita

Přestože nemají noradrenergní receptory tak silný vliv na pohybovou aktivitu jako například dopaminové receptory, k jejímu ovlivnění dochází a je třeba ji brát v úvahu také v mnoha kognitivních testech. V experimentálně vytvořených modelech hyperlokomoce (většinou podáním D₂ agonisty) se prokázalo, že stimulovanou lokomoční aktivitu je možné blokovat podáním antagonisty α_1 receptorů (prazosin), naproti tomu α_2 antagonista (idazoxan) potlačoval navozené stereotypní chování, ale zvyšoval lokomoci (Dickinson et al., 1988; Eshel et al., 1990). Idazoxan také blokuje příznivý vliv metylfenidátu na zmírnění pohybové aktivity u potkaních modelů ADHD (Umeshara et al., 2013). V testech aktivního se vyhýbání se zakázanému sektoru (bludiště Kolotoč) jsme však prokázali zhoršení lokomoční aktivity po blokádě α_1 i α_2 receptorů (Stuchlík and Valeš, 2008). Agonisté α_1 -adrenergních receptorů (methoxamin, fenylefrin) zvyšují lokomoční aktivitu v testech otevřeného pole, tento efekt může být opět blokovaný prazosinem, ne však idazoxanem či propranololem (Heal, 1984; Sirviö and MacDonald, 1999).

Úloha beta receptorů

Bdělost a pozornost

Beta adrenoceptory hrají také úlohu v modulaci bdělosti a pozornosti, i když možná ne tak robustní jako v případě α_1 receptorů. Stěžejní je inervace v oblasti

laterálního hypothalamu. Zajímavé je, že současná stimulace α_1 i β -receptorů působila aditivně, naopak současná blokáda těchto receptorů (prazosin a timolol) vedla k synergickému sedativnímu efektu (Berridge et al., 2012; Schmeichel and Berridge, 2013).

Učení a paměť

Jak bylo experimentálně mnohokrát ověřeno, v případě učení a paměti hrají β receptory stěžejní úlohu. Jejich stimulace v amygdale, *gyrus dentatus* a hipokampu podporuje potenciaci a konsolidaci dlouhodobé paměti, zatímco betablokátory uchování paměťové stopy znesnadňují (Cahill and McGaugh, 1996; Ramos and Arnsten, 2007). Nepříznivý efekt blokády β receptorů na prostorovou kognici a navigaci byl prokázán také v naší laboratoři (Stuchlík et al., 2009). β agonisté (například isoprenalin, salbutamol, clenbuterol) působí pozitivně na retenci paměti, mohou dokonce zvrátit její deficit (Crowe and Shaw, 1997; Ramos et al., 2007).

V bazálních gangliích umožňují β_1 receptory funkci krátkodobé paměti v krátkém okamžiku po tréninku experimentálních zvířat (Gibbs and Summers, 2005). Zdá se však, že na konsolidaci paměti mají větší vliv β_2 adrenoceptory (Gibbs and Summers, 2002). Zajímavé je, že β_2 receptory podporují odbourávání glykogenu v astrocytech a tím zvyšují přísun energie do různých aktivních částí mozku. Astrocytární β_3 receptory zajišťují zvýšený příjem glukózy samotnými buňkami a jejich agonisté zvyšují efekt glukózy na konsolidaci paměti (Cahill and McGaugh, 1996; Gibbs and Summers, 2002; Ramos et al; 2007).

Gibbs a Summers (2002) shrnují roli adrenergních receptorů pro paměťové funkce takto: Noradrenalin, vyplavený během učení při dostačující pozornosti, aktivuje nejprve β_1 receptory v bazálních gangliích a vytváří se krátkodobá paměť. Posléze dojde ke stimulaci β_3 adrenoceptorů v asociační kůře. Další výdej noradrenalinu z *lobus parolfactorius* aktivuje α_2 receptory bazálních ganglií, které zpětnou vazbou (inhibice *locus coeruleus*) ovlivní aktivity v asociační kůře. Finální obsazení β_2 receptorů noradrenalinem je zřejmě iniciováno inervací z oblasti *locus coeruleus* nebo příbuzných noradrenergních neuronů mozkového kmene.

Existují však i studie, ve kterých podání betablokátorů zlepšoval výkon experimentálních zvířat v testech pracovní paměti, zatímco β_1 agonisté kognitivní funkce zhoršovali. Tyto efekty však byly pozorovány v oblasti PFC (Ramos et al., 2005).

Lokomotorická aktivita

Některé studie uvádějí, že také blokáda β receptorů snižuje lokomoci, například v experimentech v otevřeném poli po podání propranololu (Poli and Palermo-Neto, 1985). Také v našich studiích v bludišti Kolotoč se antagonismus β receptorů projevil poklesem lokomoční aktivity zvířat, ovšem pouze po podání nejvyšších dávek betablokátorů, kdy se na celkovém účinku mohl taktéž podílet pokles krevního tlaku či sedativní efekt (Stuchlík et al., 2009).

Význam noradrenalinu v patologii neurologických onemocnění

Jak již bylo zmiňováno, noradrenalin je důležitým neuropřenašečem, jehož patologie se zobrazí v mnoha neurologických chorobách – např. u ADHD, narkolepsie, depresí, úzkostních poruch a posttraumatické stresové choroby (Berridge et al., 2012; Brennan and Arnsten, 2008; Sirviö and MacDonald, 1999; Stegeren, 2008; Umehara et al., 2013). Posmrtné studie u pacientů s Alzheimerovou a Parkinsonovou demencí například poukázaly na snížené hladiny noradrenalinu v podkorových a korových oblastech v přímé úměře se závažností onemocnění (Herman et al., 2004; LeWitt, 2012; von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).

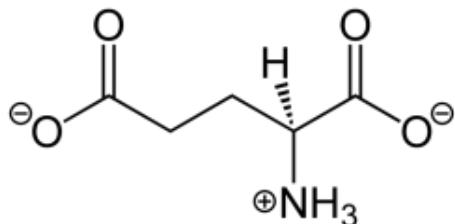
Nová antipsychotika působí na bázi multireceptorových substrátů, včetně blokády α_1 receptorů, noradrenalin hraje roli i v rozvoji schizofrenie (Gibbs and Summers, 2002). Ukázalo se také, že noradrenalin působí protektivně proti poškození neuronů v limbickém systému způsobeném epileptickými záchvaty. Zásadní úlohu při vzniku i průběhu epileptických záchvatů má zřejmě α_{1B} podtyp adrenergních receptorů (Giorgi et al., 2004; Pizzanelli et al., 2009).

3. Glutamátergní systém

Glutamát

Glutamátový (a aspartátový) systém je společně se systémem kyseliny γ -aminomáselné (GABA) jedním ze dvou hlavních aminokyselinových systémů v mozku. Glutamát je nejrozšířenějším excitačním mozkovým neuropřenašečem, nezbytným pro vzájemnou komunikaci mezi neurony prakticky ve všech neuronálních obvodech.

První významnější pozornosti se glutamátu dostalo v třicátých letech minulého století, kdy byly nalezeny jeho vysoké koncentrace v mozku, což vedlo k výzkumům neurofyziologické role této aminokyseliny. Zkoumal se například vliv glutamátu a glutaminu v potravě na poruchy učení a epilepsii. Hayashi posléze uskutečnil elektrofyziologické studie, při nichž objevil, že injekčně podaný glutamát do šedé kůry mozkové (ale také třeba do karotid) psů, opic i lidí vyvolá konvulze (Hayashi, 1954). Odstartoval zájem o glutamát jakožto excitační přenašeč v centrální nervové soustavě.



Obrázek 6 Chemický vzorec L-glutamátu ([wikipedia.org](https://en.wikipedia.org))

Glutamát (obr. 6), chemicky sůl L-2-aminopentandiové kyseliny, patří mezi neesenciální mastné kyseliny, neprochází hematoencefalickou bariérou a je tedy syntetizován přímo v neuronech za využití místních prekurzorů. Glutamát je tvořen v Krebsově cyklu (tj. cyklus trikarboxylových kyselin, citrátový cyklus) za využití enzymu *glutamát dehydrogenázy* nebo transaminací α -ketoglutarátu. Na syntéze glutamátu se podílejí také astrocyty, které vytváří glutamin a uvolňují ho do extracelulárního prostoru. Odtud je vychytáván neurony, přeměňován v glutamát a skladován v synaptických váčcích. Uhlíkový skeleton glutamátu je utvářen z aminokyselin či dalších energeticky bohatých substrátů, jako je glukóza, laktát a 3-hydroxybutyrát (Kelly and Stanley, 2001; McKenna, 2007).

Metabolismus glutamátu nelze vyjádřit stechiometrickou rovnici, jedná se spíše o otevřený průběh dějů, které interferují s dalšími metabolickými cestami v závislosti na aktuálních buněčných potřebách a prioritách. Tyto metabolické procesy zahrnují například oxidativní pochody skrze cyklus trikarboxylových kyselin sloužící k tvorbě energie (McKenna, 2007). Neporušená regulace metabolismu glutamátu je klíčová pro syntézu a oxidaci aminokyselin, ureagenezi a normální činnost CNS. Jeho narušení pak může vyústit v metabolická (např. syndrom hyperinzulínismus/hyperamonémie) či neurologická onemocnění (Kelly and Stanley, 2001).

Distribuce a lokalizace glutamátu

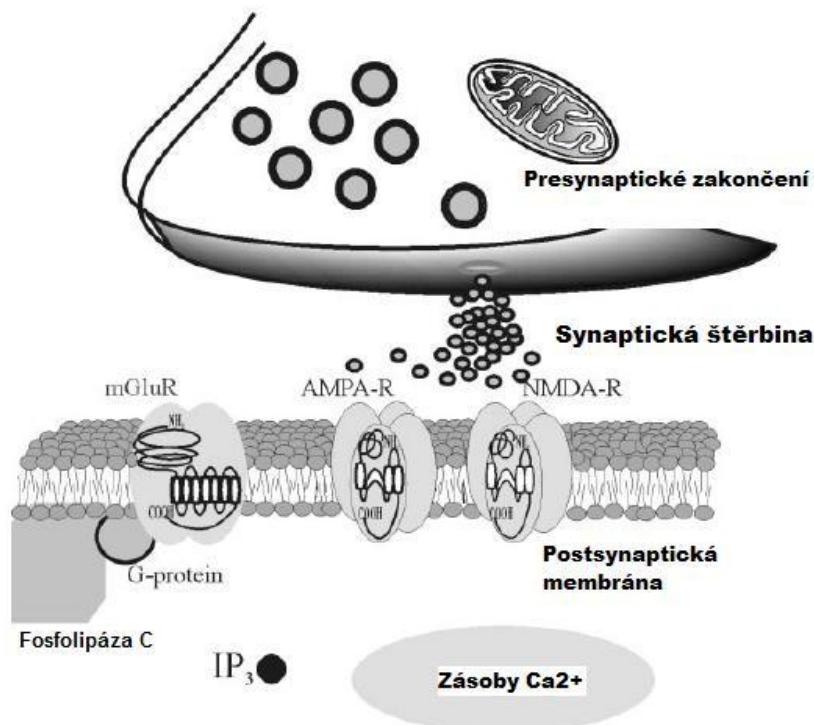
Jelikož glutamát můžeme právem považovat za nejrozšířenější neuropřenašeč, detekujeme jej v mnoha mozkových strukturách. Nápadné množství glutamátergních neuronů nalezneme v mozkové kůře, odkud projikují do mnoha subkortikálních oblastí: do hipokampu, bazolaterálního komplexu amygdaly, *substancia nigra*, *nucleus accumbens*, *colliculus superior*, *nucleus caudatus*, *nucleus ruber* a pontu. V rámci hipokampu byly dále popsány vnitřní glutamátergní dráhy, ale také dráhy směřující do hypothalamu, *nucleus accumbens* a laterálního septa (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).

Glutamátové receptory

Excitační efekt glutamátu může být zprostředkován různými skupinami glutamátových receptorů, rozlišujeme jich několik typů na základě podobnosti jejich DNA sekvencí a možné aktivace různými farmakologickými substancemi. Tři z nich fungují jako iontové kanály: *N*-metyl-*D*-aspartát (NMDA) receptor, α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionát (AMPA) receptor a kainátový receptor. Další jsou spřažené s G-proteiny a náleží do skupiny metabotropních receptorů: typu 1 (mGlu1), typu 2 (mGlu2) a typu 3 (mGlu3) (Gasparini and Griffiths, 2013; Niswender and Conn, 2010; Stone, 1995).

Receptory pro glutamát se nacházejí převážně postsynapticky, některé z nich však nalezneme také na presynaptické membráně, kde působí jako auto- nebo heteroreceptory. U mGlu receptorů můžeme pozorovat též perisynaptickou lokalizaci

(Conti et al., 1997; Gibb, 2001). Nedávné výzkumy prokázaly, že exprese glutamátergních receptorů není jen výsadou neuronů, ale objevuje se také u astrocytů, přičemž jejich vzájemná interakce se uplatňuje během fyziologických i patologických podmínek (Lee et al., 2010).



Obrázek 7 Schéma excitační synapse v mozku (podle Gibb, 2001)

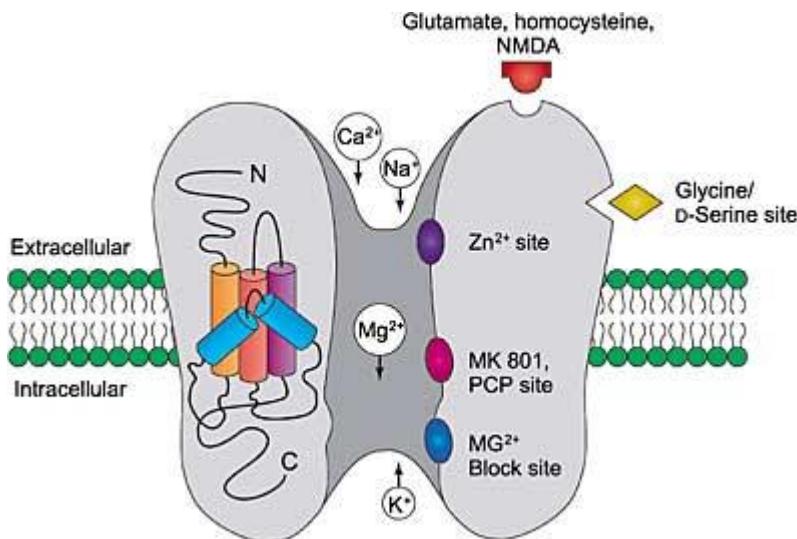
Stručný mechanismus působení glutamátu na synaptických receptorech shrnuje obrázek č.7. Glutamát je podobně jako jiné neuropřenašeče uskladněný v synaptických váčcích. Fúzí těchto váčků s membránou presynaptického zakončení dojde k uvolnění glutamátu do synaptické štěrbiny, odkud rychle difunduje a váže se na AMPA receptory, čímž je aktivuje. To spustí depolarizační vlnu, která umožní aktivaci NMDA receptorů díky uvolnění iontu Mg^{2+} . Oba zmínované receptory působí jako iontové kanály, které umožňují vtok Na^+ a K^+ a/nebo Ca^{2+} . Přísun iontů vyvolá rychlou excitační reakci měřitelnou ve formě excitačních postsynaptických potenciálů. Efekt zprostředkovaný ionotropními receptory se ovšem neomezuje pouze na tyto potenciály, prostřednictvím pre- a postsynaptických procesů umožňuje také trvalejší změny v synaptické aktivitě (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006). Princip působení skrze mGlu receptory bude popsán níže.

NMDA receptory

NMDA receptory hrají nejvýznamnější úlohu právě u savců. Jak už název napovídá, jsou selektivně aktivovány NMDA, mezi méně selektivní substance náleží glutamát, aspartát a homocysteát. Odpověď receptorů na glutamát je o něco pomalejší, než bychom očekávali u ionotropního receptoru pro excitační aminokyseliny, což je zřejmě způsobeno jejich tonickou inhibicí ionty Mg^{2+} (ten blokuje iontový kanál během klidového potenciálu -70mV). NMDA receptor se skládá z komplexu čtyř podjednotek se specifickými vazebnými místy a je asociovaný s iontovým kanálem propustným pro ionty Na^+ , K^+ a Ca^{2+} (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Willard and Koochekpour, 2013).

NMDA receptorové kanály mohou být tvořeny kombinacemi různých podjednotek ze skupiny NR1, NR2 a NR3. Zatím je jich známo 7 typů (viz tabulka č. 3), přičemž NR1 ještě obsahuje různé funkční či nefunkční izoformy. Receptory vykazují velkou farmakologickou diverzitu a rozdílnou distribuci v jednotlivých oblastech mozku, také v závislosti na vývojovém stavu. Páteří NMDA receptoru jsou zřejmě podjednotky NR1, jež jsou nezbytné pro jeho funkci, NR2 podjednotky pak určují fyziologické a farmakologické vlastnosti receptoru. NR3 podjednotka nemusí být vždy přítomna, sama o sobě ani nedokáže formovat funkční receptor, je však nezbytnou součástí umožňující funkční různorodost NMDA receptorů (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Kew and Kemp, 2005; Low and Wee, 2010).

Vazebná místa na NMDA receptorech lze zjednodušeně rozdělit do několika kategorií (obr. č. 8). Za prvé rozlišujeme hlavní vazebné místo pro agonisty a kompetitivní antagonisty, jež působí přímo na receptoru. Samotný iontový kanál však může být také místem působení ligandů. K jeho zablokování slouží dvě specifická místa – napěťově řízené kationické místo, které je blokováno ionty Mg^{2+} , a vazebné místo, jež je cílem substancí působících jako nekompetitivní NMDA antagonisté (např. MK801). Na vazebném místě pro MK-801 také působí klinicky užívané látky ketamin - disociativní anestetikum, psychomimetikum, a memantin (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Dickenson, 2001).



Obrázek 8 NMDA glutamátový receptor včetně vazebných míst jeho ligandů (Journals on the web, 2013)

V neposlední řadě je nutné taktéž zmínit odlišná regulační vazebná místa glutamátových receptorů, mezi něž náleží alosterické vazebné místo pro glicin či D-serin (zde působí antagonist 7-chlorkynurát), vazebné místo pro polyaminy (to je lokalizováno intracelulárně a taktéž moduluje afinitu ostatních agonistů či antagonistů, váže se na něj spermidin/spermin) a selektivní vazebná místa pro Mg^{2+} a Zn^{2+} . Tato vazebná místa zprostředkovávají negativní i pozitivní kontrolu funkce NMDA receptorů. Obecně lze říci, že k aktivaci NMDA receptorů je nutné odstranění Mg^{2+} bloku (po dostatečné a opakované depolarizaci), tj. napěťově řízená aktivace, stejně jako navázání glutamátu společně s ko-agonistou glicinem, tj. ligandem řízená aktivace (Dickenson, 2001; Dingledine et al., 1999; Kew and Kemp, 2005; Niciu et al., 2013).

AMPA receptory

AMPA receptory řadíme mezi non-NMDA receptory. Jsou taktéž tvořeny iontovými kanály, které však zprostředkovávají rychlou excitační synaptickou transmisi. Charakterizuje je, že mohou být aktivovány prostřednictvím AMPA, kvískvalátem a glutamátem. Mezi jejich kompetitivní antagonisty náleží GAMS, glutamylglycin, CNQX či relativně nejselektivnější NBQX, byť nejsou specifickými pouze pro AMPA receptory. Tyto receptory jsou selektivními iontovými kanály pro Na^{+} a K^{+} , za určitých okolností propouští taktéž Ca^{2+} . Existují minimálně 4 odlišné podjednotky receptorů – GluR1-4, jež se opět různě kombinují. Každá z podjednotek

navíc může mít dvě varianty dle sestřihu, ty se nazývají „flip“ a „flop“ a liší se vzájemně kinetikou a amplitudou odpovědi kanálu na působení agonisty (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Dickenson, 2001; Kew and Kemp, 2005).

Jedním z důležitých míst AMPA receptorů je jejich podjednotka GluR 2. Tato podjednotka podléhá sestřihu RNA (deaminace adenosinu) ve specifickém místě, jež ovlivňuje neprostupnost Ca^{2+} receptorem. Sestřih RNA je fyziologicky velmi důležitý proces, neboť určuje například kinetiku receptorů, seskupování podjednotek či expresi receptoru na povrchu buněk, a pokud je narušený, dochází k volnému prostupu iontů Ca^{2+} kanálem a smrti neuronu. Geny ovlivňující sestřih RNA jsou považovány za kandidátní geny celého komplexu neurologických chorob, například schizofrenie, deprese, epilepsie, amyotrofní laterální sklerózy či progrese tumorů (Dickenson, 2001; Maas et al., 2006).

Kainátové receptory

Charakteristickými agonisty kainátových receptorů jsou kainát a glutamát. GAMS, CNQX, NS102 vykazují slabý antagonizující efekt. Kainátové receptory se dlouho řadily do stejné skupiny s AMPA receptory, společnou vlastností je jim mimo jiné struktura iontového kanálu s propustností pro Na^+ , K^+ (v některých případech též Ca^{2+}). Receptory jsou tvořeny podjednotkami ze dvou různých strukturálních skupin: GluR5-7 a KA1-2 (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006, Dickenson, 2001).

Funkce kainátových receptorů zatím nebyla dopodrobna objasněna, ale je známo, že vysoce afinitní vazebná místa pro kainát jsou přednostně umístěna na presynaptických membránách. Lze tedy usuzovat, že jejich role spočívá v modulaci výdeje excitačních aminokyselin, případně dalších neuropřenašečů a neuromodulátorů (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Dickenson, 2001).

Metabotropní glutamátové receptory

Metabotropní glutamátové receptory jsou spřažené s G-proteiny a pro přenos signálu využívají systém druhých poslů, jak již bylo popsáno výše. Působením dostatečného stimulu generují pomalé postsynaptické odpovědi. Zajímavé je, že jsou rezistentní k aktivaci NMDA, AMPA či kainátem. K jejich agonistům patří glutamát,

kvískvalát, ACPD, L-serin-O-fosfát a kyselina ibotenová. Analoga fenylglycinu působí antagonisticky (Niswender and Conn, 2010).

Bylo popsáno 8 odlišných typů metabotropních glutamátových receptorů, značených mGluR1-8, které se dále řadí do tří skupin na základě jejich farmakologických vlastností a vazbu na různé druhé posly. Metabotropní receptory skupiny 1 (mGluR1 a 5) působí prostřednictvím fosfolipázy C (i když se v poslední době ukazuje, že mohou působit také prostřednictvím $G_{i/o}$, G_s -proteinů či zcela nezávisle na G-proteinech), zatímco skupina 2 (mGluR2,3) a 3 (mGluR 4,6,7,8) inhibuje adenylátcyclázu prostřednictvím $G_{i/o}$ -proteinů. Receptory 2. a 3. skupiny se mezi sebou liší afinitou k určitým agonistům, CCG pro 2. skupinu a L-serin-o-fosfát, 2-AP4 pro skupinu 3 (Niswender and Conn, 2010).

Agonisté a antagonisté glutamátergních receptorů

Také ke klasifikaci glutamátových receptorů se využívá specifických substancí se selektivitou k jednotlivým podtypům. Látky interagující s receptory excitačních aminokyselin mají několik společných vlastností: a) jednu kyselou skupinu (většinou karboxylovou), b) amino skupinu na uhlíku obsahujícím již zmíněnou kyselou skupinu, c) druhou kyselou skupinu (nebo polární skupinu) lokalizovanou o dva nebo čtyři uhlíky dále od první kyselé skupiny. Přesně tato konformace dovoluje ant/agonistům přístup a interakci s aktivním centrem glutamátových receptorů (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).

Přirozenými agonisty glutamátových receptorů jsou glutamát a aspartát. Přehled dalších ant/agonistů poskytuje tabulka 3.

Tabulka 3 Farmakologická charakteristika glutamátergních receptorů (podle von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Kew and Kemp, 2005).

Receptor	NMDA	AMPA	Kainátový	mGlu
Selektivní agonista	NMDA	AMPA	kainát	kvískvalát, L-AP4, ACPD
Funkce	aktivace Na^+ , K^+ , Ca^{2+} kanálů	aktivace Na^+ , K^+ , (Ca^{2+}) kanálů	aktivace Na^+ , K^+ , (Ca^{2+}) kanálů	aktivace fosfolipázy C, inhibice adenylát cyklázy
Agonista	ibotenát chinolinát	kvískvalát, kainát, domoát, ACPA	domoát, akromelové kyseliny A a B, ATPA, (S)-5-Iodowillardiin	L-serin O-fosfát, ibotenát, CCG
Kompetitivní antagonist	2-AP5, 2-AP7, CPP, CGP39653, CGS19755, PEAQX, PPDA, NPC12626, LY274614, SDZ EAB-515, SDZ 215-439, ATP	CNQX, NBQX, DNQX, glutamylglycin, YM872, ZK200775	GAMS, CMQX, NS102, glutamyl-glycin, LY382884	analoga fenylglycinu (3HPG, 4CPG, 4C3HPG)
Alosterický modulátor	glycin, D-serin, D-cykloserin, spermin, spermidin, ATP, aminoglykosidy (>3 aminoskupiny)	benzothiazid	concanavalin A	
Antagonisté na alosterickém vazebném místě	5,7-diCl-Kyn, HA-966, CNQX, MDL 105,519 L-701,324			
Inhibitor iontového kanálu	PCP, MK-801 (dizocilpin), Ketamin, TCP	JST (pavoučí Joro toxin)		
Podjednotky, Podtypy (pro mGluR)	NR-1 NR-2A NR-2B NR-2C NR-2D NR-3A NR-3B	GluR1 GluR2 GluR3 GluR4	GluR5 GluR6 GluR7 KA1 KA2	mGluR1 mGluR2 mGluR3 mGluR4 mGluR5 mGluR6 mGluR7 mGluR8

Zkratky: L-AP4= L-2-amino-4-fosfonobutanová kyselina; 2-AP5=D-2-amino-5-fosfonopentanová kyselina; 2-AP7=D-2-amino-7-fosfonohexanová kyselina; ACPA= (R,S)-2-amino-3-(3-karboxy-5-metyl-4-isoxazolyl)propionová kyselina; ACPD=1-amino-cyklopantan-(1S,3R)-dikarboxylová kyselina; ATPA= 5-tert-butyl-4-isoxazolepropionová kyselina; CCG=2-karboxycyklopentylglycin; CGP39653=2-amino-4-propyl-5-fosfonopentenová kyselina; 4C3HPG=(S)-4-karboxy-3-hydroxyfenylglycin; CGS=cis-4-(fosfonometyl) piperidin-2-karboxylová kyselina; CNQX=6-kyano-7-

*nitroquinoxalin-2,3-dion; 4CPG=(S)-4-karboxyfenylglycin; CPP={3-[(+)-karboxypiperazin-4-yl]prop-1-yl}fosfonová kyselina; 5,7-di-Cl-Kyn=5,7-dicholorokynurenová kyselina; DNQX=6,7-dinitroquinoxalin-2,3-dion; GAMS=glutamylaminometylsulfonát; 3HPG=(S)-3-hydroxyfenylglycin; JST=Joro spider toxin; LY274614=(±)-6-fosfonometyl-dekahydroisoquinolin-3-karboxylová kyselina; LY382884=(3S,4aR,6S,8aR)-6-(4-karboxyfenyl)metyl-1,2,3,4,4a,5,6,7,8,8a-dekahydroxyisoquinolin-3-karboxylát; MK-801=(+)-5-metyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyklohepten-5,10-imin; NBQX=2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzof[*f*]quinoxalin-2,3-dion; NPC12626=2-amino-4,5-(1,2-cyklohexyl)-7-fosfonohexanová kyselina; NS102=5-nitro-6,7,8,9-tetrahydrobenzo(*G*)indol-2,3-dion-3-oxim; PCP=1-(1-fenylcyklohexyl) piperidin; PEAQX=({(1*S*)-1-(4-bromofenyl)etyl}amino)-(2,3-dioxo-1,4-dihydrochinoxalin-5-yl)metyl)fosfonová kyselina; PPDA=1-(fenantren-2-karbonyl) piperazin-2,3-dikarboxylová kyselina; SDZ 215-439=(*S*)-alfa-amino-5-fosfonometyl[1,1':4',1"-terfenyl]-3-propanová kyselina; SDZ EAB-515=(*S*)-alfa-amino-5-fosfonometyl[1,1'-bifenyl]-3-propanová kyselina; TCP=(thienyl)cyklohexylpiperidin; YM872=[2,3-dioxo-7-(1*H*-imidazol-1-yl)-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydro-1-chinoxalinyl]-octová kyselina; ZK200775=[1,2,3,4-tetrahydro-7-morfolinyl-2,3-dioxo-6-(trifluoromethyl)chinoxalin-1-yl]metyl)fosfonát*

Terapeuticky velmi zajímavou skupinou jsou blokátory iontového kanálu NMDA receptorů. Jako první byly identifikovány ketamin a fencyklidin, následovala látka MK-801 a mnohé další, jež se ovšem liší v afinitě k iontovému kanálu. Vysoko afinitní sloučeniny (např. MK-801) blokují otevřený kanál a mohou být doslova „uvězněné“ v zavřeném kanálu. Vezmeme-li v potaz jejich vysokou afinitu a nízkou reverzibilitu, lze snadno očekávat velmi strmou křivku závislosti účinku na dávce antagonisty a často dochází k téměř smazatelné hranici mezi terapeutickým účinkem a neakceptovatelnými nežádoucími účinky. Mezi látky s nízkou afinitou a rychlou reversibilitou patří memantin a amantadin, čímž se stávají dobře snášenými a využívanými například v terapii neurodegenerace (Kew and Kemp, 2005; Santangelo et al., 2012).

Mezi látky modulující činnost NMDA receptorů naleží také neurosteroidy. Například pregnenolon sulfát je endogenní NMDA agonista, který aktivuje GluNR1 a GluNR2A-B, ale inhibuje NR2C a 2D podjednotky (Adamusová et al., 2013; Kew and Kemp, 2005). Přesný mechanismus jejich působení je nyní předmětem výzkumu, zdá se však, že mnohé z neurosteroidů by mohly nalézt terapeutické uplatnění například v léčbě neurodegenerativních onemocnění (Borovska et al., 2012).

Dvojí efekt byl rovněž pozorovaný u ATP, kompetitivního antagonisty na glutamátovém receptoru. Na jiném místě kanálu totiž ATP zesiluje funkci NMDA receptorů, proto při nedostatku glutamátu sice převládá jeho antagonistický efekt, ovšem v opačném případě ATP působí jako pozitivní alosterický modulátor (Kloda et al., 2004).

Funkční význam glutamátových receptorů

Glutamátové receptory (obzvláště NMDA) jsou zodpovědné za přirozený vývoj mozku a účastní se mnoha fyziologických procesů, jako je například neurální růst a migrace během vývoje mozku, neuroendokrinní regulační funkce (sekrece hormonů reprodukčního cyklu), vnímání a zpracování vnějších podnětů a motoriky, plasticita paměti, spánek a bdění (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Shi and Yu, 2013; Sundaram et al., 2012; Szczurowska and Mares, 2013). Jejich patologie pak může zákonitě vyústit v mnohá neurologická onemocnění. Terapeuticky se využívají agonisté, antagonisté i modulátory glutamátových receptorů, v poslední době se však také objevuje cílená terapie na konkrétní podjednotky jednotlivých receptorů (např. GluNR2B) s cílem zvýšit efektivitu a snížit nežádoucí účinky farmakologické intervence (Mony et al., 2009; Santangelo et al., 2012).

Hyperfunkce glutamátových receptorů - excitotoxicita

Pojem glutamátová excitotoxicita jako první použil Olney (1969) při popisu toxických efektů sodné soli glutamátu na smrt nervových buněk u vyvíjejícího se mozku myší. Jedná se o patologický proces, který ničí neurony následkem excesivní stimulace neuropřenašeči, např. glutamátem, a je považován za odpověď CNS na své poškození. Mechanismem této toxicity je zřejmě vstup vysokých koncentrací Ca^{2+} do buněk následkem přílišné stimulace receptorů. Následné osmotické změny vedou k otoku buněk a jejich poškozování. Vstup vápníkových iontů dále aktivuje množství enzymů (*fosfolipázy, kinázy, endonukleázy, proteázy*), které poškozují buněčné struktury – části cytoskeletonu, membrány a DNA – tvorbou volných kyslíkových radikálů, arachidonové kyseliny a dalších působků. Předpokládá se, že právě tyto procesy zapříčinují buněčnou smrt. Podíl na excitotoxicitě zřejmě mají všechny iontové kanály spojené s glutamátovými receptory (Choi, 1985; Dickenson, 2001; Sundaram et al., 2012; Willard and Koochekpour, 2013).

Excitotoxicita glutamátu je zahrnuta v mnoha patologiích, jako jsou cévní mozková příhoda, traumatické poškození mozku, hypoglykémie, epileptické záchvaty, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba, amyotrofní laterální skleróza, fibromyalgie, demence spojená s AIDS, Parkinsonova choroba, Huntingtonova

choroba, migréna aj. (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Gasparini and Griffiths, 2013; Javitt et al., 2011; Willard and Koochekpour, 2013).

Epilepsie a vývojové změny

Existují důkazy, že kromě snížené funkce GABA-ergního systému má na spouštění i trvání epileptických záхватů vliv právě také uvolňování glutamátu. Agonisté NMDA receptorů vyvolávají epileptické záхватy, s vysokým efektem obzvláště v časném vývojovém stádiu mozku a s poklesem s rostoucím věkem. Exprese glutamátových receptorů je regulována během vývoje jedince, mění se také zastoupení různých podjednotek receptorů. Glutamátové receptory jsou klíčové pro neuronální plasticitu a vývoj CNS. Obecně je nezralý mozek mnohem náchylnější k excitotoxicckým neuronálním zraněním, funkční stav glutamátových receptorů zřejmě reguluje odpověď mozku na inzult (Dickenson, 2001; Szczurowska and Mares, 2013).

Látky schopné blokovat NMDA receptory naopak působí v experimentech antikonvulzivně, nezávisle na jejich mechanismu účinku. Důležitá je lokalizace NMDA receptoru, synaptické receptory bývají neuroprotektivní, zatímco extrasynaptické receptory preferenčně zprostředkovávají procesy vedoucí k buněčné smrti. Platí také, že jedním z mechanismů účinku klinicky užívaného antiepileptika lamotriginu je snížení výdeje glutamátu ze synaptických zakončení. Také antagonisté AMPA receptorů (například i klinicky užívaný topiramát, nebo talampanel) a GluR5 (kainátový receptor) mají antikonvulzivní aktivitu (Dickenson, 2001; Szczurowska and Mares, 2013; Watkins and Jane, 2006).

Bolest

AMPA receptory jsou aktivovány jako odpověď na jednoduchý akutní stimulus (rychlý přenos vnímání bolestivého podnětu), NMDA receptory jsou aktivovány po opakování bolestivých stimulech a za předpokladu, že podnět stále přetrvává. NMDA receptory se účastní mnoha patologických forem bolesti, jejich antagonisté působí například proti neuropatické bolesti, ischemické bolesti, alodynii či bolesti spojené se zánětem. Ketamin a amantadin blokující NMDA receptorový

kanál mírní chronickou a neuropatickou bolest. Limitací jejich užití jsou však nežádoucí účinky (Dickenson, 2001; Dingledine et al., 1999).

Paměť

Základem paměťových procesů je dlouhodobá potenciace (LTP). Ta umožňuje přetrvávající zesílení synaptické síly (synaptické plasticity), jako následek určitého typu tetanické elektrické stimulace dřostředivých neuronálních drah hipokampu, kortextu, amygdaly a dalších částí nervové soustavy. Dochází ke spuštění specifických intracelulárních procesů, které vedou k potenciaci synapse uvolněním glutamátu. Blokování synaptických glutamátových receptorů narušuje synaptickou plasticitu a způsobuje poruchy paměti. Procesy zapomínání zase souvisejí s dlouhodobou depresí (LTD). LTD je reversibilně blokována také antagonisty NMDA receptorů. Postsynaptický vstup Ca^{2+} je zřejmě kritický pro indukci LTP i LTD, další procesy LTP jsou již závislé na intracelulárních cestách. Kromě zapojení NMDA a AMPA receptorů se také uvažuje o pozitivním vlivu mGluR (skupina 1) na NMDA receptorem zprostředkovanou LTP (Dickenson, 2001; Santangelo et al., 2012; Watkins and Jane, 2006).

Neurodegenerativní onemocnění

U pacientů s Parkinsonovou chorobou byl prokázán defekt v energetickém metabolismu mitochondrií, který zřejmě zapříčinuje depolarizaci neuronů a tedy jednoduší uvolnění Mg^{2+} z iontového kanálu NMDA receptoru. Výsledná nadměrná stimulace neuronů může přispět k smrti nigrostriatálních buněk (Dickenson, 2001; Sundaram et al., 2012). Amantadin, látka schopná zmírnovat parkinsonické příznaky, je blokátor NMDA kanálu (Dingledine et al., 1999). Preklinické studie poukázaly na příznivý efekt blokády postsynaptické glutamátové transmise (NMDA a NR2B antagonisté), negativních alosterických modulátorů mGlu5 či pozitivních alosterických modulátorů mGlu4 (Finley and Duty, 2014).

Antagonisté NMDA receptorů se běžně užívají ke zpomalení excitotoxicické neurodegenerace u Alzheimerovy choroby. Zástupcem v této indikaci je memantin, antagonist iontového kanálu NMDA receptoru s nízkou afinitou. Memantin

napodobuje působení Mg^{2+} iontů v kanálu, které je právě u demence narušené (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006).

Úzkost a deprese

V terapii úzkosti a deprese lze dosáhnout efektu nejenom stimulací GABA, ale také ovlivněním glutamátergní neurotransmise. Slibným terapeutickým cílem se zdají být agonisté AMPA receptorů a mGluR skupiny 2 a 3 (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006; Watkins and Jane, 2006). Ketamin, antagonist NMDA receptorů, prokázal rychlý antidepresivní efekt u pacientů s rezistentní, obtížně kompenzovatelnou depresí, unipolární i bipolární (Berman et al., 2000; Niciu et al., 2013). Ve fázi animálních i klinických studií se nachází také riluzol a lamotrigin, obě interferují s glutamátergním systémem. Částečný efekt vykazovaly D-cykloserin, antagonisté GluNR2B regulačních podjednotek NMDA receptorů (např. látky ze skupiny prodilů) a pozitivní alosterické modulátory AMPA receptorů (Lapidus et al., 2013; Mony et al., 2009; Santangelo et al., 2012).

Hypofunkce glutamátových receptorů

Typickým příkladem snížené funkce glutamátových receptorů je onemocnění schizofrenie. Příčina schizofrenie byla několik desítek let vysvětlována dopaminovou teorií, ta však mohla těžko objasnit negativní symptomy schizofreniků. Zlom přišel se zavedením modelu schizofrenie po podání PCP (fencyklidinu), antagonisty glutamátových receptorů (Javitt, 1987). Antagonisté NMDA receptorů mohou napodobit pozitivní i negativní příznaky schizofrenie, včetně kognitivních deficitů a neuropsychologické dysfunkce. Terapeuticky jsou pak testováni metabotropní glutamátoví agonisté (mGluR2 a 3) a inhibitory glicinových transportérů (Jawitt, 2012; Moreno et al., 2009; Santangelo et al., 2012). Více o této problematice bude pojednáno v následující kapitole.

Stimulace glutamátových receptorů může být také účinná u primárních paměťových deficitů (von Bohlen und Halbach and Dermietzel, 2006). Sníženou frontální glutamátergní regulaci dopaminových buněk pro přirozené odměny a naopak zvýšenou reaktivitu jako odpověď na drogové podněty nalézáme u drogově závislých jedinců (Javitt et al., 2011).

4. Animální modely schizofrenie

Animální modely schizofrenie (myši, potkani, morčata, fretky, primáti, ale třeba také rybka zebřička pruhovaná) jsou nezbytným experimentálním nástrojem pro objasnění patofyziologie tohoto onemocnění, sledování jeho vlivu na chování jedince a zároveň pro pochopení účinku již užívaných či nově vyvíjených antipsychotik. Stejně tak lze také hodnotit případné vedlejší účinky antipsychotik, jako jsou extrapyramidové symptomy, tarditivní dyskinezia či metabolické efekty (Boksa, 2007). Animální modely stály u objasnění mechanismu účinku neuroleptik skrze blokádu D₂ receptorů (Seeman, 1987), ale i u novějších objevů věnovaných druhé generaci antipsychotik, jež ovlivňuje neurodegeneraci, synaptickou plasticitu a remodelaci synapsí (Bai et al., 2004). Svoji roli u manifestace schizofrenie pak hraje nejenom dysregulace určitých neuropřenašečových systémů, ale také genetické, molekulární, neurovývojové a environmentální vlivy. Odtud se pak odvíjí různé možnosti modelování schizofrenie.

Je samozřejmé, že animální modely mají své limity a že nelze nikdy komplexně namodelovat tak složité onemocnění, jakým je schizofrenie. Přesněji řečeno tedy u zvířecích modelů pozorujeme spíše endofenotypy příbuzné schizofrenii, spjaté s určitými kandidátními geny, dědičností a parametry onemocnění (Gottesman and Gould, 2003). Takto namodelovaná schizofrenie má několik základních rysů, jež lze sledovat. Patří k nim změny psychiky a chování (tj. model pro např. pracovní paměť, selektivní pozornost, sociální interakce), psychofyziologická měření (např. prepulzní inhibice úlekové reakce, evokované mozkové potenciály), změny v mozkových strukturách (např. objem mozkových komor a dalších regionů, hustota neuronů a jejich migrace, množství a struktura oligodendrocytů), neurochemie (např. dopaminu, glutamátu, serotoninu, GABA) a také změny exprese širokého množství genových produktů. Některé tyto abnormality jsou typické pouze pro schizofrenii, jiné se vyskytují u většího množství psychiatrických chorob (Boksa, 2007).

K testování různých aspektů schizofrenie lze využít změny v následujících behaviorálních charakteristikách (tabulka 4):

Tabulka 4 Chování potkanů a jeho vztah k schizofrenním symptomům (podle Powell and Miyakawa, 2006).

<u>Pozitivní příznaky</u>	Psychomotorická agitace	Sensitivita k psychomimetikům	
	lokomotorická aktivita	↑ lokomotorická odpověď na nekompetitivní NMDA antagonisty	
	lokomotorická aktivita jako odpověď na novost	↑ lokomotorická odpověď na amfetamin	
		↑ senzitivita na psychomimetika v dalších testech (např. efekt MK801 v testu prepulzní inhibice)	
<u>Negativní příznaky</u>	Snížená socializace		
	↓ Snížená interakce s mláďaty stejného druhu		
	↓ Snížená preference pro mladé jedince umístěný v klícce		
	↓ preference sociální novosti		
	změněná sociální dominance		
	změny v testech agrese (test vetřelce)		
	změny v testech stavění hnizda		
<u>Kognitivní příznaky</u>	Zhoršení pracovní paměti	Deficity pozornosti, sensorimotorických vstupů, exekutivních funkcí	Obecné kognitivní deficity
	poruchy alternace v T-bludišti	snižení sensorimotorických vstupů (prepulzní inhibice)	narušené prostorové učení v Morrisově vodním bludišti
	poruchy v 8-ramenném radiálním bludišti	snižená latentní inhibice	narušené prostorové učení v 8-ramenném radiálním bludišti
		<i>5-choice serial reaction time test</i>	
		snižená schopnost <i>set-shifting</i> (speciální typ přeучení)	

4.1 Farmakologické modely schizofrenie

Jako první se objevila teorie, že schizofrenie vzniká následkem hyperfunkce mesolimbického dopaminergního systému (Seeman, 1987; Snyder et al., 1970; Seeman and Seeman, 2014). Objev, že psychomimetikum fencyklidin blokuje NMDA receptory, zase podnítil teorii glutamátergní hypofunkce jako jedné z příčin schizofrenie (Anis et al, 1983; Javitt, 1987). Od těchto objevů se odvíjely první farmakologické animální modely schizofrenie.

Dopaminoví agonisté

Látky působící jako agonisté dopaminu evokují psychózu připomínající pozitivní symptomy schizofrenie. Patří mezi ně například amfetamin, který působí na dopaminové přenašeče v plazmatické membráně a zvyšuje uvolňování dopaminu z presynaptických zásob do synaptické štěrbiny. Psychóza indukovaná amfetaminem byla poprvé popsána již v padesátých letech minulého století a projevovala se například zvukovými halucinacemi a perzekutivními deziluzemi. Podobné účinky vyvolává také kokain, inhibitor monoaminových přenašečů. Podání těchto látek navozuje hyperlokomoci a psychotické příznaky jak u experimentálních zvířat, tak u lidí.

Na rozdíl od NMDA antagonistů nemají dopaminoví agonisté negativní vliv na sociální interakce (spíše naopak), nelze je tedy použít k modelování negativních příznaků schizofrenie (Powell and Miyakawa, 2006; Rung et al., 2005). Senzitizace amfetaminem však může vykazovat určité abnormality v testech prepulzní inhibice a některých kognitivních testech, zvláště těch závislých na PFC, nikoliv však na hipokampu. Po opakováném podávání amfetaminu lze pozorovat množství neurochemických a strukturálních změn v CNS – např. v oblasti *nucleus accumbens* a PFC (Jones et al., 2011).

Také apomorfín, agonista dopaminových D₁ a D₂ receptorů, indukuje typické dopaminem zprostředkované schizofrenní chování – lokomotorickou hyperaktivitu, lezení, stereotypní chování, nadměrnou péči o vzhled, olizování a okusování (Jones et al., 2011). Myši s knock-outovanými dopaminovými transportéry vykazují lokomotorickou hyperaktivitu ve vztahu k novým podnětům, narušení v testech

prepulzní inhibice, repetativní pohyby, ale také deficit v prostorovém učení (Powell and Miyakawa, 2006). V tomto případě už se však jedná o genetický model navržený na základě farmakologických znalostí.

Antagonisté NMDA receptorů

Antagonisté NMDA receptorů mohou na rozdíl od dopaminových agonistů napodobit nejenom pozitivní, ale zároveň negativní příznaky schizofrenie, včetně kognitivních deficitů a neuropsychologické dysfunkce. Na jejich manifestaci se zřejmě podílí glycine-modulatorní místo NMDA receptoru, které ovlivňuje dobu otevření iontového kanálu a stupeň desenzitizace v přítomnosti agonisty (glutamát), samo o sobě však nedokáže indukovat otevření kanálu. Přidáním pozitivních alosterických modulátorů na glycineovém místě (glycine, inhibitory glycineových transportérů, D-serin, D-cykloserin) k typickým antipsychotikům je možné naopak docílit zesílení příznivého efektu na negativní a kognitivní symptomy schizofrenie (Javitt, 2012; Javitt et al., 2012).

K typickým a dlouho užívaným modelovým látkám, které působí skrze NMDA receptor patří jeho nekompetitivní antagonisté ketamin, fencyklidin (PCP) a MK-801 (Javitt, 2012). Všechny zmíněné látky indukují halucinace a deziluze u zdravých lidských jedinců a mohou vést k exacerbaci psychotických příznaků u akutních i chronických schizofreniků (Lahti et al., 2011). Akutní i chronické užívání PCP navíc zhoršuje kognitivní schopnosti testovaných jedinců, což však může být zvráceno přerušením užívání drogy (Javitt and Zukin, 1991). Zneužívání PCP je doprovázeno deficitem v temporálních a frontálních lalocích, což jsou změny, které pozorujeme také u schizofrenních pacientů (Hertzmann et al., 1990).

Antagonisté NMDA receptorů v animálních modelech zvyšují lokomotorickou aktivitu potkanů, snižují jejich ochotu k sociálním kontaktům (Rung et al., 2005; Tamminga et al., 2003), narušují prepulzní inhibici a kognitivní schopnosti (Egerton et al., 2005; Mansbach and Geyer, 1991). Kognitivní deficit byly pozorovány v testech behaviorální flexibility (Stefani and Moghaddam, 2005), rozpoznávání nových sociálních podnětů (*social novelty*) (Harich et al., 2007), pracovní paměti v Morrisově vodním bludišti (Andersen and Pouzet, 2004; Lobellová et al., 2013), ve zpožděné prostorové alternaci (*delayed spatial alternation*

task) (Wiley et al., 2003) a kontinuální prostorové alternaci (*continuous spatial alternation task*) (Boctor and Ferguson, 2010). Efekt těchto látek však může být zmírněn podáním antipsychotik (Broberg et al., 2009; Freed et al., 1984; O'Neill and Shaw, 1999).

Další možnosti

S pokračujícím výzkumem vztahu neuromediátorů k schizofrenii se jako rizikové jeví také abnormality GABA neuronů. Existují například nálezy, že defekty v signalizaci skrze neurotrofinové receptory (TrkB) vedou ke snížení syntézy GABA v inhibičních neuronech dorzolaterální PFC schizofreniků. I přes kompenzační mechanismy tento defekt vyústí ve snížení gamma oscilací a tedy i neuronální aktivity nezbytné pro pracovní paměť (Lewis et al., 2005; Gonzales-Burgos et al., 2010).

4.2 Neurovývojové modely schizofrenie

Lidské epidemiologické studie prokázaly, že expozice novorozenců (v době perinatální či gestační) nežádoucím zásahům zevního prostředí může vést k rozvoji schizofrenie. V poslední době se také sleduje vliv případné genetické predispozice. Expozice predisponovaných jedinců nežádoucímu vlivu prostředí během jejich časného vývoje spouští odlišný vzor vývoje neuronů a jejich konektivity, což následně vyústí v expresi fenotypu schizofrenie. Stěžejní je pak období, ve kterém k zásahu dochází. Neurovývojové animální modely schizofrenie zahrnují manipulace se zevním prostředím, podání různých farmak během citlivého perinatálního období či způsobení ireversibilních změn CNS během jejího vývoje. Dlouhodobé změny chování se pak typicky objevují v post-pubertálním období (Jones et al., 2011).

Mezi enviromentální faktory se vztahem k vývoji mozku a zvýšenému riziku rozvoje schizofrenie patří například porodní komplikace, diabetes u matky, podvýživa matky, preeklampsie, stres a virová či bakteriální infekce během těhotenství, růstová retardace v děloze, fetální/neonatální hypoxie, sociální izolace novorozenců po období kojení (Boksa, 2004; Boksa and Luheshi, 2003; Jones et al., 2011; Ratajczak et al., 2013). K neurovývojovým modelům schizofrenie naleží také chirurgické zásahy do CNS. Jako příklad lze zmínit časné postnatální léze

ventrálního hipokampu, které vedou k hyperaktivitě potkanů jako odpovědi na nové prostředí (Sams-Dodd et al., 1997). K vážnému narušení chování během pozdějšího vývoje stačí i přechodná inaktivace ventrálního hipokampu během kritického období vývoje CNS. Mezi mozkové struktury se vztahem k rozvoji schizofrenie a úzce propojené s hipokampální formací lze řadit striatum, *nucleus accumbens*, dorzolaterální PFC, dorzální thalamus. Tyto regiony jsou také cílem působení antipsychotik (Harrison and Weinberger, 2005; Lipska, 2004).

Zajímavým, i když později působícím, environmentálním faktorem je také užívání kanabinoidů u adolescentů, experimentálně pak u mladých potkanů. Kanabinoidy jsou považovány za možné spouštěče schizofrenie, neboť modulují dopaminergní transmisi. Jejich užívání může vést ke zvýšené citlivosti dopaminových neuronů a změně dendritických struktur v PFC, při dlouhodobé expozici pak k poruchám paměti a sociálních interakcí (Boksa, 2007; Rodriguez et al., 2001). K rozvoji schizofrenie následkem užívání kanabinoidů dochází též na základě genetické predispozice, např. funkčního polymorfismu genu COMT (Caspi et al., 2005).

4.3 Genetické modely schizofrenie

Díky genetickým studiím lidské populace se podařilo vytipovat několik kandidátních genů pro schizofrenii - např. DISC-1 (*disrupted-in-schizophrenia 1*), dysbindin, reelin, COMT, NRG1 (neuregulin 1) a jeho receptor ERBB4, byť představují hlavně zvýšené či snížené riziko rozvoje tohoto onemocnění. Nejvíce narušené jsou geny vázané k proteinům vztahujícím se k neuronální plasticitě, glutamátergní či dopaminergní funkci a synaptogenezi (Allen et al., 2008; Boksa, 2007; Harrison and Weinberger, 2005; Jones, 2011).

Není vždy jednoduché určit vztah daných genů k vývoji nervové soustavy a chování jedinců. K objasnění je však možné využít animální modely zdravých jedinců – ke zjištění základní biologie těchto genů a jejich proteinů, lokalizaci genů a jejich buněčné funkce. Nebo posléze můžeme vývojové, behaviorální a molekulární důsledky dysregulace specifických genů vysvětlit s užitím běžně se vyskytujících

mutantních myší či za pomoci genetického inženýrství (Boksa, 2007; Powell and Miyakawa, 2006).

Mezi genetické modely schizofrenie náleží například myši s *knock-out* nebo *knock-down* dopaminových transportérů, *knock-down* určitých podjednotek NMDA receptorů, mutanti vazebného místa pro glycín na NMDA receptorech, neuregulin *knock-out* myši, kalcineurin (kalcium a kalmodulin-dependentní protein fosfatáza) *knock-out* myši, NPAS1/3 dvojitě knockoutované myši, Dvl1 knock-outované myši, homozygotní *reeler knock-out* myši. Některé z nich jsou schopné napodobit také negativní symptomy schizofrenie (Jones et al., 2011; Powell and Miyakawa, 2006). Mnohé z těchto modelů byly vyvinuty na základě předchozích farmakologických experimentů s animálními modely schizofrenie.

Jedním z nedávno objevených genetických modelů schizofrenie je *down-regulace* genu kódujícího protein Nogo-A. Nogo-A isoforma je hlavním s myelinem-asociovaným inhibitorem axonálního růstu a regenerace. Jedná se o multifunkční protein, který reguluje také buněčnou migraci, axonální navigaci, větvení dendritů, diferenciaci oligodendrocytů a synaptickou plasticitu v hipokampu (Akbik et al., 2011; Delekate et al., 2011; Pernet and Schwab, 2012; Schmandke and Schwab, 2014). Jeho inhibice se uplatňuje například při obnovení růstu poškozených axonů a/nebo kompenzační plasticity v rezervních částech CNS, terapeuticky se uvažuje o jejich využití při míšních poraněních či poškození mozku následkem mrtvice (Liebscher et al., 2005; Wiessner et al., 2003; Zorner and Schwab, 2010).

Nogo signální dráhy jsou však také zahrnuté v patologii psychiatrických onemocnění, zřejmě následkem porušení regulatorní funkce vývoje synapsí a jejich plasticity. U jedinců s redukcí exprese Nogo-A dochází k specifickým behaviorálním abnormalitám, jež lze považovat za kognitivní endofenotyp schizofrenie - např. narušená filtrace vnějších podnětů – sensorimotorické zpracování, poškozená latentní inhibice, perseverační chování, zvýšená senzitivita k lokomotorické stimulaci po podání amfetaminu (Petrásek et al., 2014; Willi et al., 2010).

II. Cíle práce

Experimenty, jež jsou součástí disertační práce, byly navrženy tak, aby přispěly k bližšímu objasnění vlivu jednotlivých systémů neuropřenašečů centrální nervové soustavy (noradrenergní, dopaminergní, glutamátergní) na prostorovou navigaci, koordinaci a flexibilitu v animálních modelech. Zajímala nás obzvlášť kooperace daných neuromediátorových systémů, neboť v živém organismu nefungují jeho jednotlivé složky separátně, nýbrž tvoří složitý vzájemně se regulující celek. Není divu, že v posledních několika letech přibývají studie zabývající se právě interakcemi mezi jednotlivými systémy, což souvisí i s úspěšným vývojem nových farmak ovlivňujících více různých receptorových systémů.

Při studiu prostorové paměti a flexibility byly využity nejenom farmakologické manipulace, ale také transgenní potkaní model schizofrenie (*knock-down* Nogo-A proteinu). Testování probíhalo v různých variantách kognitivních úloh bludiště Kolotoč a Morrisova vodního bludiště (MWM).

Zabývali jsme se následujícími experimentálními otázkami a hypotézami:

1. Je známo, že aplikace β -blokátorů ovlivňuje behaviorální funkce včetně učení a paměti. U α_1 antagonistů tak silný efekt pozorovaný nebývá. Je možné, že kombinací α_1 i β antagonismu dojde k poškození kognitivních funkcí již při dávkách β -blokátoru, které samy o sobě žádný klinicky pozorovatelný deficit nevykazují? Působí α_1 - a β -blokáda v synergii?

K stanovení účinku antagonismu α_1 receptorů byl aplikován prazosin, látka, jež v publikovaných studiích vykazovala pouze minoritní efekt na kognitivní funkce. Během předešlé studie naší laboratoře byla stanovena stropová dávka pro poškození motorické aktivity testovaného zvířete, tedy i pro první známky deficitu v dané úloze (Stuchlik and Vales, 2008). Efekt propranololu, betablokátoru užívaného během experimentů, bývá studovaný obzvláště v kontextu konsolidace paměti po testu. V pilotních experimentech se nám však podařilo prokázat deficity v bludišti Kolotoč u potkanů po podání propranololu, včetně určení prahové dávky (Stuchlik et al., 2009).

Již dříve byly popsány interakce mezi systémově podaným α_1 antagonistou prazosinem a D₂ antagonistou sulpiridem způsobující kognitivní i motorický deficit testovaných zvířat (Stuchlik et al., 2008). Efekt ko-aplikace prazosinu a propranololu zatím studován nebyl, dá se však předpokládat, že se může projevit podobně jako při behaviorálních deficitech během současné blokády α_1 a D₂ receptorů. Dle naší hypotézy se dá očekávat poškození prostorového učení v důsledku současného antagonismu odpovídajících adrenoceptorů.

2. Existuje-li interakce mezi D₂ receptory a α_1 adrenoceptory způsobující poruchy prostorové navigace a koordinace testovaných zvířat, lze tuto interakci pozorovat také mezi D₂ a β receptory?

Jak bylo zmíněno, již dříve se nám podařilo popsat behaviorální deficit a negativní vliv na prostorovou paměť u ko-aplikace D₂ a α_1 antagonistů. Podobné studie synergismu existují i pro další z neuropřenašečových systémů. Klinicky zajímavou otázkou je bezpochyby i možný efekt ko-aplikace D₂ antagonisty (atypického antipsychotika sulpiridu) a antagonisty β receptorů (propranololu), neboť oba typy farmak se běžně vyskytují v praxi (což ostatně platí i pro α a β -blokátory, které užívá velké množství pacientů).

3. Mezi animální modely schizofrenie patří podání látky MK-801, nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů. Cílem další studie bylo stanovit kvalitativní i kvantitativní efekt podání MK-801 na behaviorální flexibilitu a lokomoci v testech založených na prověření právě této složky kognice, která je u schizofrenie výrazně narušená.

Jedny z typických příznaků schizofrenie, které je možné testovat v laboratorních podmínkách, jsou behaviorální flexibilita, adaptace na měnící se experimentální podmínky, a lokomoční změny. Lze je považovat za analogii kognitivních (flexibilita) a pozitivních (lokomoce) příznaků tohoto onemocnění. Naším cílem bylo ověřit hypotézu, že aplikace MK-801 způsobí deficit flexibility v úloze přeučení (*reversal* - změna podmínek úlohy v druhé části experimentu). Dále nás zajímalo porovnání dvou zavedených testů prostorové navigace a koordinace (bludiště Kolotoč a MWM) a jejich sensitivita k deficitům způsobeným MK-801 při

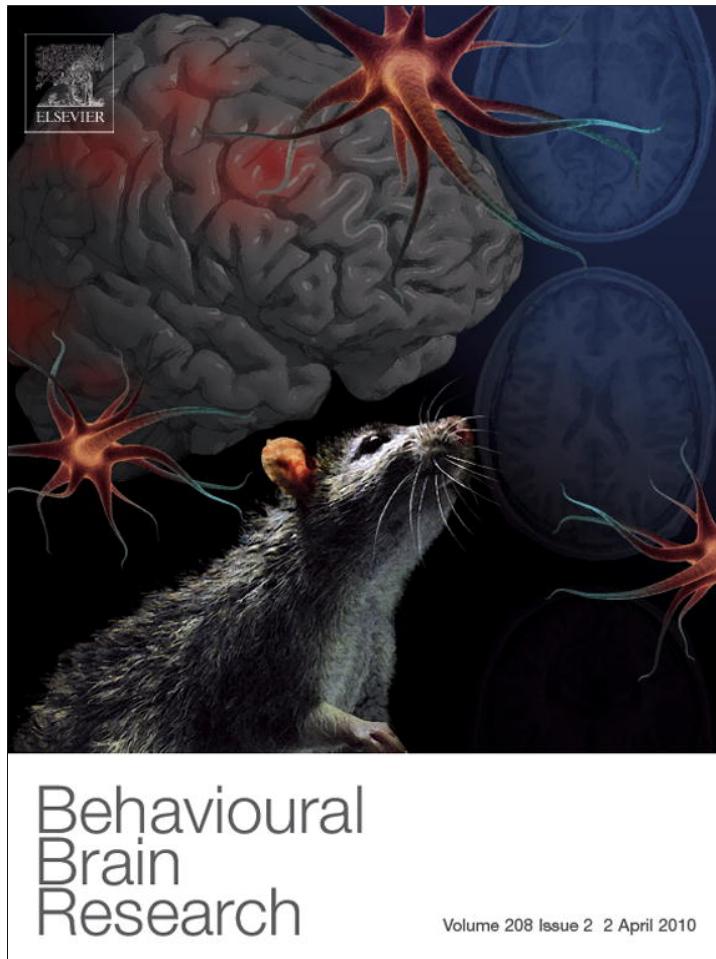
změně experimentálních podmínek. Aby bylo možné závěry studie využít pro další výzkum, pokusili jsme se stanovit dávkovou závislost těchto účinků v obou úlohách.

4. Mutace v genu kódující Nogo-A protein či jeho abnormální exprese je spjatá s fenotypem schizofrenie. Zda se redukovaná exprese Nogo-A v novém transgenním modelu potkana projeví v poškozené prostorové navigaci, jsme se pokusili objasnit experimentálně.

V několika studiích byly popsány různé behaviorální deficity u Nogo-A *knock-out* myší (Willi et al., 2010) a často byly interpretovány jako endofenotypy schizofrenie. Poškození regulační funkce proteinu Nogo-A při tvorbě synapsí a jejich plasticitě může vést k neurovývojovým dysfunkcím a zde spatřujeme vztah k symptomům schizofrenie. Nogo-A protein také v celogenomových studiích asocioval se schizofrenií u lidí. Naším cílem bylo prozkoumat možné behaviorální efekty redukované Nogo-A exprese u transgenních potkanů. Byla navržena speciální baterie testů v bludišti Kolotoč zaměřená na segregaci referenčních rámců a flexibilitu testovaných jedinců, která je velmi citlivá i na drobná kognitivní poškození. Následně byli potkani testováni na prostorovou paměť v Morrisově vodním bludišti ve verzi *delayed-matching-to-place*, která je striktně závislá na hipokampu.

III. Vložené články

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Research report

Combined administration of alpha1-adrenoceptor antagonist prazosin and beta-blocker propranolol impairs spatial avoidance learning on a dry arena

Tomas Petrasek, Vanessa Doulames, Iva Prokopova, Karel Vales, Ales Stuchlik*

Institute of Physiology AS CR, v.v.i., Videnska 1083, 14220 Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 November 2009
 Received in revised form 8 December 2009
 Accepted 10 December 2009
 Available online 24 December 2009

Keywords:

Learning
 Memory
 Place avoidance
 AAPA
 Prazosin
 Propranolol
 Adrenoceptors

ABSTRACT

Spatial learning is a widely studied type of animal behavior often considered as a model of higher human cognitive functions. Noradrenergic receptors play a modulatory role in many nerve functions, including vigilance, attention, reward, learning and memory. The present study aimed at studying the effects of separate or combined systemic administration of the alpha1-adrenergic antagonist prazosin (1 and 2 mg/kg) and beta-blocker propranolol (5 and 20 mg/kg) on the hippocampus-dependent learning in the active allothetic place avoidance (AAPA) task. Both centrally active drugs impaired spatial learning when administered together, exerting no effect in separate applications. Locomotion was impaired only in a combined application of higher doses of both drugs (2 mg/kg prazosin and 20 mg/kg propranolol). These results suggest an *in vivo* interaction between these two types of receptors in spatial navigation regulation.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Noradrenaline and adrenaline exert many effects and mediate a number of functions not only in peripheral tissues but also in the central nervous system (CNS), where noradrenaline dominates. These behavioral effects include a modulation of vigilance, arousal, attention [25,27], motivation and reward [6], learning and memory [26]. Almost all brain noradrenergic fibers arise in brainstem nuclei designated A1–A7 (including the locus coeruleus, a nucleus in which about 45% of all noradrenergic projections originate [29]). The effects of noradrenaline are mediated by two distinct super-families of receptors, named alpha- and beta-adrenoceptors [28]. Alpha-adrenoceptors are divided into two families, alpha1- and alpha2-subtypes. Originally it was assumed that alpha1-adrenergic receptors were solely post-synaptic in the CNS, whilst the alpha2-subtype was localized pre-synaptically; however, both types were later found in both pre-synaptic and post-synaptic membrane regions [29]. Both alpha1- and alpha2-adrenoceptors are further divided into subgroups, as well as beta-adrenoceptors, which are also found both in the brain and periphery.

Prazosin, an antagonist of alpha1-adrenoceptors (with no selectivity for their individual subtypes), is used to assess the role of

these types of receptors in the regulation of behavioral functions and their involvement in learning and memory [9,10,33]. However, the blockade of alpha1-adrenoceptors was found to have only minor effects on learning and cognitive functions, as revealed by several studies (e.g. [24,33]). Our previous paper showed that a blockade of alpha1-adrenergic receptors in the brain using prazosin resulted in learning impairments at higher doses (4 mg/kg), which concurrently disrupted motor activity, suggesting a procedural deficit and no selective effects upon cognition [33]. To the contrary, the actions of the centrally active beta-blocker propranolol are relatively well-studied, especially with respect to memory consolidation (implying application of propranolol after a conditioning session [2,12]). The effects of propranolol administered prior to testing have been studied less frequently. Our previous study [30] assessed learning in the place avoidance task (a spatial learning test) in rats treated with various doses of propranolol and found relatively selective disruption of place avoidance learning at a dose of 25 mg/kg, which did not disrupt motor activity. Similarly, Heron et al. [13] demonstrated impairment by propranolol in the acquisition on the motor runway task, suggesting the effects of propranolol were not restricted to the domain of relational memory.

The above-mentioned place avoidance task, especially its modification named active allothetic place avoidance (AAPA), has proved to be a useful paradigm for assessing learning and cognitive functions and their alterations caused by neuropharmacological, lesion and other experimental manipulations [21,22,31,35,38]. This test is highly dependent upon the integrity of hippocampi on both sides

* Corresponding author. Tel.: +420 24106 2538; fax: +420 24106 2488.
 E-mail address: stuchlik@biomed.cas.cz (A. Stuchlik).

of the brain [4] and it has been demonstrated to require cognitive coordination, which has been described as the ability to segregate the spatial stimuli from the arena and room frames (which are dissociated by the constant rotation of AAPA arena [15,39]). Recently, we employed the task in a study aimed at elucidating interactions between the systemically applied alpha1-blocker prazosin and dopamine D2 receptor antagonist sulpiride, which were found to act synergistically and impaired both locomotor activity and avoidance efficiency in the AAPA task when co-applied [31]. It should be emphasized that studying the effects of specific receptor antagonists on learning and memory function ranks amongst the most intensively studied topics today (for review see Myhrer [20]).

Despite the effects of prazosin and propranolol pre-test application found in past years, their contribution was investigated mainly separately but not in combined administration. Therefore, the present study was aimed at elucidating the interaction of both prazosin and propranolol at the systemic level, an approach which may preliminarily suggest the nature of the *in vivo* interplay between corresponding types of adrenoceptors. The experimental hypothesis of the present study was that combined administration of both drugs (at doses eliciting no effect when administered separately) would impair spatial leaning in the AAPA task. We have also addressed the question whether this disruption was relatively selective to cognition or if locomotor activity and procedural aspects of the task would be also compromised.

2. Methods

2.1. Animals

Seventy-one naive male adult Long-Evans rats (3–4 months old, weighing 250–300 g) obtained from the breeding colony of the Institute of Physiology, ASCR were used in the study. The animals were housed in pairs in 30 cm × 30 cm × 40 cm plastic translucent cages in an air-conditioned animal room with a stable temperature (21 °C) and 12/12 light/dark cycle (lights on at 7:00). Conscious rats were gently implanted with a hypodermic needle, piercing the rat's skin between its shoulders, and creating a small loop on the needle with tweezers. The loop prevented the needle from slipping out and provided purchase for an alligator clip, which was connected a shock-delivering cable, used in behavioral testing. Water and food was available *ad libitum*. All experimental manipulations were pursued in accordance with the Animal Protection Code of Czech Republic, NIH guidelines and with EU directive 86/609/EEC.

2.2. Drugs

Prazosin hydrochloride and propranolol hydrochloride were purchased from Sigma Aldrich, Czech Republic. Prazosin was dissolved in distilled water at a concentration of 0.5 mg/ml (maximum concentration obtainable), and injected intraperitoneally 20 min prior to behavioral testing in the AAPA task at doses of 1 and 2 mg/kg. As a control for prazosin injections, saline (0.9% solution of NaCl) was injected at a volume of 4 ml/kg. Propranolol was dissolved in distilled water at concentrations of 5 and 20 mg/ml and injected 20 min prior to every session at doses 5 and 20 mg/kg (corresponding to 1 ml/kg of solution). Sterile saline (1 ml/kg) was injected as a control for propranolol injection.

There were nine experimental groups used in this study. The control group was given two injections of saline (4 and 1 ml/kg; n = 8; control group). Prazosin-only groups were injected by prazosin (1 and 2 mg/kg) and saline (1 ml/kg, n = 8). Propranolol-only groups were given saline (4 ml/kg) and propranolol (5 and 20 mg/kg, n = 7 and 8; respectively). Animals treated with a combination of drugs obtained 1 mg/kg of prazosin and 5 mg/kg propranolol (n = 8), 1 mg/kg prazosin and 20 mg/kg propranolol (n = 8), 2 mg/kg prazosin together with 5 mg/kg propranolol (n = 8) and 2 mg/kg prazosin and 20 mg/kg propranolol (n = 8). The doses of the drugs were selected on the basis of previous studies by our and other laboratories [11,30,33] and our pilot experiments which determined the threshold doses for prazosin- and propranolol-induced impairments in the AAPA task.

2.3. Apparatus and behavioral procedures

The AAPA apparatus [4,30] consisted of a smooth featureless metallic circular arena (82 cm in diameter) enclosed by a 30 cm high transparent Plexiglas wall; rotating clockwise once per minute. The arena was elevated 1 m above the floor of a 4 m × 5 m room containing an abundance of extra-maze cues. An infrared light-emitting diode was located on the arena circumference to enable computer tracking of the arena rotation. At the beginning of each experimental session, each rat was placed onto the part of the arena directly opposite to the punishment sec-

tor, and then the rotation and tracking were switched on. The rat was equipped with a harness carrying another infrared light-emitting diode (LED) between animal's shoulders. A computer-based tracking system (iTrack; Bio-Signal Group, USA) located in an adjacent room recorded the position of both the rat and the arena every 40 ms. Position-time series were stored for off-line analysis (TrackAnalysis; Bio-Signal Group, USA). The rat was also connected to a cable, which was fastened to the harness and connected by an alligator clip to a needle pierced through the skin on animal's back.

Animals had to avoid an unmarked, 60-deg sector of the arena identified solely by its relationships to distal room cues. The shock sector remained in a stable spatial position throughout the training. Whenever the rat entered the to-be-avoided sector for more than 500 ms, the tracking system delivered a mild, constant-current shock (50 Hz, 0.5 s, 0.4–0.7 mA) and counted an entrance. If the rat did not leave the sector, additional shocks were given every 1200 ms, but no more entrances were counted until the rat left the sector for more than 300 ms. Shocks were delivered through the implanted needle and the arena floor (the highest voltage drop was between rats' paws and grounded floor). We used a compact floor instead of a grid, in order to allow accumulation of intra-maze landmarks (a condition enhancing a conflict between arena and room frames [39]). After each rat, the floor was cleaned with wet towel, ensuring the rats could not use inter-trial scent marks. The current was individualized for each rat to elicit a rapid escape response but to prevent freezing, however, in most cases, animals responded appropriately to 0.4 mA.

2.4. Design of experiments and data analysis

Four subsequent daily sessions of training in the AAPA task were conducted, each lasting 20 min, and carried out between 9:00 and 13:00. Entrances into the shock sector were punished throughout all training. The following parameters were extracted from the off-line processing and analyzed: the *total distance* traveled per session (reflecting only the active locomotor activity of animals) was measured in the coordinate frame of the arena as a sum of linear distances of points recorded every second. Two measures of spatial efficiency were the *number of errors* per session (number of entrances into the to-be-avoided sector) and maximum time between two entrances in a session (*maximum time avoided*), the latter reflecting maximum avoidance time in a given session. Latency to the first entrance in a session (*time to first error*) was used as a retrieval-sensitive measure of between-session learning.

The data, except the time to first error, were analyzed with a three-way ANOVA (prazosin application × propranolol application × sessions) with repeated measures on sessions; prazosin and propranolol applications were independent factors. Time to first error in the final session of training was analyzed by a two-way ANOVA (prazosin application × propranolol application) with no repeated measures. Post hoc analysis was performed using a parametric Tukey's post hoc test. Data presented in the graphs are averaged across sessions (except for the latency to the first error, where average values in the final session are presented) and the means ± S.E.M. are plotted for each parameter. For the sake of clarity, we do not present bar graphs of individual session values but all statistical effects are explained in Section 3. Significance was accepted at a 5% level of probability.

3. Results

3.1. Effects of separate or combined application of drugs on locomotor activity

Visual inspection of rats revealed that most animals exhibited normal overt behavior including locomotion; only animals co-administered with the highest doses of drugs (2 mg/kg of prazosin and 20 mg/kg of propranolol) were hypoactive which was later confirmed by a statistical analysis. Examples of typical trajectories from selected groups are shown in Fig. 1. Note the decreased locomotion and inability to escape efficiently from the shock in animals treated with highest doses of both drugs. This suggests that co-application of highest doses of both drugs impaired procedural aspects of the task.

First, *total distance* walked in a session was analyzed. A three-way ANOVA (prazosin × propranolol × sessions) with repeated measures on the last factor showed a significant main effect of prazosin application ($F(2,62) = 17.0$; $P < 0.05$), propranolol application ($F(2,62) = 11.8$; $P < 0.05$), sessions ($F(3,186) = 3.32$; $P < 0.05$) and an interaction between prazosin and propranolol administration ($F(4,62) = 8.52$; $P < 0.05$). Closer examination of the effect of sessions showed that the total distance walked was slightly increasing with training, probably as a gradual adaptation to the task demands with increased experience. Most importantly, a post hoc analysis of the

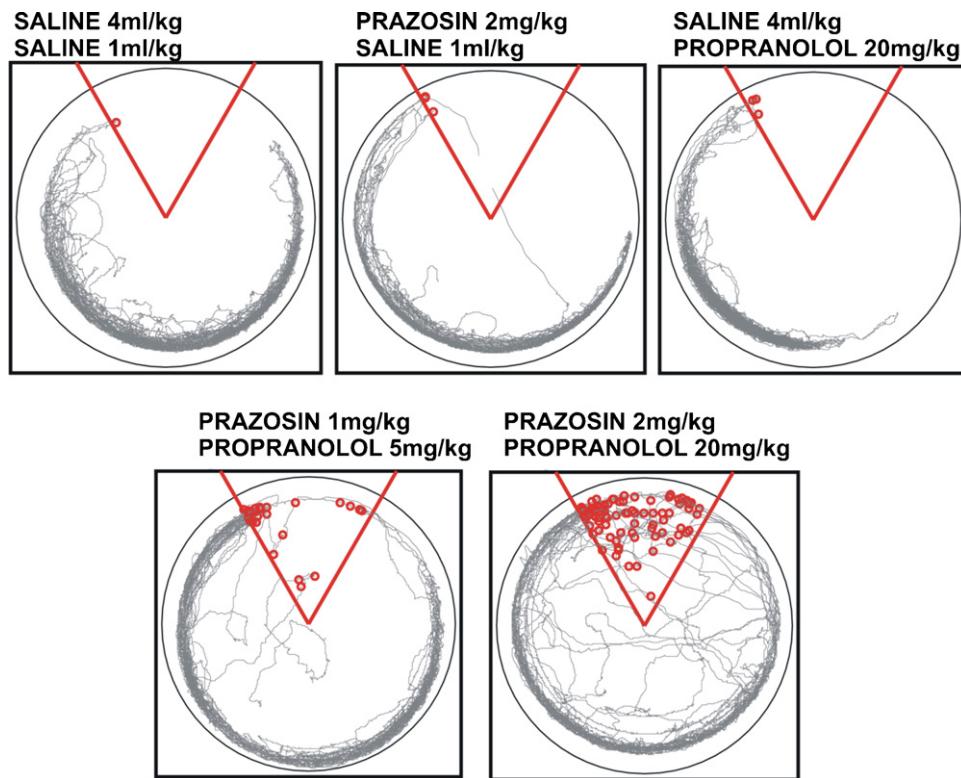


Fig. 1. Examples of illustrative tracks of animals from various groups in the AAPA task. Tracks were collected on the final, fourth day of training. *Top left panel:* Animals from the control group avoided the punished efficiently, as well as animal treated with prazosin only at the dose of 2 mg/kg (*top middle panel*) and a rat treated with propranolol alone at the dose 20 mg/kg (*top right panel*). *Bottom left panel* shows the trajectory of a rat, which obtained lower doses of the drugs, notice that avoidance was disrupted (measure by number of errors), but animal was still able to escape from the shock sector. *Bottom right panel* shows a track of animals co-applied with higher doses of the drugs. The animal committed significantly more errors and sometimes was not capable of escaping from the sector upon punishment, suggesting procedural deficit.

interaction between prazosin and propranolol applications showed that animals treated only with prazosin and propranolol did not differ from the control group. The drugs interacted significantly at their highest doses ($P < 0.05$), i.e. 2 mg/kg of prazosin and 20 mg/kg of propranolol applied together significantly decreasing locomotion (Fig. 2A). This suggests that lower doses of co-administered drugs together failed to disrupt normal locomotor activity.

3.2. Effects of separate and combined applications of drugs on spatial performance

Regarding spatial parameters, we have first analyzed the *number of errors*, which was found to be a relatively sensitive measure of performance in the AAPA task [34]. The results have shown that all doses of drugs significantly interacted in their effects upon this parameter when administered together (Fig. 2B).

A three-way ANOVA found a significant main effect of prazosin application ($F(2,62) = 9.73$; $P < 0.05$), propranolol application ($F(2,62) = 31.34$; $P < 0.05$) and sessions ($F(3,186) = 95.39$; $P < 0.05$). Interactions between prazosin and propranolol applications ($F(4,62) = 4.97$; $P < 0.05$) and between propranolol and sessions ($F(6,186) = 2.76$; $P < 0.05$) were found too. Subsequent parametric testing with Tukey's test showed that propranolol co-applied with prazosin was mainly responsible for the main effect of propranolol application rather than the drug alone. Post hoc analysis of the factor of session showed that all groups improved in this parameter but performance of animals co-applied with both drugs at either dose improved more slowly, suggesting their learning was retarded (*not shown in the figures*).

Post hoc analysis of the interaction between prazosin and propranolol administrations confirmed that both drugs acted synergistically in their influence upon the number of errors ($P < 0.05$).

The test showed that both doses of propranolol co-applied with prazosin 1 mg/kg elicited a worse performance than in animals treated with prazosin 1 mg/kg only. Propranolol at either dose also significantly interacted with a higher dose of prazosin (2 mg/kg) (Fig. 2B).

Subsequently, the *time to first error* was analyzed as a reliable measure of between-session memory [21]. Analyzed and here presented, the values of this parameter measured on the last day of training, are suggested to represent an asymptotic level [32]. A two-way ANOVA (prazosin x propranolol application) showed that it was generally affected by the propranolol application ($F(2,62) = 7.51$; $P < 0.05$) but not by prazosin application ($F(2,62) = 2.51$; $P > 0.05$). No interaction between both factors was found ($F(4,62) = 0.10$; $P > 0.05$). However, propranolol at the dose of 5 mg/kg decreased significantly the time to first error with respect to the control group. Both doses of propranolol were also found to decrease this parameter in combination with a lower dose of prazosin—1 mg/kg ($P < 0.05$; with respect to prazosin alone; see Fig. 2C). Surprisingly, there were no significant interactions (as revealed by Tukey's test) between propranolol and the higher dose of prazosin (see also Fig. 2C), probably due to a trend of impairment by a dose 2 mg/kg of prazosin alone (Fig. 2C).

Finally, another measure of cumulative within-session performance was analyzed, namely *maximum time avoided*. Statistical analysis of this parameter revealed that the combined administration of the drugs more strongly disrupted the performance in this parameter than their separate application (Fig. 2D). A three-way ANOVA revealed a significant main effect of propranolol ($F(2,32) = 3.60$; $P < 0.05$), prazosin ($F(2,62) = 6.86$; $P < 0.05$) and sessions ($F(3,186) = 46.5$; $P < 0.05$). Prazosin x propranolol interaction was found as well ($F(4,62) = 5.74$; $P < 0.05$). Post hoc analysis of the interaction between prazosin and propranolol administrations

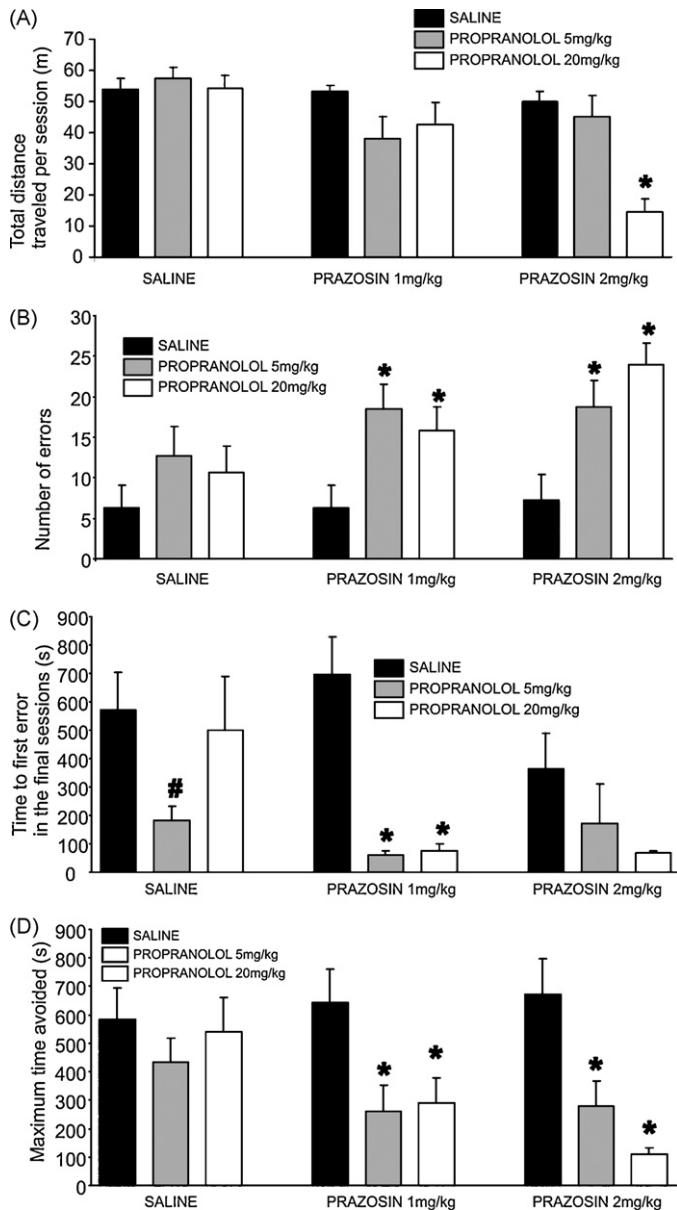


Fig. 2. Panel A: Effects of combined and separate applications of prazosin and propranolol on the locomotor activity in the AAPA task measured by total distance walked (mean \pm S.E.M.). Only co-application of both drugs at their higher doses decreased significantly the total distance, whereas lower doses were without effect; either separately or in combination. Panel B: Effect of administration of propranolol and/or prazosin on the number of errors (i.e. number of entrances into shocks sector) (mean \pm S.E.M.). Both doses of prazosin and propranolol acted synergistically in their effect upon spatial performance reflected by this parameter. Separate application of drugs failed to affect this parameter. Panel C: effect of prazosin and propranolol on the latency to first errors, a measure of between-session memory (mean \pm S.E.M.). Note that propranolol alone affected this parameter at the dose of 5 mg/kg, and both doses of propranolol significantly potentiated the effect of 1 mg/kg of prazosin. Panel D: Effects of both drugs on the maximum time avoided, another spatially selective parameter (mean \pm S.E.M.). Both doses of prazosin and propranolol potentiated effects of each other; separate applications were without effect. * $P < 0.05$ with respect to corresponding dose of prazosin alone; # $P < 0.05$ with respect to control group.

showed that not separate, but the combined administration of drugs mostly contributed to their significant effects. More specifically, we observed the potentiation of the effects of both doses of prazosin by their co-application with either dose of propranolol (Fig. 2D).

4. Discussion

Roles of both alpha1- and beta-adrenergic receptors in animal behavior in general and in learning and memory in particular represent a well-studied topic of behavioral pharmacology. There are numerous studies on this subject, including those done in our laboratory using the AAPA behavioral task [30,33]. In general, our results, showing no effects on cognitive parameters in animals treated with sub-threshold doses of alpha1-adrenoceptor antagonist prazosin, are in accordance with a previous study [24], which showed that lower doses prazosin failed to affect working memory. Our previous study [33] demonstrated a disruptive effect of prazosin at the highest dose studied (4 mg/kg) on locomotion and concurrently avoidance behavior; lower doses (corresponding to those used in the present study) were without effect. Propranolol is a well-studied drug mainly with respect to memory consolidation, but several studies also documented dose-dependent impairment by pre-test injection of the beta-blocker propranolol in various tasks [13,16,30]. It should be emphasized that threshold doses for eliciting impairment of any behavioral measure should be specifically assessed for the particular task. Separate applications of lower doses of the drugs used in the present study failed to affect spatial navigation or locomotion. This finding supports the results of previous studies [24,33], which showed that alpha1-adrenoceptor blockade affects learning to a relatively small extent. On the contrary, propranolol given prior to testing appears to exert a negative influence on learning at certain doses [13,30]. Nonetheless, in the AAPA task, the relatively high, 20 mg/kg dose of propranolol administered separately failed to affect either locomotion or spatial avoidance as shown by the present study and by another one [30], suggesting the AAPA task is less sensitive to this treatment. This study has also showed that lower dose of propranolol (5 mg/kg) decreased the time to first error in the final session when applied alone. Such nonlinear dose-response relationship is not easy to explain given the systemic application used in the present study. The latency to the first entrance might be viewed as a measure of between-session, i.e. long-term memory; therefore, the disruption of long-term memory by pre-test application of propranolol appears to be an interesting phenomenon which deserves further investigations. However, it is very difficult to satisfactorily explain the nonlinearity in this relationship; it might have been potentially ascribed to differential pharmacokinetics of propranolol in various brain structures contributing differentially to regulation of cognition, or variations in receptor occupancies. However, it should be noted that in other measures animals treated with the lower dose of propranolol were not impaired. The close inspection of the effects of low doses of propranolol of sensitive measures of cognitive performance in the active place avoidance task under different experimental protocols (including reversal and retrieval sessions) represents a novel possible way of elaboration of studies of effects of selective pre-test propranolol application.

The main goal of the present study was to investigate the interaction between sub-threshold doses of both drugs. It should be pointed out that despite the abundance of data aimed at the separate application of adrenoceptor antagonists, substantially less work has been devoted to the question how various receptor subtypes interact in the brain, and how they influence each other in mediating behavior. Our previous experiment showed that alpha1-antagonist prazosin and dopamine D2-antagonist sulpiride facilitated the effects of each other, causing severe locomotor and avoidance impairment when applied together [31].

Results of the present study show that centrally active alpha1- and beta-blockers potentiate the effects of each other, but the resulting pattern of impairment is quite different. Generally, we have observed no motor impairment except at the highest doses of both drugs, but there was a consistent deterioration of perfor-

mance in parameters measuring the cognitive function in animals with both drugs co-applied at their lower doses, or after a high dose of propranolol and a lower dose of prazosin, or vice versa.

Our results corroborate the concept, which was developed in older studies pursued in the 1980s, which suggested synergistic effects of alpha- and beta-adrenoceptors on behavioral variables, namely in open-field exploration [19] and aggression [18]. Another study showed that administration of a beta-agonist elicited desensitization of both beta- and alpha₂-adrenoceptors, further suggesting a functional link between adrenergic receptor subtypes [17]. Unfortunately those early studies did not focus on learning (and spatial learning most specifically). Nonetheless it is worth mentioning here that interaction between alpha₁- and beta₂-adrenoceptors receptors was also observed in vitro, suggesting interplay between alpha- and beta-receptors at the level of intracellular signaling cascades (presuming that both receptors are expressed in a single cell) [5].

Explanation of the observed effects on cognitive functions is not straightforward or easy, given the limited relevant literature and systemic application of drugs. The well-established importance of adrenergic stimulation for memory formation [14] and long-term potentiation [1,3,23] in the hippocampus, the structure of particular importance in the AAPA task [4] may offer one possible explanation. The basolateral amygdala is also involved in learning aversive tasks, including AAPA and it has been shown to be crucial for long-term memory formation in the AAPA task [37]. Amygdala-mediated memory is highly dependent on noradrenergic transmission, and can be disrupted with both alpha- and beta-adrenoceptor antagonists (e.g. [7,9,12]). Indeed, it has been observed that alpha₁-adrenergic receptors modulate signalization through beta-receptors, enhancing retention in the inhibitory avoidance task [8]. This interaction might also represent the mechanism responsible for the results reported in this study. Nevertheless, systemically applied drugs must have affected not only the hippocampus and amygdala, but also many other brain areas and body periphery; hence we have started experiments involving micro-injections of receptor antagonists into the hippocampus and/or amygdala and concurrent behavioral screening for memory impairments.

The blockade of both beta- and alpha-adrenergic receptors may have also caused a non-cognitive deficit, such as a decrease in blood pressure, interfering with locomotion. We consider this explanation improbable for several reasons. It was shown that the hypotensive effect of prazosin might be eliminated by administration of propranolol [36], although propranolol has strong hypotensive effects when given alone. Furthermore, motor impairment is not a plausible explanation of our results, since the animals' locomotion was normal except for in co-application of higher doses of drugs, and the spatial deficit was also observed in animals showing intact motor abilities. It should be, however, emphasized that AAPA involves forced rather than spontaneous locomotion (as the animals are required to walk actively in order not to be passively transported into shock sector), which might make the task less sensitive to drug effect on motor activity and it has been demonstrated that lower doses of prazosin and propranolol than used in the present study may affect spontaneous locomotion in the open-field [11].

Altogether, the results of the present study show that systemically administered alpha₁-adrenoceptor antagonist prazosin and beta-blocker propranolol synergistically disrupt spatial learning in the AAPA task with certain selectivity for cognition. Higher dosage also induced a pronounced decrease in locomotor activity in the AAPA task. These data suggest that the above mentioned types of adrenoceptors may interact *in vivo*, not only in the regulation of autonomic responses and basic behaviors, but also in the modulation of spatial learning abilities requiring the hippocampus. Since there are several combined adrenoceptor blockers (antagonizing

both alpha- and beta-adrenoceptors and crossing the blood-brain-barrier) marketed for human use, it might represent an appealing challenge to investigate intimately cognitive functions in patients under these treatments to screen for their potential cognitive side-effects. Further studies using site-specific micro-infusions of receptor antagonists are needed to investigate further the nature of interactions between alpha- and beta-adrenoceptors.

Acknowledgements

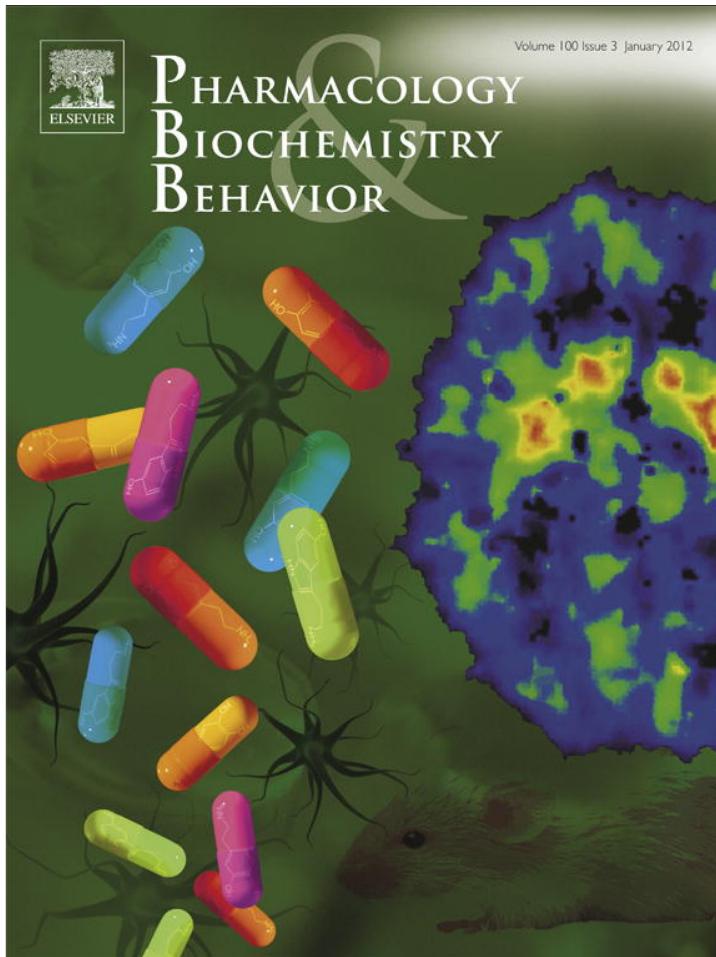
The study was supported by GACR grants 309/07/0341 and 309/09/0286 and by AV0Z50110509. We thank Dr. Jan Bures for his critical comments on the paper and P.M. Luketic for language editing.

References

- [1] Bramham CR, Bacher-Svendsen K, Sarvey JM. LTP in the lateral perforant path is β-adrenergic receptor-dependent. *Neuroreport* 1997;8(3):719–24.
- [2] Cahill L, Pham CA, Setlow B. Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade. *Neurobiol Learn Mem* 2000;74(November (3)):259–66.
- [3] Chaulk PC, Harley CW. Intracerebroventricular norepinephrine potentiation of the perforant path-evoked potential in dentate gyrus of anesthetized and awake rats: a role for both alpha- and beta-adrenoceptor activation. *Brain Res* 1998;787(1):59–70.
- [4] Cimadevilla JM, Wesierska M, Fenton AA, Bures J. Inactivating one hippocampus impairs avoidance of a stable room-defined place during dissociation of arena cues from room cues by rotation of the arena. *PNAS* 2001;98(6):3531–6.
- [5] Copik AJ, Ma C, Kosaka A, Sahdeo S, Trane A, Ho H, et al. Facilitatory interplay in alpha 1a and beta 2 adrenoceptor function reveals a non-Gq signaling mode: implications for diversification of intracellular signal transduction. *Mol Pharmacol* 2009;75(3):713–28.
- [6] Feenstra MG. Dopamine and noradrenaline release in the prefrontal cortex in relation to unconditioned and conditioned stress and reward. *Prog Brain Res* 2000;126:133–63.
- [7] Ferry B, McGaugh JL. Involvement of basolateral amygdala alpha₂-adrenoceptors in modulating consolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 2008;15(4):238–43.
- [8] Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha₁-adrenoceptors. *J Neurosci* 1999;19(12):5119–23.
- [9] Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. Involvement of α₁-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. *Eur J Pharmacol* 1999;372:9–16.
- [10] Forget B, Hamon M, Thiébaut MH. Involvement of alpha₁-adrenoceptors in conditioned place preference supported by nicotine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2009;205(3):503–15.
- [11] Haller J, Makara GB, Pintér I, Gyertyán I, Egyed A. The mechanism of action of alpha 2 adrenoceptor blockers as revealed by effects on open field locomotion and escape reactions in the shuttle-box. *Psychopharmacology (Berl)* 1997;134(2):107–14.
- [12] Hatfield T, McGaugh JL. Norepinephrine infused in the basolateral amygdala posttraining enhances retention in a spatial water maze task. *Neurobiol Learn Mem* 1999;71:232–9.
- [13] Heron C, Gould TJ, Bickford P. Acquisition of a runway motor learning task is impaired by a beta adrenergic antagonist in F344 rats. *Behav Brain Res* 1996;78(2):235–41.
- [14] Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, de Souza TM. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem* 1998;69(3):219–24.
- [15] Kubik S, Fenton AA. Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *J Neurosci* 2005;25(40):9205–12.
- [16] Miranda MA, Ferry B, Ferreira G. Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 2007;88(2):260–3.
- [17] Mogilnicka E, Nielsen M. Repeated treatment with clenbuterol produces desensitization of rat brain beta- and alpha₂-adrenoceptors without changes of alpha₁-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1986;121(1):107–11.
- [18] Mogilnicka E, Zazula M. Interaction between beta-adrenoceptor agonists and alpha 1-adrenergic system. A behavioral study with the clonidine-induced aggression test. *Pol J Pharmacol Pharm* 1986;38(5–6):529–34.
- [19] Mogilnicka E. Are beta- and alpha 2-adrenoceptors co-regulated during their stimulation? Behavioral studies. *Pol J Pharmacol Pharm* 1986;38(5–6):521–8.
- [20] Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Brain Res Rev* 2003;41(2–3):268–87.
- [21] Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 2006;313(5790):1141–4.

- [22] Petrasek T, Stuchlik A. Serotonin-depleted rats are capable of learning in active place avoidance, a spatial task requiring cognitive coordination. *Physiol Res* 2009;58(2):299–303.
- [23] Pussinen R, Sirviö J. Minor role for alpha1-adrenoceptors in the facilitation of induction and early maintenance of long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *J Neurosci Res* 1998;51(3):309–15.
- [24] Puumala T, Sirviö J. Stimulation and blockade of alpha1 adrenoceptors affect behavioural activity, but not spatial working memory assessed by delayed non-matching to position task in rats. *J Psychopharmacol* 1997;11(1):45–51.
- [25] Sara SJ. Noradrenergic modulation of selective attention: its role in memory retrieval. *Ann N Y Acad Sci* 1985;444:178–93.
- [26] Sara SJ. The locus caeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 2009;10(3):211–23.
- [27] Sirvio J, MacDonald E. Central α 1-adrenoceptors: their role in the modulation of attention and memory formation. *Pharmacol Ther* 1999;83:49–65.
- [28] Smythies J. Section III. The norepinephrine system. *Int Rev Neurobiol* 2005;64:173–211.
- [29] Stanford SC. Noradrenaline. In: Webster R, editor. *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function*. John Wiley & Sons Ltd.; 2001. p. 163–85.
- [30] Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. A dose-response study of the effects of pre-test administration of beta-adrenergic receptor antagonist propranolol on the learning of active place avoidance, a spatial cognition task, in rats. *Behav Brain Res* 2009;200(1):144–9. Epub January 15, 2009.
- [31] Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behav Brain Res* 2008;189(1):139–44.
- [32] Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci Lett* 2004;366:162–6.
- [33] Stuchlik A, Vales K. Role of alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the regulation of locomotion and spatial behavior in the active place avoidance task: a dose-response study. *Neurosci Lett* 2008;433:235–40.
- [34] Stuchlik A, Vales K. Baclofen dose-dependently disrupts learning in a place avoidance task requiring cognitive coordination. *Physiol Behav* 2009;97(3–4):507–11. Epub April 1, 2009.
- [35] Svoboda J, Telensky P, Blahna K, Zach P, Bures J, Stuchlik A. Lesion of posterior parietal cortex in rats does not disrupt place avoidance based on either distal or proximal orienting cues. *Neurosci Lett* 2008;445(1):73–7.
- [36] Tabrizchi R, Pang CC. Propranolol antagonizes hypotension induced by alpha-blockers but not by sodium nitroprusside or methacholine. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;67(2):83–7.
- [37] Vafeai AA, Jezek K, Bures J, Fenton AA, Rashidy-Pour A. Post-training reversible inactivation of the rat's basolateral amygdala interferes with hippocampus-dependent place avoidance memory in a time-dependent manner. *Neurobiol Learn Mem* 2007;88(1):87–93. Epub April 3, 2007.
- [38] Wesierska M, Adamska I, Malinowska M. Retrosplenial cortex lesion affected segregation of spatial information in place avoidance task in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 2009;91(1):41–9.
- [39] Wesierska M, Dockery C, Fenton AA. Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J Neurosci* 2005;25(9):2413–9.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



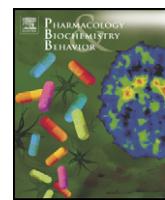
(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Synergistic effects of dopamine D2-like receptor antagonist sulpiride and beta-blocker propranolol on learning in the Carousel maze, a dry-land spatial navigation task[☆]

Iva Prokopova ^a, Stepan Bahnik ^a, Vanessa Doulames ^{a,b}, Karel Vales ^a, Tomas Petrasek ^a, Jan Svoboda ^a, Ales Stuchlik ^{a,*}

^a Institute of Physiology Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

^b Center for Cellular Neurobiology and Neurodegeneration Research, University of Massachusetts Lowell, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2012

Received in revised form 2 April 2012

Accepted 7 April 2012

Available online 14 April 2012

Keywords:

Beta-adrenoceptors

Dopamine D2-like receptors

Learning

Pharmacology

ABSTRACT

Spatial navigation attracts the attention of neuroscientists as an animal analogue of human declarative memory. The Carousel maze is a dry-land navigational paradigm, which proved to be useful in studying neurobiological substrates of learning. The task involves avoidance of a stable sector on a rotating arena and is highly dependent upon the hippocampus. The present study aims at testing hypothesis that sulpiride (a centrally-active dopamine D2-like receptor antagonist) and propranolol (a beta-blocker) impair spatial learning in the Carousel maze after combined systemic administration. These doses were previously shown to be sub-threshold in this task. Results showed that both substances affected behavior and significantly potentiated their negative effects on spatial learning. This suggests central interaction of both types of receptors in influencing acquisition of this dynamic-environment task.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Spatial navigation, a model of declarative memory (O'Keefe and Nadel, 1978), is of immense interest for cognitive neuroscientists. Almost 15 years ago, active allothetic place avoidance task (AAPA) was designed (Bures et al., 1997; Stuchlik et al., 2001), referred here to as the Carousel maze. Rats are trained to avoid a sector that is stable in the coordinate frame of the room on a continuously rotating arena (Stuchlik et al., 2004). The task requires spatial navigation (Bures et al., 1997; Cimadevilla et al., 2001) and cognitive coordination and selection of appropriate behavioral strategy to manage efficient performance (Wesierska et al., 2005; Dockery and Wesierska, 2010). Moreover, inertial cues generated by rotation are necessary for acquisition of the test (Blahna et al., 2011). The Carousel maze performance depends upon the hippocampus, with even unilateral hippocampal inactivation having deleterious effect (Cimadevilla et al., 2001). In recent studies, Carousel maze was used to evaluate the neuropharmacological effects upon behavior (Vales et al., 2006;

Bubenikova-Valesova et al., 2008; Stuchlik et al., 2009; Petrasek et al., 2010). Moreover, consequences of lesions (Svoboda et al., 2008; Wesierska et al., 2009) as well as other experimental manipulations (Wesierska et al., 2006) were tested in this behavioral paradigm.

Noradrenaline plays a role in many brain functions including learning and memory. Most of noradrenergic neurons originate in A1–A7 brainstem nuclei (including the *locus coeruleus*) and innervate areas including those related to cognition (hippocampus, septum and neocortex) (Géranton et al., 2003). Two superfamilies of noradrenergic receptors – named alpha and beta – are distinguished (for review see Smythies, 2005). Adrenoceptors in the brain mediate mainly the central effects of noradrenaline. Regarding memory, beta-adrenoceptors are studied more deeply than alpha-adrenoceptors (Przybylski et al., 1999). Propranolol, a centrally active antagonist of beta-adrenoceptors is mostly used for studying memory consolidation and reconsolidation (Przybylski et al., 1999; Cahill et al., 2000). Dose-dependent effects of propranolol administered before learning in the Carousel maze were shown by our previous study (Stuchlik et al., 2009). It reported a disruption of place avoidance learning, while preserving intact locomotor activity to some extent; however, a high dose (30 mg/kg) caused marked sedation. Adverse effect of this drug was demonstrated in a motor task (Heron et al., 1996), suggesting the effects of propranolol were not restricted to the spatial domain.

Dopaminergic neurons form pathways, generally divided into four systems (nigrostriatal, mesolimbic, mesocortical and tuberoinfundibular). Dopamine in the hippocampus releases from fibers originating in the ventral tegmental area (Berger et al., 1985; Verney et al., 1985), some

[☆] IP wrote the paper, SB pursued statistical analysis and participated in writing, VD acquired and analyzed behavioral data, KV co-designed research, TP participated in experiments and writing, JS pursued the statistical analysis, and AS designed research, wrote the paper and provided scientific leadership. IP, SB and VD contributed to this paper with equal amount of work.

* Corresponding author at: Neurophysiology of Memory, Institute of Physiology ASCR, Videnska 1083, 14220 Prague, Czech Republic. Tel.: +420 241062538; fax: +420 241062488.

E-mail address: stuchlik@biomed.cas.cz (A. Stuchlik).

fibers in the dorsal hippocampus originate in the substantia nigra. Dopaminergic D2-like receptors may mediate the effect of dopamine on mnemonic functions and can be associated with spatial learning and long-term potentiation (LTP) during memory consolidation (Fujishiro et al., 2005). The prefrontal cortex, a brain structure with a vast proportion of dopaminergic fibers and terminals (Verney et al., 1985), is a crucial region for cognitive and attention processes associated with executive functions.

The effect of specific receptor antagonists on spatial learning and navigation belongs to intensively studied topics today (for review see Myhrer, 2003). Notably, it is worth pointing out that both drugs have been extensively prescribed in clinical practice; sulpiride is an atypical antipsychotic drug and propranolol was used for treatment of cardiovascular disorders, despite its limited usage today. The present study aimed at revealing possible interaction between beta-adrenoceptors and D2-like receptors in the regulation of locomotion and learning in the Carousel maze. We administered non-selective beta-receptor antagonist propranolol and D2-like receptor antagonist sulpiride prior to acquisition sessions and hypothesized that co-application of both drugs would impair avoidance at the doses, which had caused minor or no impairments when administered independently in previous studies (Stuchlik et al., 2007a,b, 2009). The study therefore aimed at acute effects of both drugs either applied separately or in combination.

2. Methods

2.1. Animals

Experimental manipulations complied with the Animal Protection Code of Czech Republic and EU directive 86/609/EEC. Sixty-nine naive male Long-Evans rats (12–14 weeks old, 250–300 g), obtained from breeding colony of the Institute of Physiology, were housed in pairs in 30 × 30 × 40-cm translucent cages in an air-conditioned facility with a stable temperature and 12/12 light/dark cycle (lights on at 7.00). Conscious rats were gently implanted with a hypodermic needle, piercing the rat's skin between its shoulders, and creating a small loop on the needle with tweezers. The loop prevented the needle from slipping out and provided purchase for an alligator clip, which was connected a shock-delivering cable, used in behavioral testing. Water and food was freely available.

2.2. Drugs

Propranolol (propranolol HCl; SigmaAldrich, Czech Republic) was dissolved in distilled water at concentrations of 5 and 20 mg/ml and injected intraperitoneally 20 min prior to each session at doses 5 and 20 mg/kg. Saline (1 ml/kg) was injected as a control for propranolol injection. Sulpiride (SigmaAldrich, Czech Republic; 5 and 30 mg/ml) was dissolved in a drop of glacial acetic acid, and diluted into a total volume with a 5% solution of glucose. A control condition to sulpiride injection consisted of a blank solution with all components of the vehicle but without an active substance (sulpiride vehicle). Sulpiride and sulpiride vehicle were injected subcutaneously at volume of 1 ml/kg 40 min prior to each session.

2.3. Design of experiments

The study was designed to assess the effect of combined application sulpiride and propranolol. Effects of drugs were reported for the final two days of the 4-day-acquisition block in the Carousel Maze which represented asymptotic performance. Nine groups were used. Animals were injected with saline (1 ml/kg) + the sulpiride vehicle (1 mg/kg; n = 8; control group), propranolol 5 mg/kg (n = 7) and 20 mg/kg (n = 8) + sulpiride vehicle, or sulpiride (5 mg/kg and 30 mg/kg) + saline (n = 6, 8; respectively). Animals treated with combination of drugs obtained 5 mg/kg of propranolol + 5 mg/kg sulpiride

(n = 8), 5 mg/kg propranolol + 30 mg/kg of sulpiride (n = 8), 20 mg/kg propranolol + 5 mg/kg sulpiride (n = 8) and 20 mg/kg propranolol + 30 mg/kg sulpiride (n = 8). A control group obtained intraperitoneal injection of 1 mg/ml saline 20 min prior to learning sessions and subcutaneous injection of sulpiride vehicle 40 min prior to testing. The doses were selected as subthreshold on the basis of our previous studies (Stuchlik et al., 2007a,b; Stuchlik et al., 2009).

2.4. Behavioral apparatus and experimental procedure

The Carousel maze apparatus (Cimadevilla et al., 2000; Stuchlik and Vales, 2005) consisted of a metallic circular arena (82 cm in diameter) enclosed by a 30-cm transparent Plexiglas wall; constantly rotating clockwise at one revolution per minute. The arena was elevated 1 m above the floor of a room containing many extramaze cues. A light-emitting diode (LED) located on the arena circumference monitored arena rotation, another LED was mounted on a small jacket worn by a rat and signaled its position. At the beginning of each session, a rat was placed onto the rotating arena to a place directly opposite to the to-be-avoided sector. A PC-based tracking system (iTrack; Biosignal Group) in an adjacent room recorded the position of the rat. Data were stored for off-line analysis (TrackAnalysis; Biosignal Group). A 60-deg sector was defined by its relationships to room cues. It remained in a stable spatial position throughout the training. Whenever the rat entered it for more than 500 ms, the tracking system delivered a mild, constant-current shock (AC; 50 Hz, 0.5 s, 0.3–0.7 mA). The current was individualized for each rat to elicit a rapid escape response but to prevent freezing. In most cases, animals responded to 0.4 mA. If a rat did not leave the sector, additional shocks were given every 1200 ms, but no more entrances were counted until the rat left the sector for more than 300 ms. Shocks were delivered through the implanted needle and the arena floor. The procedure has been previously described to be efficient and safe for the rats (Stuchlik et al., 2004; Wesierska et al., 2005; Blahna et al., 2011). After each rat, the arena floor was cleaned with detergent, ensuring the rats could not use inter-trial scent marks.

2.5. Evaluated parameters and statistical analysis

Four daily 20-min sessions in the Carousel maze were conducted between 9.00 and 13.00. Entrances into the sector were punished throughout the training. The following parameters were extracted from the tracks: The **total distance** per session reflected the active locomotor activity of animals (Stuchlik et al., 2004) and was measured by a sum of distances of point sampled every 1 s in the coordinate frame of the arena. Two measures of spatial learning were the **number of errors** (number of entrances into the sector) and maximum time between two entrances (**maximum time avoided**). Latency to the first entrance in a session (**time of first error**) was a measure of between-session learning. Number of errors and time of first error were positively skewed; we used logarithmic transformation to make their distributions closer to normal. Before doing so, we added a constant 1 to these measures to ascertain that the minimum value was not lower than one. Subsequent analyses for these measures were computed using the transformed data. Animals showed stable performance by the third day of the experiment; therefore, we used the last two days for analysis. In order to combine these two days, standard scores were computed for each day and variable. Then, the average of standard scores for the third and fourth day was computed for each measure. Finally, standard scores for these averages were computed to simplify interpretation. All transformations were done prior to data submission into statistical analysis. The procedure was described in detail elsewhere (Quinn and Keough, 2002). Median values of the final session's performance are shown in Table 1. We used the last two sessions for analysis, despite the effect of the drugs could occur from the initial sessions. However, we did not observe such effects (data not shown).

Table 1

The table shows the median values of selected parameters of performance in the final session of testing for all groups. We present medians instead of means due to non-normal distribution of the raw data. Note the decrease of the total distance after co-application of higher doses of propranolol. The values of errors were increased and the values of maximum time avoided decreased after co-application of both doses.

Propranolol	Sulpiride	Distance Day 4	Errors Day 4	Time to first error Day 4	Max. time avoided Day 4
Saline	Vehicle	61.7	2.5	191.4	587.0
5 mg/kg	Vehicle	60.0	3.0	121.2	577.0
20 mg/kg	Vehicle	50.1	2.0	100.9	892.5
Saline	5 mg/kg	59.5	5.0	41.6	449.5
5 mg/kg	5 mg/kg	68.6	20.5	72.7	140.0
20 mg/kg	5 mg/kg	32.5	23.5	71.0	110.5
Saline	30 mg/kg	66.7	3.0	172.5	616.5
5 mg/kg	30 mg/kg	52.0	11.0	76.5	580.0
20 mg/kg	30 mg/kg	41.2	18.0	85.7	162.5

The resultant variables were used for a two-way analysis of variance. Doses of propranolol and sulpiride served as between-subject factors. Since we aimed at a synergistic effect of propranolol and sulpiride, we used Helmert planned contrasts. Helmert contrasts compare each level of a factor with the mean effect of subsequent levels. In our experiment, it means that within each factor the effect of an application of a drug (which is the comparison of saline/vehicle against both doses of a respective drug) and the effect of a dose of a drug (which is the comparison of small and large dose) were tested. The synergistic effect was tested by the effect of interaction between application of propranolol and application of sulpiride. It should be noted that the used measures were correlated and the results of statistical tests are therefore not independent. Maximum time avoided and number of errors correlated highly ($r = -0.92$); all other inter-correlations were in the range of $0.45 < |r| < 0.60$ with the only exception of the correlation between total distance and time to first error ($r = 0.13$). Only correlations with number of errors were negative. Note that for simplicity, we use original parameter labels (such as

total distance, number of error, etc.) throughout Section 3 and in the figure; however, all analyses were done on the variables computed by the method described in this section.

All reported p-values are for two-tailed significance tests. Since one-tailed tests are often used when planned contrasts are applied, significance values reported in the present article are rather conservative. We report as marginally significant the results that would be significant when using one-tailed tests. Effect sizes are reported with use of $r_{\text{effect size}}$, which is a correlation between observed data and regression weights for a given contrast. Positive values indicate that the correlation was in the predicted direction. Squared value of $r_{\text{effect size}}$ can be interpreted as the proportion of variance explained by the contrast (Furr, 2004).

3. Results

Example trajectories of typical rats from selected groups are depicted in Fig. 1. First, we inspected the effects of drugs on locomotion measured by total distance walked in a session. Planned contrasts for total distance showed significant effect of propranolol application, $t(60) = 3.32$, $p = 0.002$, $r_{\text{effect size}} = 0.39$; marginally significant effect of propranolol dose, $t(60) = 1.74$, $p = 0.09$, $r_{\text{effect size}} = 0.19$; and marginally significant effect of sulpiride application, $t(60) = 1.83$, $p = 0.07$, $r_{\text{effect size}} = 0.21$. This means that the application of propranolol decreased total distance traversed by the animals and there was an indication that this effect was dose-dependent. The application of sulpiride had similar effect but there was no indication of dose-dependency of the effect. The effect of the interaction between propranolol and sulpiride application was not significant; however, there was a trend in the predicted direction $t(60) = 1.60$, $p = 0.12$, $r_{\text{effect size}} = 0.17$ (Fig. 2). The statistical analysis did not allow for comparison between control group and propranolol (or sulpiride) alone; however, the significant main effect of the drug could be at least in part attributed to co-application of both drugs (see Petrasek et al., 2010; Stuchlik et al., 2008).

Subsequently, we evaluated the spatial parameters. Planned contrasts for number of errors revealed significant effect of propranolol

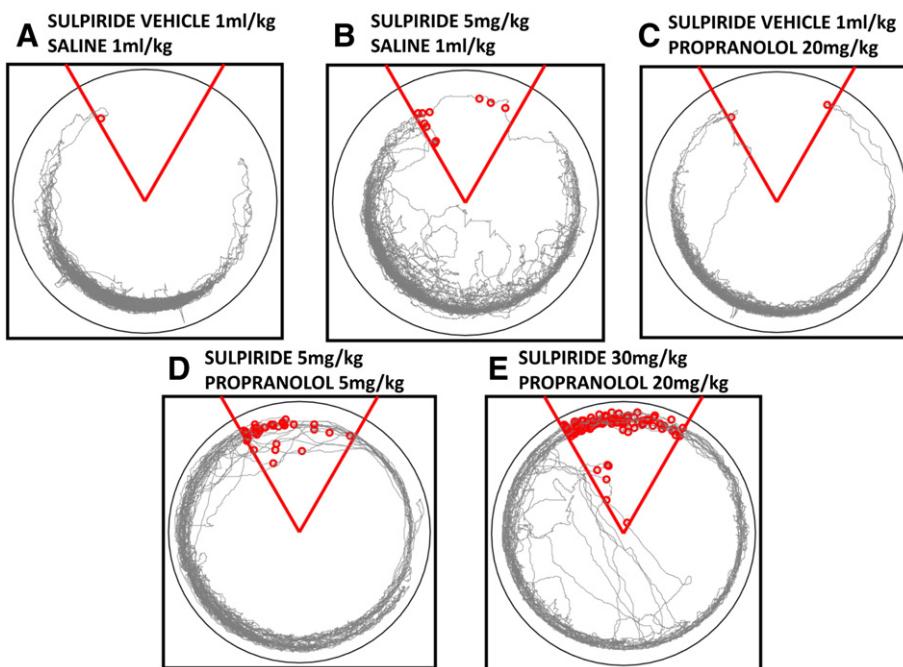


Fig. 1. Representative trajectories of animals from selected experimental groups. **Panel A** shows a control rat (treated only with saline and sulpiride vehicle), which was capable of efficient avoidance. **Panels B and C** show animals treated with sulpiride and propranolol, respectively (plus control vehicle injections); both showing spared avoidance. **Panel D** shows a track of animal treated with 5 mg/kg sulpiride plus 5 mg/kg of propranolol, showing impaired avoidance, but normal locomotion. **Panel E** shows a trajectory of an animal co-applied with higher doses of the above-mentioned drugs, exhibiting severe avoidance and procedural deficit. The trajectories are depicted in grey; small circles denoted places of shocks.

application, $t(60) = 2.80$, $p = 0.007$, $r_{\text{effect size}} = 0.32$; significant effect of sulpiride application, $t(60) = 3.05$, $p = 0.003$, $r_{\text{effect size}} = 0.35$. Both propranolol and sulpiride application increased number of errors in the task; however, the effect of drugs did not seem to be dependent on applied dose. The effect of the interaction between propranolol and sulpiride application was not significant; however, there was a trend in the predicted direction $t(60) = 1.48$, $p = 0.14$, $r_{\text{effect size}} = 0.16$ (Fig. 2).

The evaluation of maximum time avoided showed significant effect of propranolol application, $t(60) = 2.02$, $p = 0.048$, $r_{\text{effect size}} = 0.23$; significant effect of sulpiride application, $t(60) = 2.91$, $p = 0.005$, $r_{\text{effect size}} = 0.34$; significant effect of the interaction between propranolol and sulpiride application, $t(60) = 2.13$, $p = 0.037$, $r_{\text{effect size}} = 0.24$; and marginally significant effect of the interaction between propranolol dose and sulpiride application, $t(60) = 1.72$, $p = 0.09$, $r_{\text{effect size}} = 0.20$. The results therefore showed reduction in maximum time avoided by application of both propranolol and sulpiride and this effect was pronounced by concurrent application of both drugs, proving synergism of their effects (Fig. 2). Again, the main effects of the drug application could be

partially ascribed to co-application of the drugs. Similarly to previous parameters, direct comparison was not accessible using the current statistical design.

Finally, we evaluated between-session learning, provided by the time to first entrance into the to-be-avoided sector. Planned contrasts for time to first error did not reveal any significant effect (Fig. 2). This might be due to relatively lower reliability of this parameter expressed as low correlations between its values in particular daily sessions.

4. Discussion

The present study showed acute effects of administration of propranolol and sulpiride on locomotor activity and spatial learning in the Carousel maze, when both drugs were administered prior to daily testing. More importantly, results demonstrated an interaction between acute systemic administration of dopamine D2 receptor antagonist sulpiride and beta-adrenoceptor antagonist propranolol in influencing spatial learning. Simultaneous application of both drugs

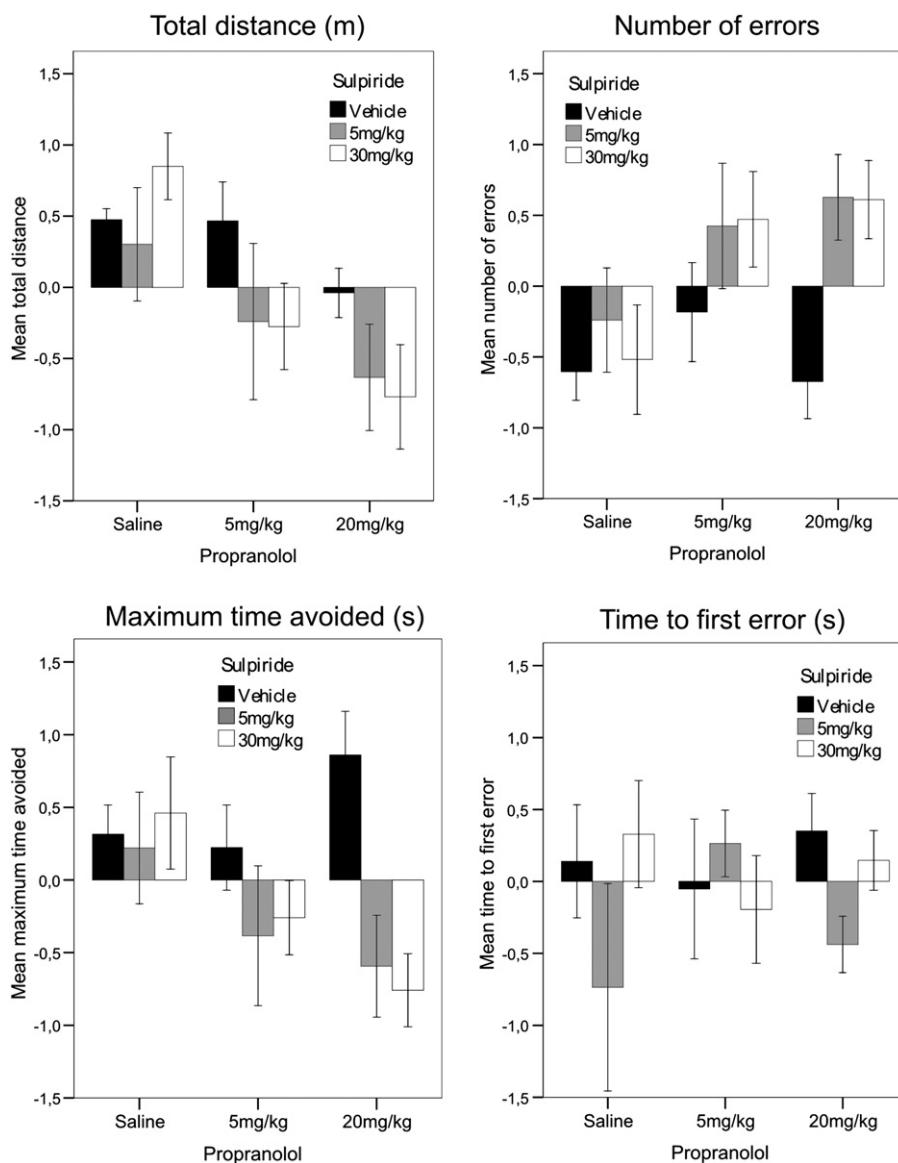


Fig. 2. Graphs show mean (\pm S.E.M.) standardized scores for measures of performance (total distance, number of errors, maximum time avoided and time to first error) in the Carousel maze. The standard scores were computed from the average of standardized data of the last two days of experiment representing asymptotic performance. Data for number of errors and maximum time avoided were logarithmically transformed before the first standardization. The values of means on graphs represent how many standard deviations is the mean of a group above the grand mean. The potentiation of drug effects can be seen as the difference in direction of means for groups with drug co-application and groups without both drugs applied.

resulted in larger decrement in performance than would be expected if the effects of drugs were additive, showing a potentiation of effects of both drugs on the spatial avoidance parameters. While it was significant only for maximum time avoided measure, there was a non-significant trend in the predicted direction for both total distance and number of errors, which further supports confidence of our result.

The observed synergistic effects of sulpiride and propranolol suggest, in general terms, an interaction between dopamine D2-like and beta-adrenergic receptors on the systemic level. Our results add to previous studies aimed at elucidating this interaction using peripheral or intracerebral application of specific receptor antagonists. For instance, Lalumiere et al. (2004) infused sulpiride into the basolateral amygdala (BLA) immediately post-training of inhibitory avoidance task and detected a memory retention impairment. Moreover, beta-adrenergic receptor antagonists co-infused into the BLA together with dopamine blocked the memory enhancing effects of dopamine. These findings indicated that dopaminergic activation within the BLA modulates memory consolidation and that this modulation involves concurrent activation of beta-adrenergic and dopamine influences within this brain region. However, the study also suggested an existence of brain regions where dopamine effects on memory do not require concurrent activation of beta-adrenergic receptors. This might perhaps explain conclusions of the study performed by Williams et al. (1994), in which propranolol injections did not block the amphetamine-induced memory enhancement and the experiment, in which post-training systemic administration of a dopamine-beta-hydroxylase inhibitor diethylthiocarbamate (increasing brain dopamine but decreasing noradrenaline levels) enhanced memory retention (Haycock et al., 1976).

However, when comparing our results to other studies on this topic, one must keep aware of serious constraint represented by difference between pre- and post-training application (aimed at memory encoding and consolidation, respectively). The issue of possible consolidation of the Carousel maze memory trace has not been fully elucidated yet (but see Vafaei et al., 2007); however, our previous study showed that pre-test administration of 10 mg/kg propranolol did not disturb either subsequent performance or latency to first error in the next session (24.5 h later). The latter finding could be interpreted as that consolidation of place avoidance memory did not require beta-adrenoceptors (Stuchlik et al., 2009). The present study shows that both drugs can potentiate their effects on acquisition of spatial learning task when applied before behavioral procedure and together with previous studies suggest that this effect could be ascribed mainly to acute effects of the drugs instead of modulating memory consolidation.

On the other hand, some studies failed to show an acute interaction of dopamine D2-like and beta-noradrenergic receptors. Anisman et al. (1981) reported reduction of haloperidol-induced deficits in escape behavior by alpha-adrenergic receptor blocker; nonetheless, the study failed to show an effect of propranolol. A specific modulation of stress-induced activation of subcortical dopaminergic transmission by noradrenaline input to prefrontal cortex acting at alpha1-receptors was described (Niccioccaill and Gratton, 2007), but again, with no significant effect of beta1/2-adrenoceptor blockade by alprenolol. Moreover, consequences of locally-applied dopamine on noradrenaline in the PFC were reported to be attenuated by local D1-like receptor (SCH23390) but not D2-like receptor blockade (sulpiride). This may suggest that PFC is not the crucial region where interaction observed in the present study occurs.

Recently, we have shown a synergistic interaction between D2-like receptor antagonist sulpiride and alpha1-blocker prazosin, which impaired both locomotor activity and navigation efficiency in the Carousel maze when co-applied (Stuchlik et al., 2008). Disruption of learning in the same task after combined systemic administration of low doses of beta- and alpha-blockers propranolol and prazosin was reported too (Petrasek et al., 2010). Since there is recent evidence for interaction between dopamine and noradrenaline neurotransmitter systems in the

hippocampus (Borgkvist et al., 2011), it is conceivable that *in vivo* synergism between these two systems may exist in the hippocampus locally on the receptor or synaptic level.

Possible non-specific effects of sulpiride and propranolol on behavior or influences on cardiovascular system or perception of shocks may have hypothetically interfered with successful avoidance. Such possibility could not be absolutely excluded with the present study; however, preferential influence upon spatial parameters and escape reactions performed from the sector suggest that this was not the case. A previous study (Stuchlik et al., 2009) revealed that rats treated with doses of propranolol as high as 20 mg/kg exerted normal locomotion in the arena, despite effects of the drug on blood pressure (Singh et al., 1990). Moreover, administration of sulpiride doses up to 100 mg/kg was found not to affect navigation to visible platform in the water maze, suggesting intact procedural functions (Stuchlik et al., 2007b). It should be, however, pointed out that the locomotion in the Carousel maze can be viewed as 'forced' activity instead of spontaneous ambulation such as in the open-field test. Nonetheless, a more detailed investigation of systemic effects of drugs would be highly helpful in elucidation of contribution by central vs. peripheral mechanisms.

5. Conclusions

We found that propranolol (5 and 20 mg/kg) and sulpiride (5 and 30 mg/kg) affected locomotion and acquisition of spatial avoidance behavior in the Carousel maze. Moreover, results of the present study show that in the Carousel maze, an aversive navigational task with high hippocampal demand, systemic co-application of beta-adrenergic and dopamine D2 antagonists, propranolol and sulpiride, respectively, significantly potentiated their adverse effects on spatial performance of the animals. This suggests an interaction between dopamine and noradrenergic systems in encoding a memory trace in a dry-land spatial navigation task.

Acknowledgements

This study was supported by GACR grants P303/10/J032 and P304/12/G069, by IGA MZ CR grant NT/13386 and by institutional support (RVO: 67985823 and AV0Z50110509). We are grateful Jan Bures for scientific inspiration. We thank Michaela Fialova, Jindrich Kalvoda, Antonin Zahalka and Barbara Stuchlikova for their technical assistance.

References

- Anisman H, Ritch M, Sklar LS. Noradrenergic and dopaminergic interactions in escape behavior: analysis of uncontrollable stress effects. *Psychopharmacology* 1981;74:263–8.
- Berger B, Verney C, Alvarez C, Vigny A, Helle KB. New dopaminergic terminal fields in the motor, visual (area 18b) and retrosplenial cortex in the young and adult rat. Immunocytochemical and catecholamine histochemical analyses. *Neuroscience* 1985;15:983–98.
- Blahna K, Svoboda J, Telensky P, Klement D. Inertial stimuli generated by arena rotation are important for acquisition of the active place avoidance task. *Behav Brain Res* 2011;216:207–13.
- Borgkvist A, Malmlöf T, Feltmann K, Lindskog M, Schilström B. Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011;14:1–10.
- Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, Vales K. Risperidone and risatitrobuterol but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:1061–6.
- Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L. Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:343–50.
- Cahill L, Pham CA, Setlow B. Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade. *Neurobiol Learn Mem* 2000;74:259–66.
- Cimadevilla JM, Wesierska M, Fenton AA, Bures J. Inactivating one hippocampus impairs avoidance of a stable room-defined place during dissociation of arena cues from room cues by rotation of the arena. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3531–6.
- Cimadevilla JM, Kaminsky Y, Fenton A, Bures J. Passive and active place avoidance as a tool of spatial memory research in rats. *J Neurosci Methods* 2000;102:155–64.
- Dockery CA, Wesierska MJ. A spatial paradigm, the allothetic place avoidance alternation task, for testing visuospatial working memory and skill learning in rats. *J Neurosci Methods* 2010;191:215–21.

- Fujishiro H, Umegaki H, Suzuki Y, Oohara-Kurotani S, Yamaguchi Y, Iguchi A. Dopamine D2 receptor plays a role in memory function: implications of dopamine-acetylcholine interaction in the ventral hippocampus. *Psychopharmacol* 2005;182:253–61.
- Furr RM. Interpreting effect sizes in contrast analysis. *Understand Stat* 2004;3:1–25.
- Géranton SM, Heal DJ, Stanford SC. Noradrenaline clearance differs in the frontal cortex and hypothalamus: a dual-probe microdialysis study in freely-moving rats. *Neurosci Lett* 2003;350:157–60.
- Haycock JW, van Buskirk R, McGaugh JL. Facilitation of retention performance in mice by posttraining diethyldithiocarbamate. *Pharmacol Biochem Behav* 1976;5:525–8.
- Heron C, Gould TJ, Bickford P. Acquisition of a runway motor learning task is impaired by a beta adrenergic antagonist in F344 rats. *Behav Brain Res* 1996;78:235–41.
- Lalumiere RT, Nguyen LT, McGaugh JL. Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. *Eur J Neurosci* 2004;20:2804–10.
- Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev* 2003;41:268–87.
- Nicnicaii B, Gratton A. Medial prefrontal cortical alpha1 adrenoceptor modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress in Long-Evans rats. *Psychopharmacol* 2007;191:835–42.
- O'Keefe J, Nadel L. Hippocampus as a cognitive map. London: Clarendon Press; 1978.
- Petrasek T, Doulames V, Prokopova I, Vales K, Stuchlik A. Combined administration of alpha1-adrenoceptor antagonist prazosin and beta-blocker propranolol impairs spatial avoidance learning on a dry arena. *Behav Brain Res* 2010;208:402–7.
- Przybylsawski J, Rouillet P, Sara SJ. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* 1999;19:6623–8.
- Quinn GP, Keough MJ. Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press; 2002.
- Singh PP, Junnarkar AY, Varma RK, Thomas GP, Tripathi RM. Effect of various hypotensive agents on locomotor activity and blood pressure of rats. *Mater Med Pol* 1990;22:176–8.
- Smythies J. Section I.I.I. The norepinephrine system. *Int Rev Neurobiol* 2005;64:173–211.
- Stuchlik A, Vales K. Systemic administration of MK-801, a non-competitive NMDA-receptor antagonist, elicits a behavioural deficit of rats in the Active Allothetic Place Avoidance (AAPA) task irrespectively of their intact spatial pretraining. *Behav Brain Res* 2005;159:163–71.
- Stuchlik A, Fenton AA, Bures J. Substratal idiothetic navigation of rats is impaired by removal or devaluation of extramaze and intramaze cues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:3537–42.
- Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci Lett* 2004;366:162–6.
- Stuchlik A, Rehakova L, Rambousek L, Svoboda J, Vales K. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. *Neurosci Res* 2007a;58:133–9.
- Stuchlik A, Rehakova L, Telensky P, Vales K. Morris water maze learning in Long-Evans rats is differentially affected by blockade of D1-like and D2-like dopamine receptors. *Neurosci Lett* 2007b;422:169–74.
- Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. Dopamine D2 receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behav Brain Res* 2008;189:139–44.
- Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. A dose-response study of the effects of pre-test administration of beta-adrenergic receptor antagonist propranolol on the learning of active place avoidance, a spatial cognition task, in rats. *Behav Brain Res* 2009;200:144–9.
- Svoboda J, Telensky P, Blahna K, Zach P, Bures J, Stuchlik A. Lesion of posterior parietal cortex in rats does not disrupt place avoidance based on either distal or proximal orienting cues. *Neurosci Lett* 2008;445:73–7.
- Vafaei AA, Jezek K, Bures J, Fenton AA, Rashidy-Pour A. Post-training reversible inactivation of the rat's basolateral amygdala interferes with hippocampus-dependent place avoidance memory in a time-dependent manner. *Neurobiol Learn Mem* 2007;88:87–93.
- Vales K, Bubenikova-Valesova V, Klement D, Stuchlik A. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neurosci Res* 2006;55:383–8.
- Verney C, Baulac M, Berger B, Alvarez C, Vigny A, Helle KB. Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Science* 1985;14:1039–52.
- Wesierska M, Dockery C, Fenton AA. Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J Neurosci* 2005;25:2413–9.
- Wesierska M, Klinowska HD, Adamska I, Fresko I, Sadowska J, Albrecht J. Cognitive flexibility but not cognitive coordination is affected in rats with toxic liver failure. *Behav Brain Res* 2006;171:70–7.
- Wesierska M, Adamska I, Malinowska M. Retrosplenial cortex lesion affected segregation of spatial information in place avoidance task in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 2009;91:41–9.
- Williams CL, Packard MG, McGaugh JL. Amphetamine facilitation of win-shift radial-arm maze retention: the involvement of peripheral adrenergic and central dopaminergic systems. *Psychobiology* 1994;22:141–8.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbr

Research report

Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: A dose–response study



Veronika Lobellova¹, Marie Entlerova¹, Barbora Svojanovska¹, Hana Hatalova, Iva Prokopova, Tomas Petrasek, Karel Vales, Stepan Kubik, Iveta Fajnerova, Ales Stuchlik*

Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic

HIGHLIGHTS

- Behavioural flexibility is impaired in many schizophrenia patients.
- The study tested flexibility in a rat model of schizophrenia-like behaviours by MK-801.
- MK-801 impaired spatial reversal in an active place avoidance and the Morris water maze.
- The active place avoidance was more sensitive than the Morris water maze.
- Navigation towards visible platform was impaired by the highest dose (0.15 mg kg^{-1}).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2013

Received in revised form 27 February 2013

Accepted 4 March 2013

Available online xxx

Keywords:

Spatial learning
Memory
Flexibility
Reversal
Rat
Dizocilpine
Maze

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic and devastating illness. Exact causes of the disease remain elusive; however, neurodevelopmental changes in the brain glutamate system are recognized to play an important role. Several animal models of the disease are induced by a systemic blockade of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. This study examined the animal model of schizophrenia-like behaviours induced by acute treatment with MK-801, a non-competitive NMDA-receptor antagonist. Behavioural flexibility is an ability to adapt to the changes in environment, and schizophrenia is often accompanied by its decrease. The study tested the effect of MK-801 on behavioural flexibility in an active place avoidance task and the Morris water maze (MWM). Flexibility was tested under reversal conditions, i.e., after changing the location of the target. Each spatial task addressed different functions; continuous coordinate-frame segregation was present in the active place avoidance and precise place representation in the MWM. Results showed that reversal was altered in both tasks by MK-801 at doses of 0.10 – 0.15 mg kg^{-1} . Some impairment was observed in the active place avoidance task at 0.08 mg kg^{-1} . Swimming towards a visible platform was impaired only by the highest dose (0.15 mg kg^{-1}). The results demonstrate that a significant impairment of behavioural flexibility accompanies this acute animal model of schizophrenia-like behaviours, and that active place avoidance had higher sensitivity for such deficits than the MWM. This suggests the usefulness of the reversal paradigm in both tasks for examining novel drugs with antipsychotic and procognitive actions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia is a chronic and devastating neuropsychiatric disease, affecting approximately 1% of the world's population and having serious consequences on the patient's quality of life

including social and working abilities [1]. The exact aetiology of this disease is unknown, yet neurodevelopment-related changes in the glutamatergic system in the brain are suspected to play an important role [2]. Alterations of glutamate system of the brain were documented in schizophrenia patients in both *in vivo* and *post mortem* examinations [3–5] and the importance of the glutamate system was underlined by the finding that the application of non-competitive antagonists of NMDA subtype of glutamate receptors, such as phencyclidine (PCP) or ketamine, caused acute psychosis in humans [6,7].

Animal models of schizophrenia-like behaviours represent experimentally induced analogies of selected symptoms of the

* Corresponding author at: Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 14220 Prague, Czech Republic.

Tel.: +420 24106 2538; fax: +420 24106 2488.

E-mail address: stuchlik@biomed.cas.cz (A. Stuchlik).

¹ These authors contributed equally to this work and share the first-authorship.

disease, and have proven useful in elucidating the mechanisms underlying this disease, its symptoms and designing new ways of treatment in preclinical research [8–11]. Animal models of schizophrenia-like behaviours do not; however, represent the full manifestation of this typically human disorder. It is due to the obvious difficulty in conceptualizing symptoms like hallucinations and delusions in animals. Instead, animal models do mimic observable manifestations of the disease, and scientists rely on observing the behavioural changes following specific experimental manipulations. Animal models are usually evaluated in terms of validities [9,12]. Construct validity reflects the agreement of the real disease and the animal model in terms of pathogenesis and (possible) causes. Face validity emphasizes similarities of the symptomatology; and finally the predictive validity of the model relates to the response to drugs used as therapeutics on human subjects [12]. This study used the animal model of schizophrenia-like behaviour induced by MK-801 (dizocilpine), a non-competitive antagonist of NMDA-subtype of glutamate receptors. This model does not have construct validity, as it is based on the acute effects of a drug and contains no developmental component, especially when applied to adult animals. Yet this model shows a good predictive validity [9,13], and importantly, the model exhibits a substantial face validity since it elicits numerous symptoms resembling symptoms observed in affected human subjects [8,14].

It has been shown that MK-801 produces hyperlocomotion (which was analogized to positive symptoms based on increased activity of mesolimbic dopamine circuits [15]), social flattening (at low doses [16]), and perhaps most importantly a deficit in various cognitive domains [14]. MK-801 has been described to fulfil the criteria of a "cognition impairer", and by carefully titrating the dose, researchers can induce behaviours resembling those present in schizophrenia patients [9,14]. MK-801 has been shown to induce a deficit in acquisition in the Morris water maze, object recognition task, inhibitory avoidance, and other tests of relational and spatial memory including the active place avoidance task [14,17]. At least some deficits resulting from the administration of NMDA antagonists (including MK-801) could be alleviated by pretraining [18]. Nevertheless, a deficit in the re-acquisition of the active place avoidance task induced by MK-801 (0.15 mg kg^{-1}) has been shown to be resistant to previous experience with the task under no influence of the drug [17].

Importantly, deficits in cognitive flexibility [19] and managing of multiple information streams and changed contingencies are documented in many schizophrenia patients [20], who often display general problems in distinguishing relevant information from irrelevant information [12]. Indeed, alterations of cognitive control, behavioural flexibility and adapting to changed conditions were detected in animal models of schizophrenia-like behaviours in various experiments [21–23]. It is known that alterations in the function of the prefrontal cortex may contribute or even play a substantial role in disrupted flexibility observed in schizophrenia and its animal models [24]. This study aimed at testing the hypothesis that MK-801 application would result in a deficit of flexibility in spatial reversal. Moreover, this study employed two established behavioural tests of spatial navigation, the active place avoidance task and Morris water maze, and evaluated their sensitivity to the effects of MK-801 upon changed contingencies in the reversal configuration. Finally, this study sought to determine dose-dependency of these effects in both tasks using five different doses of MK-801 (see Section 2).

2. Methods

2.1. Animals

179 adult male Long-Evans obtained from the breeding colony of the Institute of Physiology, ASCR were used in the study (250–300 g upon delivery).

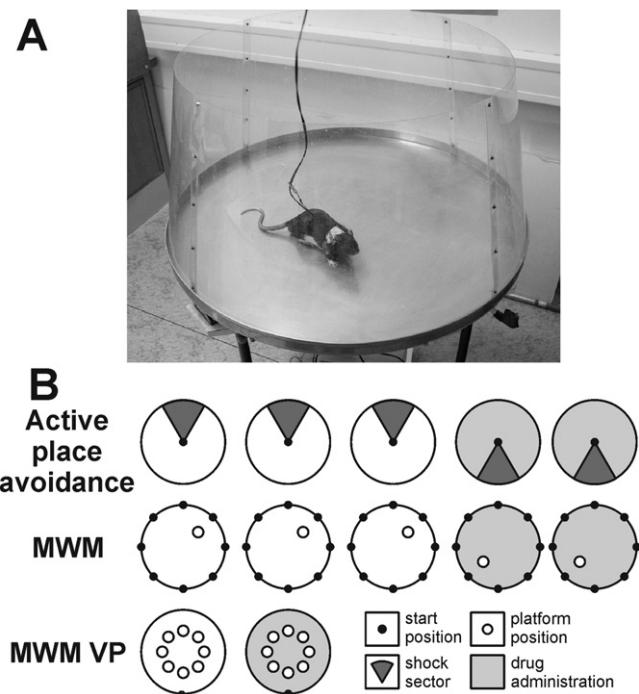


Fig. 1. (Panel A) A photograph of the experimental active place avoidance arena. The arena is elevated 1 m above the floor in a room containing multiple extra-maze landmarks (not shown). It is surrounded by a transparent Plexiglas wall. One light-emitting diode is placed between rats shoulders and another is mounted on arena circumference (bottom right corner of photo). (Panel B) Schematic drawing of experimental design. In the active place avoidance experiment, three acquisition sessions with the to-be-avoided sector in the North (all animals obtained saline) were followed by two reversal sessions with the sector in the South. Saline (control group) or the drug (experimental groups) was administered prior to the reversal sessions. In the hidden platform experiments in the MWM, three sessions with platform located in the NE were followed by two sessions with the platform in the SW after the application of saline or drug. Starting positions varied pseudo-randomly in this experiment and each session consisted of eight swims (not shown). In the visible platform version of the MWM, the start position was always fixed to the South position and the platform position varied pseudo-randomly between swims. The first session was with saline application, the second was preceded by administration of the drug (or saline in the case of controls).

Animals were housed in plastic translucent boxes (25 cm × 25 cm × 40 cm) in an air-conditioned animal room with constant temperature (21 °C), humidity (40%) and 12/12 h light/dark cycle. Water and food were freely available throughout the study. Before experiments in the active place avoidance task, animals were gently implanted with a subcutaneous needle connector, which pierced the skin between rat's shoulders. The needle had a blunted and swirled end, which provided purchase for an alligator clip connecting a shock-delivering wire (see Section 2.3). This procedure is analogous to hypodermic injection in humans and does not require anaesthesia. Separate groups of animals were used for the active place avoidance and the Morris water maze testing (see later). All animal manipulations were conducted in accordance with the Animal Protection Code of the Czech Republic and corresponding directives of the European Community Council (2010/63/EC).

2.2. Drugs

(+)-MK-801 (dizocilpine maleate) was purchased from Sigma-Aldrich, Czech Republic. It was dissolved in saline (0.95% NaCl) at concentrations 0.05 mg ml^{-1} , 0.08 mg ml^{-1} , 0.10 mg ml^{-1} , 0.12 mg ml^{-1} and 0.15 mg ml^{-1} . MK-801 solution was injected intraperitoneally (i.p.) at doses of 0.05 mg kg^{-1} , 0.08 mg kg^{-1} , 0.10 mg kg^{-1} , 0.12 mg kg^{-1} and 0.15 mg kg^{-1} . Control group was administered i.p. with a sterile saline solution at a volume 1 ml kg^{-1} . All animals obtained the same volume in an injection per kg of body weight.

2.3. Apparatuses and behavioural procedures

2.3.1. Active place avoidance

A photograph of the experimental apparatus is shown in Fig. 1A. The active place avoidance apparatus [25–28] was a smooth metallic arena (82 cm in diameter), enclosed with a 30-cm-high transparent Plexiglas wall and elevated 1 m above the floor (Fig. 1A). Extra-maze landmarks (door, posters, and shelves) in the room

were kept in the same positions throughout the study. At the beginning of each session, a rat was placed in the centre of the arena, which rotated constantly at one revolution per minute. An unmarked 60-degree to-be-avoided sector was defined in the coordinate frame of the room in the North of the four arbitrarily defined compass directions (acquisition sessions) and was changed to the South in the final two days (reversal sessions); i.e., there were five daily sessions in total (see later). The rat could rely solely on the distal room-frame landmarks to locate the sector [29]. This sector was defined by the computer-based tracking system (Tracker, Biosignal Group, USA), which recorded the position of the rat (indicated by an infrared light emitting diode that was fastened on a latex harness between rat's shoulders) at a sampling rate of 25 Hz. Another infrared diode, placed on the periphery of the arena, indicated arena rotation. The trajectories were digitized and recorded on a PC, allowing off-line reconstruction and analysis of the animal's trajectory (Track Analysis, Biosignal Group, USA) both in the coordinate frame of the room and in the coordinate frame of the rotating arena.

Whenever a rat entered the sector for more than 300 ms, constant-current regulated electric footshocks (AC, 50 Hz, 200–600 µA) were delivered at 1200-ms intervals up to the moment the rat left the sector. The shocks were administered through the above-described subcutaneous needle connector implanted on the back of the rat standing on the grounded floor. Since the highest voltage drop of the current passing through the rat was at the high-impedance contact between the paws and the metal floor, the rats presumably perceived the shocks in their paws. The appropriate current was individualized for each rat in order to elicit a rapid escape reaction but prevent freezing (fear-related immobility). This aversive procedure has been shown to be efficient and safe in previous studies [25–29]. Since the arena rotated, the rat had to move actively away from the shock in the direction opposite to arena rotation, otherwise it was passively transported into the shock sector. Five daily sessions of active place avoidance testing, separated by 24-h inter-trial intervals, were conducted in the light phase of the day. Each session lasted 20 min. The initial three sessions were designated as acquisition sessions which were followed by two reversal sessions (see below).

2.3.2. Morris water maze

The Morris water maze (MWM [30,31]) consisted of a grey circular pool (180 cm in diameter) filled with water at a temperature of $21 \pm 2^\circ\text{C}$ to a depth of 35 cm. The water was rendered opaque by adding a small amount of non-toxic white paint (Primalex, PPG Deco, Czech Republic). The maze was located in a room providing an abundance of extra-maze cues. Swimming trajectories were monitored by an overhead camera connected to a digital tracking system and data acquisition program (Tracker, Biosignal Group, USA). The maze contained a transparent plastic platform (10 cm in diameter) located in the centre of quadrants that were labelled based on compass directions.

In the visible platform sessions (two daily sessions), the animal underwent 10 swims in 15-min intervals, always being released from the South of the pool. The platform position was chosen pseudo-randomly from eight locations for each swim. The order of platform positions varied between the two sessions.

In the hidden platform testing, the rats were released for eight swims per day, separated by 15-min intervals from the following start positions: S, W, SE, NW, E, SW, NE, N, to ensure a rat was learning spatial location of the platform and not the path itself. These start positions varied pseudo-randomly within every day and this sequence varied for each daily session. The platform was positioned in the centre of NE quadrant in the initial three acquisition sessions of the hidden-platform phase and it was relocated to SW for the subsequent two daily reversal sessions. In total, there were five daily sessions of the hidden-platform testing in the MWM. Probe trials (60-s swims with the platform removed from the pool) were administered after the final acquisition session, and first and second reversal sessions, respectively, to demonstrate the remembered platform position.

2.4. Design of the study, measured parameters and data analysis

The design of the study is shown schematically in Fig. 1B. Saline was applied to all animals (1 ml kg^{-1}) 30 min prior to start of the testing during three initial acquisition sessions in active place avoidance and the MWM. After the third acquisition sessions, animals were assigned randomly to control group and groups with MK-801. The drug (or saline in case of the controls) was applied only in the reversal sessions 30 min prior to the start of active place avoidance testing and 30 min prior to the first swim in the hidden platform version of the MWM. In the visible platform experiment in the MWM, all animals were applied with saline 30 min prior to the initial swim in the first session (10 swims) and with saline or drug 30 min before the first swim in the second session (10 swims). The intervals between injections of MK-801 and probe trials on the reversal days were 140 min.

Separate groups of animals were used for active place avoidance reversal experiment, visible platform version of the MWM and spatial reversal in the MWM. In the active place avoidance testing, a control group ($n = 20$) and groups with five above-mentioned doses were used: 0.05 mg kg^{-1} ($n = 9$), 0.08 mg kg^{-1} ($n = 8$), 0.10 mg kg^{-1} ($n = 8$), 0.12 mg kg^{-1} ($n = 8$) and 0.15 mg kg^{-1} ($n = 8$). In the visible platform experiment in the MWM, all groups had $n = 10$. In the reversal experiment in the MWM, all groups also consisted of 10 rats.

In the active place avoidance task, an offline analysis program (Track Analysis, Biosignal Group, USA) measured and evaluated total distance travelled per session

(measured as a sum of linear distances between points selected every second in the coordinate frame of the arena) which reflected only the active movement excluding passive arena rotation. Spatially selective parameters included the number of entrances into the to-be-avoided sector (number of errors) per session, maximum time without shock (maximum time avoided) and percentage of the total time per session in the target quadrant. The target quadrant in the active place avoidance task was defined as a 60-degree sector of the arena, which corresponded to the to-be-avoided sector and dwelling time in this sector was expressed as relative percentage of the total time (20 min). Procedural performance in the task (efficiency of escape reaction) was measured by total number of shocks (which were repeated upon staying in the sector; see above) divided by the number of errors; this parameter is henceforth referred to as skill learning index. The total distance reflected the locomotor activity (forced by arena rotation and presence of the room-frame-fixed sector), and the number of errors and maximum time avoided served as cumulative measures of within- and between-session improvements. In the MWM, an off-line program (Track Analysis, Biosignal Group, USA) evaluated total distance (m) to find the platform in each swim; this measure corrects for possible changes in swimming speed. In the probe trials, we evaluated the total time spent in the target quadrant, which was defined as a 90-degree sector of the Morris water maze centred at the actual platform position. We used an initial 30-s interval of the probe trial as the most sensitive time period (unpublished observations; note that upon failing to find the platform in the previous position at the beginning, animals often explore other parts of the maze).

Since the animals were randomly divided into treatment groups after the completion of initial three acquisition sessions in both active place avoidance and the MWM, only the reversal sessions in the place avoidance and water maze were analyzed for putative differences between groups. Data from the reversal sessions of the active place avoidance had skewed (non-normal) distribution in all measured parameters; therefore we transformed all the values with a common logarithm. Prior to this transformation, a constant of "1" was added to all values to ensure that the resultant values are not less than zero. The same transformation was applied to the total distance to reach the platform in the MWM, which also had skewed distribution. Data from the active place avoidance were analyzed with a two-way ANOVA (groups \times sessions) with repeated measures on sessions. Groups served as a between subject-factor. Data from the reversal sessions in the MWM were analyzed with a general linear model (three-way ANOVA: groups \times sessions \times swims with repeated measures on sessions and swims). Groups again served as a between-subject factor. Time in the target quadrant in the probe trials were analyzed with a two-way ANOVA (groups \times sessions) with repeated measures on sessions. Data from the probe trials were not logarithmically transformed prior to analysis. Data from the second day of the visible platform test in the MWM were also not transformed and were analyzed with a two-way ANOVA (groups \times swims); repeated measures on swims. Note that only saline was applied on the first day and animals were randomly divided into groups hereafter. A Newman–Keuls post hoc test followed the ANOVA when appropriate. Significance was accepted at $P \leq 0.05$. All statistical calculations were done in Statistica 8 (StatSoft, Czech Republic).

3. Results

Visual observation of the rats did not suggest any signs of severe sensorimotor deficit after application of saline or MK-801 at the above-mentioned doses. Animals treated with MK-801 showed mild hyperactivity in the active place avoidance task, which was confirmed by an analysis of the total distance (see next subsection). In the MWM, rats treated with 0.15 mg kg^{-1} of MK-801 sometimes continued swimming after finding and climbing onto the platform, suggesting an impaired procedural functions; moreover, the highest dose also increased swimming speed in the visible platform test (*data not shown*). Mild ataxia was observed only rarely after the highest dose.

3.1. Reversal learning in the active place avoidance

There was a significant effect of MK-801 on the total distance in active place avoidance (Fig. 2A). A two-way ANOVA (groups \times sessions) revealed a significant main effect of groups ($F(5,55) = 24.93$; $P < 0.001$), sessions ($F(1,55) = 6.85$; $P < 0.05$) but not an interaction between these factors ($F(5,55)$; $P > 0.05$). A Newman–Keuls post hoc test computed on the group factor showed that significant hyperlocomotion was seen after doses 0.08 , 0.10 , 0.12 and 0.15 mg kg^{-1} but not after the dose 0.05 mg kg^{-1} .

Analysis of the numbers of errors showed that it was affected by MK-801 treatment (Fig. 2B). A two-way ANOVA (groups \times sessions) with repeated measures on sessions showed a significant main

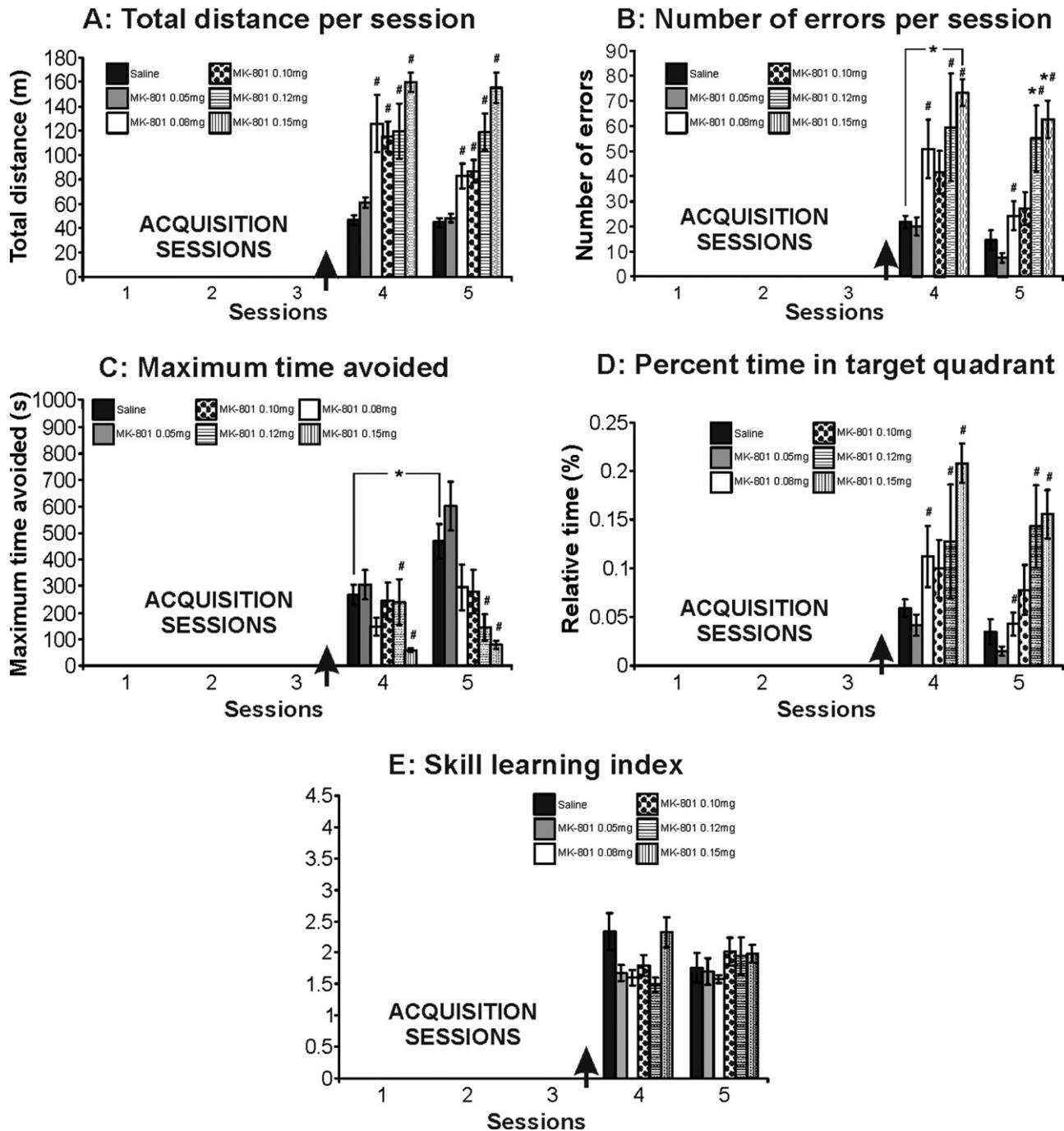


Fig. 2. (Panel A) Effect of MK-801 on the total distance in the active place avoidance task. Note that all doses of MK-801 (except the lowest one 0.05 mg kg^{-1}) increased locomotion. (Panel B) Effect of MK-801 on the number of errors. There was a worsening of this parameter after MK-801 at doses 0.08 mg kg^{-1} , 0.12 mg kg^{-1} and 0.15 mg kg^{-1} . (Panel C) Effect of MK-801 on maximum time avoided. Disruption of this parameter was detected at doses 0.12 mg kg^{-1} and 0.15 mg kg^{-1} . Control groups improved between the two reversal sessions. (Panel D) MK-801 and time in the target sector. Doses 0.08 mg kg^{-1} , 0.12 mg kg^{-1} and 0.15 mg kg^{-1} impaired performance measured by this parameter. (Panel E) Effect of MK-801 on the skill learning index. There was no significant main effect of MK-801 on this parameter. Annotation: $\#P < 0.05$ in the main effects of the drug and $*P < 0.05$ in the interaction term. Arrows denote relocation of the goal and start of MK-801 application.

effect of groups ($F(5,55) = 9.71$; $P < 0.001$), sessions ($F(1,55) = 26.36$; $P < 0.001$) and interaction between both factors ($F(5,55) = 3.21$; $P < 0.05$). A post hoc test performed on the groups factor revealed that groups treated with 0.15 mg kg^{-1} ($P < 0.001$), 0.12 mg kg^{-1} ($P < 0.01$) and 0.08 mg kg^{-1} ($P < 0.05$) of MK-801 differed from controls; groups treated with 0.05 mg kg^{-1} and 0.10 mg kg^{-1} of MK-801 did not differ from controls (both $P > 0.05$). A Newman–Keuls post hoc test of the interaction showed that only groups treated with 0.15 MK-801 differed from controls on the initial reversal day ($P < 0.05$), whilst other groups did not differ, although there was

a trend in at some lower doses too (see Fig. 2B). On the second reversal day, there was a difference between groups treated with 0.12 mg kg^{-1} and 0.15 mg kg^{-1} of MK-801 (both $P < 0.05$). The performance of the control group improved between both reversal sessions ($P < 0.05$).

Analysis of the maximum time avoided showed, again, a difference as a result of the MK-801 application (Fig. 2C). A two-way ANOVA (groups \times sessions) showed a significant main effect of groups ($F(5,55) = 8.72$; $P < 0.001$), sessions ($F(1,55) = 9.63$; $P < 0.01$) but only a trend for an interaction between both factors

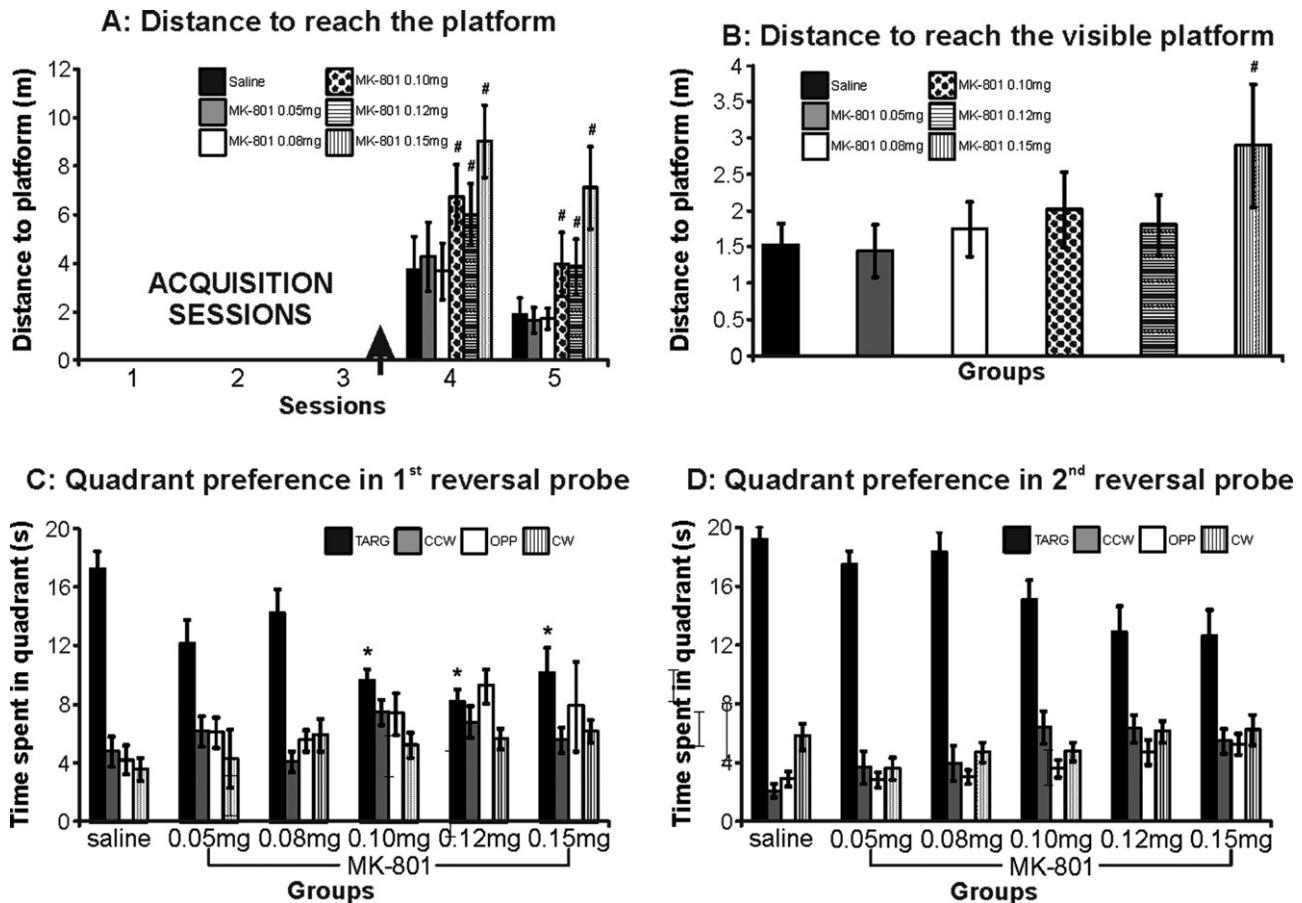


Fig. 3. (Panel A) Effect of MK-801 on the total distance to reach the platform in the reversed hidden platform experiments in the MWM. Doses 0.10–0.15 mg kg⁻¹ impaired reversal learning measured by this parameter. (Panel B) Total distance to reach the visible platform in the second sessions of visible platform testing was only increased by 0.15 mg kg⁻¹ MK-801. Arrows demote relocation of the goal and start of MK-801 application. Annotation: #P<0.05 in the main effect and *P<0.05 in the interaction term. (Panel C) Time in the target quadrant in the second probe trial, conducted after the first reversal session. Preference for the target quadrant is significantly decreased by MK-801 at doses 0.10 mg kg⁻¹, 0.12 mg kg⁻¹ and 0.15 mg kg⁻¹. TARG, target quadrant; OPP, opposite quadrant; CCW, counter-clockwise adjacent quadrant; CW, clockwise adjacent quadrant. (Panel D) Target quadrant preference in the probe trial conducted after the second reversal sessions. All groups again show strong preference for the correct quadrant.

($F(5,55)=2.18$; $P=0.07$). A post hoc test performed on the group factor revealed that application of MK-801 at the doses 0.12 mg kg⁻¹ and 0.15 mg kg⁻¹ impaired performance in this measure ($P<0.05$, 0.01, respectively). Control group improved performance from the first to the second reversal session ($P<0.05$).

Percentage of time in the target quadrant was altered as a result of the application of MK-801 (Fig. 2D). A two-way ANOVA revealed a significant main effect of groups ($F(5,55)=7.27$; $P<0.001$), sessions ($F(1,55)=11.44$; $P<0.005$) but no interaction between these two factors ($F(5,55)=1.69$; $P=0.15$). A Newman–Keuls post hoc test on the factor of groups showed that groups receiving 0.08 mg kg⁻¹ ($P<0.05$), 0.12 mg kg⁻¹ ($P<0.01$) and 0.15 mg kg⁻¹ ($P<0.001$) of MK-801 showed impairment in this parameter. No difference was seen after 0.05 mg kg⁻¹ MK-801 application ($P<0.44$), and a trend for worsening was detected only after 0.10 mg kg⁻¹ of MK-801 ($P=0.08$). It therefore appears that the percentage of time in a target quadrant is a sensitive measure of spatial performance.

The skill learning index, indicative of procedural functions (i.e., an escape reaction from the to-be-avoided sector upon first shock), was affected by MK-801 application in a more complicated fashion than the mere group factor (Fig. 2E). A two-way ANOVA failed to show an effect of groups ($F(5,55)=0.85$; $P>0.05$), sessions ($F(1,55)=0.26$; $P>0.05$), but interestingly, it revealed an interaction between these two factors ($F(5,55)=4.37$; $P<0.01$). This interaction suggested that skill learning index improved over two reversal sessions in some groups, but not others. Analysis of the

interaction showed that this index improved (decreased) between the two reversal sessions in groups treated with saline (control group) and 0.15 mg kg⁻¹ of MK-801, and remained similar in animals treated with 0.05 mg kg⁻¹ and 0.08 mg kg⁻¹ of MK-801, or even increased (worsened) in groups treated with 0.10 mg kg and 0.12 mg kg⁻¹ of MK-801. However, generally, this index was relatively low and barely exceeded the value of 2 (e.g., 2 shocks per 1 error) in the reversal sessions. Moreover, the interaction term was very subtle and none of the interactions was confirmed by a Newman–Keuls post hoc test calculated on the interaction. There were high variances in the skill learning index and this finding should be interpreted cautiously. However, in general there were no robust increases in the skill learning index due to application of MK-801.

3.2. Reversal learning in the Morris water maze

Reversal learning (cognitive flexibility) in the MWM was affected by treatment with MK-801 (Fig. 3A). Regarding the total distance to reach the platform, a general-linear-model three-way ANOVA (groups × sessions × swims) with repeated measures on the last two factors showed significant main effects of groups ($F(5,51)=16.25$; $P<0.0001$), sessions ($F(1,51)=82.00$; $P<0.0001$) and swims ($F(7,357)=25.05$; $P<0.0001$). Moreover, interactions were detected between groups and swims ($F(35,357)=2.27$; $P<0.0005$) and between sessions and swims ($F(7,357)=5.62$;

$P < 0.0001$) but not between groups and sessions ($F(5,510) = 0.53$; $P > 0.05$). There was also a significant triple interaction between groups, sessions and swims ($F(35,357) = 1.47$; $P < 0.05$).

Importantly, a Newman–Keuls post hoc test calculated on the group factor showed that groups treated with 0.05 mg kg^{-1} and 0.08 mg kg^{-1} MK-801 did not significantly differ from the control group, but groups treated with 0.10 mg kg^{-1} , 0.12 mg kg^{-1} and 0.15 mg kg^{-1} of MK-801 differed from control rats. All groups improved in shortening the distance to reach the platform between the two reversal sessions (i.e., absence of an interaction between groups and sessions). A post hoc analysis of the interaction term group \times swims showed that while controls and animals treated with 0.05 mg kg^{-1} , 0.08 mg kg^{-1} , 0.10 mg kg^{-1} and 0.12 mg kg^{-1} improved with each successive swim, no between-swim improvement was seen in the group treated with the highest dose (0.15 mg kg^{-1}). A post hoc analysis of the triple interaction revealed that control rats and the groups treated with 0.05 mg kg^{-1} and 0.08 mg kg^{-1} of MK-801 improved between swims in both of the two consecutive reversal sessions. Groups treated with 0.10 mg kg^{-1} and 0.12 mg kg^{-1} of MK-801 improved only in the second reversal session, and the group treated with the highest dose failed to improve between swims at all.

A two-way ANOVA conducted on the time in the target quadrant (groups \times sessions) involving the first and second reversal sessions showed a significant main effect of groups ($F(5,52) = 12.46$; $P < 0.0001$), an effect of sessions ($F(1,58) = 19.23$; $P < 0.0001$) but no interaction between both factors ($F(5,52) = 0.66$; $P > 0.5$) (Fig. 3C). Post hoc analysis of the factors group showed that groups between 0.10 mg kg^{-1} and 0.15 mg kg^{-1} had lower preference for the target quadrant. In the second reversal session, however, the preferences of all groups were again generally high, tending to return to values obtained prior to treatment (Fig. 3D).

3.3. Visible platform testing in the Morris water maze

All animals adopted a strategy of swimming towards the platform in the first visible platform session, which was manifested as gradually decreasing distances to reach the platform in consecutive swims (*data not shown*). After random assignment to treatment groups, there were differences between them on the second day of the visible platform following application of saline or MK-801 (Fig. 3B). A two-way ANOVA (groups \times swims, groups as an independent factor; repeated measures on swims) showed a significant main effect of groups ($F(5,47) = 8.93$; $P < 0.0001$), swims ($F(9,423) = 5.84$; $P < 0.001$) but no interaction between these factors ($F(45,423) = 0.73$; $P > 0.05$). A Newman–Keuls post hoc analysis of the factor of swims revealed that the total distance in the first swim significantly differed from the remaining swims (all $P < 0.05$), suggesting a within-session improvement. Post hoc analysis of the groups revealed that animals treated with the highest dose had a significantly longer total distance compared to control rats ($P < 0.05$) and also all other treatment groups ($P < 0.05$), suggesting that only highest dose caused significant impairment of navigation to the visible platform.

Moreover, the swimming speed of our rats in the visible platform test in the MWM was increased only in the groups treated with the highest dose of MK-801 (*data not shown*).

4. Discussion

Results of this work showed that the reversal learning of adult male rats in the active place avoidance task and the Morris water maze is sensitive to systemic treatment with MK-801, a non-competitive (open-channel) blocker of NMDA receptors. MK-801 was administered in the same sessions as spatial contingencies

were changed; therefore the present study did not test the effect of the drug on learning (or acquisition) of the tasks. The impairments of reversal performance were consistently evident after doses of $0.12\text{--}0.15 \text{ mg kg}^{-1}$, and some deficits (such as that in percentage of time in a target quadrant or number of errors in the place avoidance task) were seen even at the lower dose of 0.08 mg kg^{-1} . With the present data, it is impossible to explain why a dose 0.08 mg kg^{-1} affected active place avoidance reversal, but such deficit was not seen at the dose 0.10 mg kg^{-1} . MK-801-induced impairments were seen in both tasks. These data extend our knowledge of behavioural deficits in this animal model of schizophrenia-like behaviour in several aspects.

4.1. Active place avoidance with reversal

First, in the active place avoidance task, the doses which caused disruption of spatial reversal performance appear to be lower than those prerequisite to impair acquisition in this task suggesting a preferential sensitivity of the reversal configuration to MK-801 [17,26,32]. For example, our previous study [32] showed a deficit in the active place avoidance acquisition at a dose 0.20 mg kg^{-1} but not 0.10 mg kg^{-1} (a lower dose; however, disrupted acquisition in the MWM). A subsequent study [17] has suggested a dose of 0.15 mg kg^{-1} as a threshold for the impairment of acquisition of the active place avoidance task in Long–Evans rats. However, there have been also observations suggesting the dose 0.10 mg kg^{-1} might impair the acquisition of active place avoidance [10], more specifically, the level of final asymptotic performance.

4.2. Reversal experiment in the MWM

Secondly, in the reversal experiment conducted in the Morris water maze, we consistently observed deficits beginning at the dose 0.10 mg kg^{-1} . Such a finding is in agreement with our previous experiments [32], which showed a deficit in MWM acquisition after the same dose. This suggests that in the MWM, the dose thresholds of MK-801 for disruption of performance in acquisition versus reversal configuration are equivalent. Interestingly, a recent study [14] and an older report [33] suggested that even lower doses (as low as 0.05 mg kg^{-1} or 0.07 mg kg^{-1}) can be efficient in impairing MWM acquisition. This suggests that Long–Evans rats from our breeding colony may have lower sensitivity to MK-801 than other rat lines and this is also corroborated by a previous finding by our research group [26], which showed a lower sensitivity to MK-801 of Long–Evans compared to Wistar rats. Data from probe trial appear to confirm the general view that doses from 0.10 mg kg^{-1} impair memory trace in the MWM in reversal configuration. It is interesting that in the final reversal probe (day 5), all groups again tended to prefer the target quadrant over adjacent and opposite quadrants, despite they were still impaired in reversal testing.

4.3. Possible procedural deficits in the tasks

Furthermore, previous studies (e.g., [18]) also suggested that in the MWM, it is very difficult to separate the navigational deficits induced by NMDA-receptor antagonists from procedural impairments and that such deficits may be eliminated by non-spatial pretraining to the rules of the task. Our present results are not entirely consistent with these data as we show here that only the dose 0.15 mg kg^{-1} impaired the swimming towards a visible platform. However, the present study has involved pretraining the rats to a visible platform procedure with the application of saline (day 1 of the visible platform testing), and this familiarization with procedure might have alleviated the dose sensitivity on performance in the second day, therefore, appears that doses of MK-801 between 0.10 mg kg^{-1} and 0.12 mg kg^{-1} affect primarily navigational rather

than sensorimotor functions, specifically in the MWM in our strain (note that contrarily to the MWM, in active place avoidance, the hyperlocomotion was seen at lower doses; see above).

4.4. Comparison with other studies

The present results clearly demonstrate that MK-801 at relatively low doses affects behavioural flexibility tested by reversal configuration. Such results are consistent with previously published findings obtained in different paradigms and models. The study by Chadman et al. [34] showed that MK-801 administered at similar doses negatively influences reversal learning in juvenile rats (postnatal days 21–30) in a T-maze and found that doses 0.06 mg kg^{-1} and 0.10 mg kg^{-1} selectively impaired reversal in the T-maze. Importantly, this effect was demonstrated to be independent of behavioural sensitization and state-dependent learning [34]. Moreover, the effect of MK-801 on this discrimination reversal learning was found to be mediated by NMDA-receptor blockade in the hippocampus [35], dorsomedial striatum [36] and medial pre-frontal cortex [37] in weaned rats. Based on these findings, it is conceivable that the deficit seen in the present study might have been mediated by a blockade of glutamate receptors in these structures, although, the dose 0.15 mg kg^{-1} could have also induced an overall psychotomimetic state accompanied by overall impairments involving procedural, sensory and motivational functions. Higher doses of MK-801 were required to abolish the reversal learning in an allocentric reversal task in the 8-arm radial maze in an older study by Bischoff and Tiedtke [38]. A study by Beninger et al. [39] showed a deficit in the MWM reversal learning in MK-801-treated rats (however, at much higher dose of 0.50 mg kg^{-1}), and our results confirm this finding. Interestingly, Caramanos and Shapiro [40] demonstrated that MK-801 impaired reversal learning in the radial-arm maze at a broad dose range, but it did not exert an effect upon working memory in female rats (for a limited role of NMDA receptors in working memory; see [26,41]). Additionally, another work [42] detected impairment in acquisition and reversal of a visuospatial task in marmoset monkeys.

4.5. Role of the hyperlocomotion

In the light of present results in active place avoidance, a question might be raised, to what extent the MK-801-induced hyperlocomotion (found in all doses except the lowest one, i.e., 0.05 mg kg^{-1}) contributed to the spatial deficit in active place avoidance reversal. Increases in locomotion are conventionally observed after application of this drug [8,10,15,32,39] but at considerably higher doses compared to the ones used in the present study (see also [26], who found no hyperlocomotion in the place avoidance at 0.10 mg kg^{-1} of MK-801 in Long-Evans strain). We therefore propose, that hyperactivity observed in the present study at relatively low doses of MK-801 could be the result of an increased number of shocks obtained due to the changed spatial contingencies and due to higher cognitive demand (possibly together with a moderate hypoglutamatergia). Such interpretation would be supported by the fact that in the visible platform test in the Morris water maze, an increase in the swimming speed was seen only after the highest dose (i.e., 0.15 mg kg^{-1} ; *data not shown*). Note that hyperactivity found in the MWM after this dose (i) is consistent with the previous results obtained in the arena [17] and (ii) occurred in the task where pre-drug sensory and motor demands and behavioural load after the application of the drug are similar (i.e., first and second sessions of the visible platform test in the MWM, respectively). It should also be pointed out that the highest dose used in this study could also mildly interfere with the shock perception, however this option seems improbable due to

the absence of the main effect of drug application upon the skill learning index (see Section 3).

5. Conclusions

This study provides the evidence for disrupted cognitive flexibility in the active place avoidance task and Morris water maze in an MK-801-induced animal model of schizophrenia-like behaviour. Furthermore, the present data suggest higher sensitivity of active place avoidance task in reversal configuration (being sensitive to 0.08 mg kg^{-1}) than the MWM (being sensitive from the doses 0.10 mg kg^{-1}), which underlines the importance of the task in searching for novel treatments for cognitive deficits in schizophrenia.

Acknowledgements

This study was supported by the IGA MZ CR grant NT13386 and by the Academy of Sciences project M200111204. Institute support (RVO: 67985823) covered salaries and other institutional costs. We thank Kamil Vlcek for critical comments on the manuscript and Peter M. Luketic for language revision.

References

- [1] van Os J, Kapur S. Schizophrenia. Lancet 2009;374:635–45.
- [2] Kantrowitz J, Javitt DC. Glutamatergic transmission in schizophrenia: from basic research to clinical practice. Current Opinion in Psychiatry 2012;25:96–102.
- [3] Kerwin R, Patel S, Meldrum B. Quantitative autoradiographic analysis of glutamate binding sites in the hippocampal formation in normal and schizophrenic brain post mortem. Neuroscience 1990;39:25–32.
- [4] Simpson MD, Slater P, Royston MC, Deakin JF. Regionally selective deficits in uptake sites for glutamate and gamma-aminobutyric acid in the basal ganglia in schizophrenia. Psychiatry Research 1992;42:273–82.
- [5] Egerton A, Stone JM. The glutamate hypothesis of schizophrenia: neuroimaging and drug development. Current Pharmaceutical Biotechnology 2012;13:1500–12.
- [6] Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. Archives of General Psychiatry 1994;51:199–214.
- [7] Newcomer JW, Krystal JH. NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. Hippocampus 2001;11:529–42.
- [8] Nilsson M, Carlsson A, Markinhuhta KR, Sonesson C, Pettersson F, Gullme M, et al. The dopaminergic stabiliser ACR16 counteracts the behavioural priming induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 in mice: implications for cognition. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2004;28:677–85.
- [9] Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, Vales K. Risperidone and ritanterine but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2008;105:1061–6.
- [10] Vales K, Svoboda J, Benkovicova K, Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A. The difference in effect of mGlu2/3 and mGlu5 receptor agonists on cognitive impairment induced by MK-801. European Journal of Pharmacology 2010;639:91–8.
- [11] Jones CA, Watson DJ, Fone KC. Animal models of schizophrenia. British Journal of Pharmacology 2011;164:1162–94.
- [12] Ellenbroek BA, Cools AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. Behavioural Pharmacology 1990;1:469–90.
- [13] Seibt KJ, Pinto AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). Behavioural Brain Research 2011;224:135–9.
- [14] van der Staay FJ, Rutten K, Erb C, Blokland A. Effects of the cognition impairing MK-801 on learning and memory in mice and rats. Behavioural Brain Research 2011;220:215–29.
- [15] Nilsson M, Waters S, Waters N, Carlsson A, Carlsson ML. A behavioural pattern analysis of hypoglutamatergic mice—effects of four different antipsychotic agents. Journal of Neural Transmission 2001;108:1181–96.
- [16] Rung JP, Carlsson A, Rydén Markinhuhta K, Carlsson ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2005;29:827–32.
- [17] Stuchlik A, Vales K. Systemic administration of MK-801, a non-competitive NMDA-receptor antagonist, elicits a behavioural deficit of rats in the active allothetic place avoidance (AAPA) task irrespectively of their intact spatial pretraining. Behavioural Brain Research 2005;159:163–71.

- [18] Saucier D, Hargreaves EL, Boon F, Vanderwolf CH, Cain DP. Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under systemic NMDA or muscarinic antagonism: nonspatial pretraining eliminates spatial learning deficits. *Behavioral Neuroscience* 1996;110:103–16.
- [19] Han K, Young Kim I, Kim JJ. Assessment of cognitive flexibility in real life using virtual reality: a comparison of healthy individuals and schizophrenia patients. *Computers in Biology and Medicine* 2012;42:841–7.
- [20] Phillips WA, Silverstein SM. Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. *Behavioral and Brain Sciences* 2003;26:65–82.
- [21] Morice E, Billard JM, Denis C, Mathieu F, Betancur C, Epelbaum J, et al. Parallel loss of hippocampal LTD and cognitive flexibility in a genetic model of hyperdopaminergia. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:2108–16.
- [22] Broberg BV, Dias R, Glenthøj BY, Olsen CK. Evaluation of a neurodevelopmental model of schizophrenia-early postnatal PCP treatment in attentional set-shifting. *Behavioural Brain Research* 2008;190:160–3.
- [23] Amitai N, Markou A. Disruption of performance in the five-choice serial reaction time task induced by administration of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: relevance to cognitive dysfunction in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 2010;68:5–16.
- [24] Gruber AJ, Calhoun GG, Shusterman I, Schoenbaum G, Roesch MR, O'Donnell P. More is less: a disinhibited prefrontal cortex impairs cognitive flexibility. *Journal of Neuroscience* 2010;30:17102–10.
- [25] Vales K, Stuchlik A. Central muscarinic blockade interferes with retrieval and reacquisition of active allothetic place avoidance despite spatial pretraining. *Behavioural Brain Research* 2005;161:238–44.
- [26] Vales K, Bubenikova-Valesova V, Klement D, Stuchlik A. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neuroscience Research* 2006;55:383–8.
- [27] Blahna K, Svoboda J, Telensky P, Klement D. Inertial stimuli generated by arena rotation are important for acquisition of the active place avoidance task. *Behavioural Brain Research* 2011;216:207–13.
- [28] Prokopova I, Bahnik S, Doulames V, Vales K, Petrasek T, Svoboda J, Stuchlik A. Synergistic effects of dopamine D2-like receptor antagonist sulpiride and beta-blocker propranolol on learning in the Carousel maze, a dry-land spatial navigation task. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2012;102:151–6.
- [29] Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L. Place cells and place navigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:343–50.
- [30] Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 1981;260:239–60.
- [31] Stuchlik A, Rehakova L, Telensky P, Vales K. Morris water maze learning in Long-Evans rats is differentially affected by blockade of D1-like and D2-like dopamine receptors. *Neuroscience Letters* 2007;422:169–74.
- [32] Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neuroscience Letters* 2004;366:162–6.
- [33] McLamb RL, Williams LR, Nanry KP, Wilson WA, Tilson HA. MK-801 impedes the acquisition of a spatial memory task in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1990;37:41–5.
- [34] Chadman KK, Watson DJ, Stanton ME. NMDA receptor antagonism impairs reversal learning in developing rats. *Behavioral Neuroscience* 2006;120:1071–83.
- [35] Watson DJ, Stanton ME. Intrahippocampal administration of an NMDA-receptor antagonist impairs spatial discrimination reversal learning in weanling rats. *Neurobiology of Learning and Memory* 2009;92:89–98.
- [36] Watson DJ, Stanton ME. Spatial discrimination reversal learning in weanling rats is impaired by striatal administration of an NMDA-receptor antagonist. *Learning and Memory* 2009;16:564–72.
- [37] Watson DJ, Stanton ME. Medial prefrontal administration of MK-801 impairs T-maze discrimination reversal learning in weanling rats. *Behavioural Brain Research* 2009;205:57–66.
- [38] Bischoff C, Tiedtke PI. Competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spatial learning tasks. *European Journal of Pharmacology* 1992;213:269–73.
- [39] Beninger RJ, Forsyth JK, Van Adel M, Reynolds JN, Boegman RJ, Jhamandas K. Subchronic MK-801 behavioural deficits in rats: partial reversal by the novel nitrate GT 1061. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2009;91:495–502.
- [40] Caramanos Z, Shapiro ML. Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behavioral Neuroscience* 1994;108:30–43.
- [41] Steele RJ, Morris RG. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus* 1999;9:118–36.
- [42] Harder JA, Aboobaker AA, Hodgetts TC, Ridley RM. Learning impairments induced by glutamate blockade using dizocilpine (MK-801) in monkeys. *British Journal of Pharmacology* 1998;125:1013–8.



Nogo-A downregulation impairs place avoidance in the Carousel maze but not spatial memory in the Morris water maze



Tomas Petrasek ^{a,b,*}, Iva Prokopova ^a, Stepan Bahnik ^a, Kai Schonig ^c, Stefan Berger ^c, Karel Vales ^a, Bjorn Tews ^{d,e}, Martin E. Schwab ^d, Dusan Bartsch ^c, Ales Stuchlik ^a

^a Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 14220 Prague 4, Czech Republic

^b Charles University in Prague, 1, Faculty Of Medicine, Prague, Czech Republic

^c Department of Molecular Biology, Central Institute of Mental Health, J5, 68159 Mannheim, Germany

^d Brain Research Institute, University of Zürich, and Department of Biology, ETH Zürich, Winterthurerstr. 190, 8057 Zürich, Switzerland

^e Division of Molecular Mechanisms of Tumor Invasion, German Cancer Research Center, Im Neuenheimer Feld 581, 69120 Heidelberg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2013

Revised 16 October 2013

Accepted 23 October 2013

Available online 6 November 2013

Keywords:

Nogo-A

Spatial navigation

Cognitive coordination

Spatial mazes

Transgenic rat model

ABSTRACT

Nogo-A protein is an important inhibitor of axonal growth, which also regulates neuronal plasticity in the CNS. Mutations in the gene encoding Nogo-A or abnormalities in Nogo-A expression are linked to neuropsychiatric disorders such as schizophrenia. The present study assesses the impact of constitutively reduced expression of Nogo-A on place navigation in a novel transgenic rat model. Two spatial paradigms were used: (1) A battery of tests in the Carousel maze requiring continuous processing of spatial information with increasing demands for the segregation of reference frames and behavioral flexibility and (2) a delayed-matching-to-place version of the Morris water maze (MWM), which requires place navigation and is sensitive to deficits in one-trial-encoded place representation. The Carousel maze testing revealed a subtle but significant impairment in management of reference frames. Matching-to-place learning in the Morris water maze was unaffected, suggesting an intact representation of an unmarked goal. Our results show that Nogo-A deficiency leads to cognitive deficit in processing of the reference frames. Such a deficit may be the result of neuro-developmental alterations resulting from Nogo-A deficiency.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In pathological conditions involving loss of neurons or axonal damage, the very restricted regenerative plasticity of the adult mammalian CNS severely hinders functional recovery. The search for growth-inhibiting factors has led to the discovery of several classes of such inhibitors, including Nogo proteins. The Nogo-A isoform is widely recognized as a major myelin-associated inhibitor of axon growth and regeneration (for recent reviews, see Akbik, Cafferty, & Strittmatter, 2012; Pernet & Schwab, 2012; Schwab, 2010).

Strong inhibition of axonal growth and regeneration can be alleviated by interfering with the Nogo-A signaling cascade, facilitating re-growth of damaged axons and/or compensatory plasticity in spared CNS structures. Very promising results have been reported after the application of Nogo-A specific antibodies, which led to remarkable functional recovery after spinal cord lesion (Liebscher et al., 2005; Schnell & Schwab, 1990) and stroke (Wiessner et al.,

2003) in rodent models. These results have been already validated in primate models (Fouad, Klusman, & Schwab, 2004; Freund et al., 2009). Human anti-Nogo-A antibody (ATI-355; Novartis) is undergoing clinical testing in human patients with spinal cord injury (<http://ClinicalTrials.gov: NCT00406016>) (Zörner & Schwab, 2010).

Beside oligodendrocyte expression, Nogo-A is also expressed by neurons (Huber, Weinmann, Brösamle, Oertle, & Schwab, 2002; Josephson, Widenfalk, Widmer, Olson, & Spenger, 2001; Wang et al., 2002), regulating cell migration, axon growth and guidance during development (Petrinovic et al., 2010; Schwab & Schnell, 1991; Wang, Chan, Taylor, & Chan, 2008). After birth, neuronal Nogo-A expression usually decreases, except for neurons retaining a high plasticity of their connections, including hippocampal neurons (Huber et al., 2002; Mingorance et al., 2004). Nogo-A in the hippocampus regulates synaptic plasticity (Delekate, Zagrebelsky, Kramer, Schwab, & Korte, 2011; Lee et al., 2008).

Several studies have implicated Nogo signaling pathways in human psychiatric disorders (Willi & Schwab, 2013). On the genomic level, Nogo-A or NgR chromosomal loci were linked to predispositions to the development of schizophrenia or bipolar disorder (Budel et al., 2008; Hsu et al., 2007; Jitoku et al., 2011; Novak,

* Corresponding author. Address: Dpt. Neurophysiology of Memory, Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Videnska 1083, 14220, Prague 4, Czech Republic. Fax: +420 241062488.

E-mail address: disworlds@gmail.com (T. Petrasek).

Kim, Seeman, & Tallerico, 2002; Sinibaldi et al., 2004; Tan, Chong, Wang, Chew-Ping Lim, & Teo, 2005; Voineskos, 2009). Behavioral alterations demonstrated in Nogo-A knockout mice were proposed as endophenotypes of schizophrenia-like behavior (Willi, Aloy, Yee, Feldon, & Schwab, 2009; Willi et al., 2010). Disruption of the Nogo-A regulatory function in synapse development and their plasticity might offer a link between schizophrenia-like phenotypes in Nogo-A knockout mice and human pathology.

The present study explores behavioral effects of reduced Nogo-A protein expression in a transgenic rat model. Rats have been shown to be generally superior to mice as *in vivo* models (Gill, Smith, Wissler, & Kunz, 1989). Furthermore, the knockdown model should be more comparable to human pathological conditions (Willi & Schwab, 2013) and does not exhibit compensatory over-expression of Nogo-B (Tews et al., 2013), reported in some KO mice studies (Simonen et al., 2003). The specific aims are to test the effect of Nogo-A deficiency on spatial avoidance in a battery of tasks in the Carousel maze with increasing demands for segregation of reference frames and flexibility, and one-trial learning in the delayed-matching-to-place version of the Morris water maze. We hypothesized that the Nogo-A knockdown resulting in possible neurodevelopmental alterations in the brain could impair spatial frame segregation in the Carousel Maze more severely than the general spatial navigation and memory in the Morris Water Maze or sensorimotor performance, as would be expected after manipulation affecting hippocampal function, which is generally very sensitive to experimental disruption.

2. Materials and methods

2.1. Generation of the transgenic model

Transgenic rats with down-regulated Nogo-A expression (designated SD-Tg(CAG-RNAi: Nogo-A,EGFP)L2Z1, short L2; standing for line 2) were generated in the Central Institute of Mental Health (CIMH, Mannheim, Germany), in cooperation with M. Schwab from the Swiss Federal Institute of Technology (ETH Zürich). The parental subjects were obtained from Charles River, Germany. The target gene expression was reduced using small interfering RNAs (siRNAs) targeting Nogo-A-specific exon 3 of *Rtn4*. Quantification of processed miRNA and analyses of the endogenous mRNA expression in transgenic and WT animals were determined by qPCR using RNA preparations of various brain regions. Protein concentrations of Nogo-A were measured qualitatively and quantitatively by Western blotting and immunohistochemistry employing epifluorescence and confocal microscopy.

The L2 transgenic line with Sprague Dawley (outbred) genetic background showed about a 50% reduction of Nogo-A protein expression in the CNS. The knockdown was more prominent in neurons as compared to oligodendrocytes, with neuronal levels reduced to 60% of WT in the hippocampus and to 30% of WT in cortex. Preliminary assessment revealed significant increase in long-term potentiation in both the hippocampus and motor cortex. The L2 rats exhibited prominent schizophrenia-like behavioral phenotypes such as perseveration, disrupted prepulse inhibition and strong withdrawal from social interactions. For detailed description of the model on molecular, neurophysiological and behavioral level, see Tews et al. (2013). We have independently checked that the expression of Nogo-A, at both mRNA and protein level, is decreased in the L2 animals used in this study, by means of rtPCR and Western blotting (Petrasek et al., in preparation).

2.2. Animals

Adult male rats (3–4 months old, weighing 450–550 g) either with Nogo-A knockdown (L2) or age-matched but unrelated wild-

type Sprague Dawley controls, were used in this study. First group ($n = 20$) was used for the cognitive experiments, beam walking test was done with another group ($n = 18$).

The rats were housed in groups of two or three in standard transparent animal cages ($30 \times 40 \times 30$ cm), and maintained on a regular 12/12 light/dark cycle in an air-conditioned animal room with a stable temperature of 21 °C and humidity (40%). All experiments were performed during the light phase, between 9 a.m. and 4 p.m. The animals had access to food *ad libitum*, except during the Carousel maze training, when they were maintained on 85% of their normal weight by food restriction with daily weighing and monitoring. Water was always freely available. All animal experimentation complied with the Animal Protection Code of the Czech Republic and international guidelines including EU directives (86/609/EEC and 2010/63/EC). Experiments were approved by local Animal Care Committee of the Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic.

2.3. Behavioral tasks

2.3.1. Carousel maze testing

The apparatus consisted of a smooth circular metallic arena (82 cm in diameter) surrounded by a 30-cm-high transparent Plexiglas wall, located in the middle of a room with abundance of visual cues. The animals had to avoid a directly imperceptible 60-degree to-be-avoided sector, with each entrance (error) punished by mild electric foot-shocks (Blahna, Svoboda, Telensky, & Klement, 2011; Prokopova et al., 2012; Wesierska, Dockery, & Fenton, 2005). The intensity of current was individually adjusted for each rat to provoke escape reaction, but not freezing, ranging between 0.4 and 0.7 mA (50 Hz). The shock lasted 0.5 s, and was repeated after 1.5 s if the animal did not leave the sector. The task demands could be modified by switching lights on and off, rotating the arena and covering the arena surface by shallow water, enabling manipulation with different sources of environmental information coming from the arena and the room, respectively. Beside avoidance, food-deprived animals (see Section 2.2.) were accommodated to explore the arena homogenously by dropping small food pellets (Nesquik, Nestlé, Czech Republic) on the arena floor at regular, 30-s intervals.

The battery of place avoidance variants was a set of behavioral paradigms performed in the Carousel maze, based on concepts from previous experiments (Abdel Baki, Kao, Kelemen, Fenton, & Bergold, 2009; Burghardt, Park, Hen, & Fenton, 2012; Wesierska et al., 2005). The battery aimed at testing continuous place avoidance efficiency under different conditions, probing various aspects of reference frame segregation (Table 1). The main concept was the dissociation of two spatial reference frames, i.e., arena and room frames. In subsequent stages of the experiment, information from either frame could be either present or hidden, or even made relevant or irrelevant for the task solution; the frames could be continuously dissociated by slow arena rotation.

Initially, four pretraining sessions were given to the rats (10 L2 and 10 wildtype), during which the animals were habituated to the arena and trained to collect Nesquik pellets dropped onto its floor. Five stages of avoidance training followed, each stage consisting of three daily 20-min sessions (separated by 24-h intervals). In the first stage, the rats were required to avoid a stable sector on the stable arena in light (Stage 1, (Room/Arena)+ avoidance). This task, which is essentially a passive place avoidance task (Cimadevilla, Kaminsky, Fenton, & Bures, 2000), has relatively low cognitive demands as both the arena and room frames are stable and yield congruent information (Cimadevilla et al., 2000; Wesierska et al., 2005). Subsequently, avoidance training on the rotating arena in darkness with a to-be-avoided sector defined with respect to the rotating arena surface (Stage 2, Arena + avoidance) tested egocen-

Table 1

Stages of the Carousel maze battery and their cognitive demands.

Stage	Foraging	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5
Condition		(Room/Arena)+	Arena+	Room+	(Room)+(Arena)–	(Room)+(Arena)–
Number of daily sessions	4	3	3	3	3	3
To-be-avoided sector	Absent	Present	Present	Present	Present	Present
Arena	Stable	Stable	Rotating	Rotating	Rotating	Rotating
Conflict of reference frames	Absent	Absent	Absent	Minimized	Present	Present
Arena-frame cues	Present	Present, relevant	Present, relevant	Hidden, irrelevant	Present, irrelevant	Present, irrelevant
Room-frame cues	Present	Present, relevant	Hidden, irrelevant	Present, relevant	Present, relevant	Present, relevant
Notes	No avoidance	Passive avoidance	Passive avoidance, darkness	Active avoidance, water	Active avoidance	Active avoidance, sector position changed

tric memory and passive place avoidance with only one reference frame available (i.e., arena frame). It was followed by testing of avoidance of a stable room-frame defined sector on the lighted rotating arena covered with 1-cm layer of water suppressing the intramaze cues (Stage 3, Room + avoidance), which tests active allocentric avoidance with minimized conflict between frames. Note that the arena frame cues were suppressed by shallow water; however, self-motion information still provided input about the arena frame (Stuchlik, Fenton, & Bures, 2001). This stage was followed by testing in similar settings except without water (rotating dry arena with stable to-be-avoided sector and light on), (Stage 4, (Room) + /(Arena)–). This condition requires selecting the room as the relevant coordinate frame and ignoring the arena frame information (which is present but misleading in this configuration). Finally, testing in the (Room) + /(Arena)– version with position of to-be-avoided sector reversed to opposite room side aimed at assessing both frame segregation and behavioral plasticity (Stage 5; Burghardt et al., 2012).

2.3.2. Water maze testing

The Morris water maze experiments were undertaken in a metallic circular tank (180 cm in diameter, 50 cm high) filled with water (20 °C). An escape platform 10 cm in diameter was placed in the pool, submerged 1.5 cm below the water surface. The Delayed-matching-to-place (DMP) task (O'Carroll et al., 2006; Steele & Morris, 1999) is a test of one-trial-acquired place representation, which permits study of spatial working memory and engram persistence after a single learning episode. The test was administered over daily sessions consisting of four swims (trials) to a hidden platform with variable delays (15 s, 20 and 120 min) between first and second trial (inter-trial interval, ITI). ITIs between trials 2 and 3 and between trials 3 and 4 were kept at 15 s only to maintain win-stay intra-session strategy. Platform position was changed daily in a pseudorandom order. Being essentially a one-trial learning test, the DMP presumes minimal interference between particular sessions (Steele & Morris, 1999); therefore, there were eight daily sessions with unique platform location. ITIs and release positions were pseudo-randomized by partial Latin square method. Testing in the DMP version of the MWM was done after the Carousel maze battery, on the same group of subjects.

2.3.3. Beam walking

The beam walking test is a commonly used test of motor coordination (Goldstein, 1993) and is critically dependent on intact function of the sensorimotor areas. The test used a 2-m-long wooden beam stretched between blinded end and a homecage. Animals initially explored the beam during habituation trials on the 5-cm-wide beam (four habituation trials, animal starting first from $\frac{1}{4}$, once from $\frac{1}{2}$ and two times from the blinded end; i.e., whole beam had to be traversed in the last case) but soon learned to traverse the beam from the blinded end to the homecage. Two

habituation trials (one run from the $\frac{1}{2}$ of the length and one from the blinded end) were repeated on the 1.5 cm-wide beam (narrow beam). Footslips and falls were recorded manually during both habituation periods (wide and narrow beam). Test trials on the narrow beam were conducted immediately after the habituation, and consisted of four testing runs, in which animals were released from the blinded end; latency to reach the homecage, number of falls, and number of footslips were visually recorded by two experimenters, each viewing the animal from an opposite side. Beam walking test in this study was performed with different groups of rats (9 wildtype and 9 L2 rats) than the Carousel maze and DMP experiments. The animals were of the same age and origin.

2.4. Measured parameters and statistical design

2.4.1. Carousel maze

In Carousel maze stages, several measures of performance were assessed. **Total distance** measured overall path walked by a subject during a session and was measured as a sum of linear distances of points selected every 1 s (passive motion introduced by the rotation of the arena in some stages was subtracted by the tracking software). **Number of errors** measured the number of entrances into the to-be-avoided sector during a session. **Maximum time avoided** was defined as the maximal continuous duration without an entry into the sector. Finally, **latency to the first error** measured the time from the beginning of a session to the first entrance into the to-be-avoided sector.

Since distributions of total distance, number of errors and latency to first error were positively skewed, we used logarithmic transformation to reduce the skew. It was possible to avoid the sector during the whole session without an entrance; therefore, we added a constant 1 to number of errors before the transformation. Several data points were missing (about 1.8% of all) due to procedural and technical errors. In order to avoid difficulties caused by these missing data, we averaged data across three sessions for every stage of the Carousel maze. Before doing so, we standardized data for each measure and session to ensure comparability of performance between different sessions of a particular stage. Then, data for all days had the same mean and variance and it was possible to compute average of every measure for each subject and stage. Without the standardization an animal with a missing data point from the first session of the given stage, where performance is generally worse, would seem to have better performance than animals without a missing data point (similar reasoning can be applied for missing data points from the last session of the stage). We averaged only second and third days from each stage for latency to first error, since the animals could not know the position of the sector during the first session of a stage, which made the latency of the first error in the first session essentially random. Next, we standardized resultant measures again to ascertain comparability between stages. This allowed us to analyze differences between

groups across all stages as well as development of differences between groups during consecutive stages. As a result of the aforementioned data transformations, we obtained four measures of performance for five different stages for every subject. Henceforth, we use these transformed measures for statistical analysis. For simplicity, we report the original parameter names in both transformed and raw data. Both raw and transformed data are shown in the figures.

The mixed-design analysis of variance (ANOVA) was conducted for each measure. Group (L2 vs. wildtype) served as a between-subject factor and stage (five stages of Carousel maze ordered according to their succession) as a within-subject factor. The stages were ordered according to their cognitive demands, therefore, we used polynomial contrasts for the stage factor. Third and fourth order polynomials are not readily interpretable, therefore, we report only linear and quadratic contrasts. Since the mean for every stage was zero (in every measure) due to the standardizations, stage was included as a factor only to assess interaction of stage and group factors. Furthermore, for the same reason and because both groups contained the same number of animals, means for both groups had the same value and opposite sign. Therefore, only one of the means is always reported. While group effect can be interpreted as a general difference between groups across all stages, interactions between group and stage factors may suggest variation of group differences between stages.

Previous research found increased perseveration in Nogo-A knockdown rats. Perseveration could have occurred during Stage 5, when the position of the punished sector changed from the previous stage. Therefore, we attempted to test for perseverative behavior during Stage 5 by comparing the time spent in the former to-be-avoided sector (directly opposite to the new to-be-avoided sector) with time spent in “neutral” sectors, which had never been punished. This measure was computed in a similar way as the other measures (i.e. it was standardized for every day, averaged for each animal, and standardized again). Since this measure was computed only for one stage, we obtained one value for each animal. The resultant measure was compared between groups with a Student's *t*-test.

2.4.2. Morris water maze

Performance on the DMP task in the MWM was measured by escape latency and total distance to reach the platform. Both measures can be used for single trials (1–4) and for the calculation of savings between trials. Second trial performance and savings between first and second trial were used as an indicator of one-trial learning. The performance during the first two daily sessions was worse than during remaining days and therefore the data for the first two days (serving essentially for learning the rule) were not included in subsequent analysis. Rats showed good performance at trials 2–4 since the third daily session. Performance measures were averaged for every ITI for each subject. Measures for single trials were logarithmically transformed before averaging in order to reduce positive skew. The averaged measures were used for subsequent computations. Average speed of L2 and control group for the first trial differed; means (M) = 19.8 cm/s and 23.5 cm/s for L2 and control group respectively; $t(18) = 2.99$, $p = 0.008$, however, there was no difference in average speed for trials 2–4; $t(18) < 0.79$, $p > 0.49$. Due to the difference in average speed between groups for the first trial and generally small correlations between measures of performance for different trials in the same day, we used only the performance in second trial as an indicator of one-trial learning. Therefore, we conducted mixed-design ANOVA with average *log*-transformed total distance in the second trial as a dependent variable, group (L2 vs. control) as a between-subject factor and delay as a within-subject factor. We used polynomial contrasts for the delay factor.

Apart from analyzing performance, we assessed the proportion of time spent in the 45-deg sector containing the platform during previous day. This measure was used as a measure of perseveration and was computed only for the first trial and averaged across all ITIs. The groups were compared with a Student's *t*-test.

2.4.3. Beam walking

Since latencies to reach the homecage for four trials were positively skewed, we used a logarithmic transformation. We then standardized the transformed measures for each trial and computed mean for every animal across the four trials. We thus obtained one measure assessing latency to reach the homecage for each rat. We standardized the resultant measure for the ease of interpretation. The difference in latency to reach the home-cage for the two groups was compared by a Student's *t*-test. To compare the number of slips and number of falls between the two groups, we summed all slips and falls respectively for each animal across trials. If an animal fell, the number of slips in a given trial was computed as a maximum number of slips obtained by the worst animal (3) plus one, which added to four. The resultant measures were compared with a Mann–Whitney *U*-test.

3. Results

3.1. Carousel maze

Visual inspection of the animals showed no signs of excessive discomfort during the Carousel maze testing. During the habituation phase (d1–d4; see Table 1) rats quickly adopted foraging for Nesquik pellets and after the introduction of the to-be-avoided sector they generally responded to electric foot-shocks with rapid escape reactions. During testing in passive variants of the Carousel maze (the to-be-avoided sector stable relative to the arena floor), the rats performed generally well. However, when a shallow layer of water was added to the arena in Stage 3, some animals from both groups were agitated and exhibited higher locomotion and decreased avoidance. During progressive training in the active versions of Carousel maze, they decreased the number of errors.

Results for total distance (Fig. 1a) showed that L2 rats walked slightly more ($M = 0.26$) than control rats, however, the difference was not significant, $F(1,18) = 2.00$, $p = 0.17$, $\eta^2 = 0.10$. The interactions of stage contrasts and group factor were not significant, $F_{(1,18)} < 1.42$, $p > 0.25$. Results for maximum time avoided (Fig. 1c) showed a significant effect of group, $M_{L2} = -0.29$, $F(1,18) = 5.43$, $p = 0.03$, $\eta^2 = 0.23$. This result reveals general impairment of ability of shock avoidance in L2 rats. While a graphics review indicated a linear increase in difference between groups toward the more demanding stages with L2 rats performing worse during late stages but not during early stages, the interaction of group and linear contrast for stage was not significant $F(1,18) = 1.54$, $p = 0.23$, partial $\eta^2 = 0.08$. Neither was the interaction of group and quadratic contrast for stage, $F(1,18) < 1$. Therefore, statistical analysis did not show differential impairment across stages, even though it was indicated by pattern of group means. Maximum time avoided and number of errors (Fig. 1b) were highly correlated (median correlation for the same stage was -0.86) and therefore it was not surprising that the results of the ANOVA for number of errors were similar. Effect of group on number of errors was marginally significant, $M_{L2} = 0.25$, $F(1,18) = 3.81$, $p = 0.07$, $\eta^2 = 0.17$. Graphics review again suggested a linearly increasing trend for the differences. Again the interaction of group and linear contrast for stage was not significant, $F(1,18) = 2.06$, $p = 0.17$, partial $\eta^2 = 0.10$. The interaction of group and quadratic contrast for stage was also not significant, $F(1,18) < 1$. Finally, an ANOVA for latency to first error (Fig. 1d)

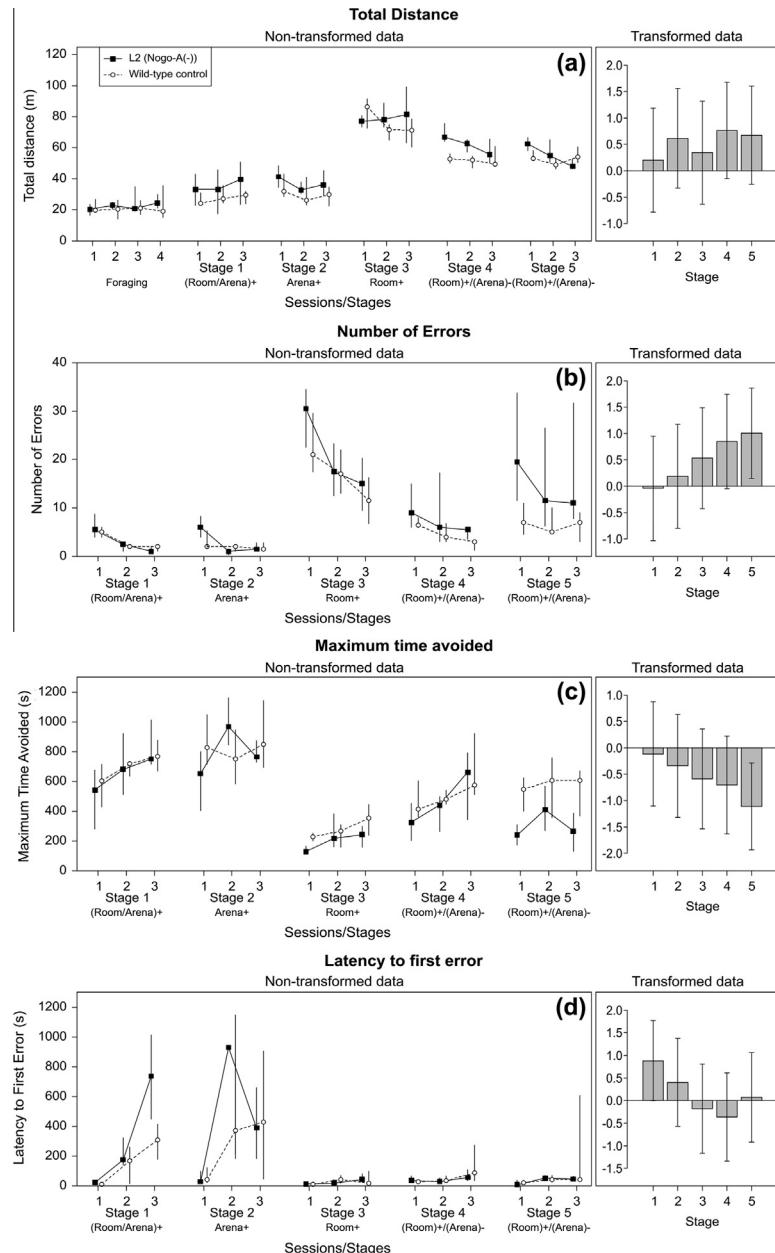


Fig. 1. Carousel maze results. Panels on the left represent daily median values and ends of lines represent first and third quartiles of raw non-transformed data. Note that the quartile values depicted are computed from single sessions. Panels on the right show results for subsequent stages of the task (each stage included three sessions). The plot shows differences in group means ($M_{L2} - M_{\text{Wild-type}}$) and 95% confidence intervals for the differences, all for transformed parameters. Confidence intervals are not adjusted to show between-stage difference in differences of means, therefore, statistical significance only for a difference between groups in a single stage can be properly inferred from confidence intervals (confidence interval, that does not include zero, is equivalent to significant t -test for differences between group means for the given stage with $\alpha = 0.05$). Note that ends of ordinate differ between panels (a–d). Total $n = 20$ (10 L2 and 10 control animals). (a) Total distance walked. In Stages 3–5, locomotion increased because of the need to actively avoid the to-be-avoided sector. During Stage 3, the presence of water probably disturbed the animals, leading to higher locomotion. Note the mildly increased locomotor activity apparent in the L2 group during most sessions. (b) Number of errors (entrances into the sector). In stages 1 and 2 (passive place avoidance), the number of errors was rather low. In Stage 3, when active avoidance became necessary, the number of errors sharply increased. Stage 4 introduced the conflict of reference frames, but the sector position remained the same as learned during the Stage 3, thus no increase in number of errors is seen. In Stage 5, the sector position was changed, resulting in a deterioration of performance. L2 animals made marginally significantly more errors ($p = 0.07$) and there was a trend for the aggravation of this deficit towards the last, and presumably most difficult, stages. The trend was, however, not significant, $p = 0.17$. (c) Maximum time avoided. The results generally mirror the Number of Errors, with a drop in performance in Stage 3. In stages 3–5, an immobile rat would enter the to-be-avoided sectors every 60 s, but animals in both groups quickly learned to achieve much longer periods of avoidance. In Stage 3, arena-frame cues (scent marks, feces) were suppressed by shallow water, but a conflict between the relevant room-frame cues and idiothetic information was already present. Removal of water from the arena in Stage 4 made more irrelevant arena-frame cues accessible, which did not notably affect the avoidance of the previously-learned sector position, and the animals continued to improve. In Stage 5, when the sector position was changed, the performance again dropped noticeably. L2 animals avoided for significantly shorter periods of time than the controls ($p = 0.03$), and pattern of group means suggested aggravation of this deficit during the last, and presumably most difficult, stages. The trend was, however, not significant, $p = 0.23$. (d) Latency to first error. In Stages 1 and 2 (passive place avoidance), the latency to first error was high in both groups. In stages 3–5, latency to first error was generally close to the random level of 60 s. Some animals managed to attain non-random performance, which was more common in the controls (notice the lines representing third quartile by the last days of Stage 4 and Stage 5). Results did not reveal general difference between groups.

did not show any difference between groups, $F(1,18) < 1$. However, there was an indication of interaction between group and stage factors, $F(1,18) = 2.63$, $p = 0.12$, partial $\eta^2 = 0.13$ for linear contrast and $F(1,18) = 3.51$, $p = 0.08$, partial $\eta^2 = 0.16$ for quadratic contrast. While L2 rats exhibited higher latency to the first error than control rats in the first two stages of the Carousel maze battery, $M_{L2} = 0.32$, they showed slightly lower latency to the first error in the next two stages, $M_{L2} = -0.14$.

While L₂ rats spent slightly less time in the previously punished sector relative to controls in Stage 5, the difference was not significant, $t(18) = 1.15$, $p = 0.27$, $r = -0.26$, $M_{L2} = -0.25$, which suggests that the groups do not differ in their tendency to perseverate. Perseverative behavior occurred in some individuals only and was not the typical behavioral strategy in either group. No other difference or even a trend was apparent in the data.

To summarize the results, L2 rats performed generally worse than control rats as was shown by differences in maximum time avoided and number of errors. Development of group means in consecutive stages of the Carousel maze suggested worse performance of L2 rats in late stages than in early stages when taken in comparison to control rats. While this pattern was seen in all three parameters measuring performance, it was not statistically significant in any case.

3.2. DMP test in the MWM

Results from the DMP showed a significant linear contrast for delay between first and second trials, with higher delays resulting in greater total distance, $F(1,18) = 7.06$, $p = 0.016$, partial $\eta^2 = 0.28$. This indicates that the rats performed worse when they had to recall the location of the platform after longer delays, as could be expected. No other effect (group, interaction of delay and group, quadratic trend for delay) was significant, all $F_{st}(1,18) < 1.2$, $p_{st} > 0.29$. A mixed-design ANOVA using log-transformed escape latency in the second trial as a dependent variable yielded virtually the same results and therefore is not reported. Additionally, there was no between-group difference in performance during the last two trials. Results of the performed analysis might not show group differences, even if one-trial learning differs between groups, when one group is worse in the first trial and both groups have similar

results in the second trial. However, there was no indication for the difference in performance between groups during the first trial. Furthermore, analyses for savings also did not show any significant difference (Fig. 2).

There was no sign of difference in proportion of time spent in the sector containing the platform during previous day between the L2 ($M = 0.123$) and control ($M = 0.134$) group, $t(18) = 0.55$, $p = 0.59$, $r = -0.13$, which shows that the groups did not differ in terms of perseveration.

3.3. Beam walking

The results did not suggest any difference between the L2 ($M = 0.20$) and control ($M = -0.20$) group, $t(16) = 0.83$, $p = 0.42$. Additionally, the groups did not differ in the number of slips (Mann–Whitney $U = 38.5$, $n_{L2} = n_{control} = 9$, $p = 0.89$) or in the number of falls (Mann–Whitney $U = 31.0$, $n_{L2} = n_{control} = 9$, $p = 0.45$).

4. Discussion

Our findings show that the reduced Nogo-A expression indeed affects behavior and cognitive abilities. In the Carousel maze, the L2 rats exhibited consistently and significantly impaired performance, as measured by the number of errors and maximum time avoided. Visual inspection of data for the maximum time avoided, the number of errors and the latency to the first error suggests that the impairment of L2 rats was more accentuated in the later stages, demanding segregation of spatial frames (as is apparent from Fig. 1b, c and d). However, this notion should be taken with caution since the effect did not achieve the traditional level of significance. The latency to the first error did not turn out to be a very reliable measure of cognitive performance. Animals often entered the sector accidentally very early during the session, even in cases when they apparently knew its position well, introducing additional noise into the data. During the first two stages ((Room/Arena)+ and Arena+), when the to-be-avoided sector was stable with respect to the arena floor, the Nogo-A knockdown animals tended to exhibit longer latencies to the first error, although the total number of errors in this group was similar to controls or even higher. This may suggest initial attempts to avoid punishment by immobility in L2 rats. During the later three stages, when active avoidance was required, L2 rats showed comparable or even shorter latencies to the first error relative to controls. We must note that for stages 3–5, the median value of latency to the first error generally did not exceed 60 s (one rotation period of the arena).

The animals acquired the procedural aspects of the task and were highly motivated. The eyesight of both groups was good enough, as proven by efficient performance in the MWM, and motor coordination was at a level sufficient to manage beam-walking performance, suggesting that possible procedural influences could be excluded. However, results from Stage 3, when the arena floor was covered with water, should be interpreted with caution, as the animals were disturbed by the presence of water, and even their perception of electric punishment might have been altered. Total distance traveled in the Carousel maze was slightly but consistently increased in the L2 group (Fig. 1a), but the difference was not significant. Total distance in the Carousel maze is probably related mainly to the spatial strategy used by the animals and the stressful nature of the task, although spontaneous hyperlocomotion has been observed in Nogo-A deficient mice by Willi et al. (2009).

Maintaining continuous active avoidance on a rotating arena is a demanding task (Wesierska et al., 2005), requiring not only having intact memory, but also paying sustained attention to distant, room-frame cues and separating them from the irrelevant,

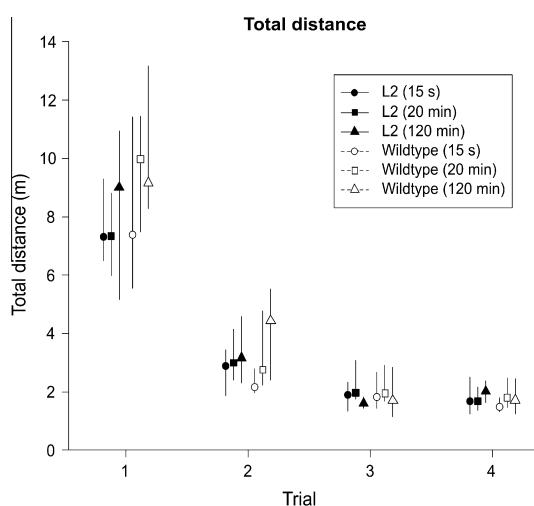


Fig. 2. Water maze results. The graph shows total distance to reach a hidden platform in the delayed-matching-to-place task. Points represent median values and ends of lines represent first and third quartiles of the raw data. All values were computed from performance from 3rd to 8th day and averaged for each animal across a given delay and trial. The performance of L2 and control animals is comparable in all parameters recorded.

arena-frame cues. To solve this problem, the animals must encode and use two distinct, mutually conflicting representations. This ability has been described as cognitive coordination or cognitive control (Kubik & Fenton, 2005; Lee et al., 2012; Wesierska et al., 2005). Even during the Stage 3, when most of the arena frame cues were hidden, idiothetic input (i.e., path integration) remained in conflict with the distant room frame cues. In Stage 4, even more profound conflict between reference frames was introduced (distal cues vs. path integration + local scent cues). The room-frame defined sector remained in the same position as during the previous stage, enabling the animals to use the previously learned avoidance response. In Stage 5, the sector location was changed, while other conditions remained the same. This shift markedly disrupted performance in both groups, but the L2 group was affected to larger extent, suggesting a deficit in cognitive flexibility. We attempted to test for perseverative behavior during Stage 5 of the Carousel Maze training. The results do not suggest perseveration as the prevailing behavioral mode in either group, and the difference between L2 and control animals was not significant. Therefore, we must assume that the deficit in L2 animals comprised primarily of an inability to deal with the newly defined sector, rather than persisting avoidance of the old and no longer reinforced one.

In the DMP test in the MWM, rats from both L2 and wildtype groups were able to locate the learned hidden platform position and performed well, showing their capability to use distant landmarks for representation of the hidden goal position. This suggests that the ability of both groups to acquire a one-trial place representation was comparable, as well as memory persistence, even after the longest delay tested (120 min). Similarly as in Stage 5 of the Carousel maze, we did not observe any sign of perseveration in L2 rats in the DMP task.

The beam walking test suggested that the Nogo-A deficiency did not adversely affect locomotor coordination, which is in accordance with the literature describing Nogo knockout mice. No effect of Nogo-A absence on performance in the rotarod test was found by Kim, Li, GrandPre, Qiu, and Strittmatter (2003) and Willi et al. (2009) reported even improved motor coordination in Nogo-A knockout mice.

We interpret our results as a mild cognitive deficit in L2 rats compared to wildtypes in continuous spatial avoidance in the Carousel maze battery. The observed pattern suggests that it included, but was not limited to, impaired cognitive coordination and flexibility, while spatial navigation and memory (assessed by the MWM) was spared. Impaired cognitive coordination is characteristic for schizophrenic patients (Phillips & Silverstein, 2003) and has been reported in animal models of the disease (Lee et al., 2012). Cognitive coordination assessed by Carousel maze tasks depends strongly on an intact hippocampus (Wesierska et al., 2005) and is more sensitive to hippocampal lesions than the MWM (Kubik & Fenton, 2005). Inflexibility and impairments in reversal learning are also typical for schizophrenia (Lee et al., 2012) and hippocampal lesion models (Kimble & Kimble, 1965). We propose that at least some effects observed in the Carousel maze in the L2 rats might be attributed to dysfunction of the hippocampus, a structure characterized by prominent expression of the Nogo-A, and may belong to a wider complex of schizophrenia-like endophenotypes reported in Nogo-A deficient rodents by Tews et al. (2013), Willi et al. (2010).

On the cellular level, the decrease in Nogo-A expression was demonstrated (1) to facilitate hippocampal and neocortical long-term potentiation (LTP) (Delekate et al., 2011), the neurophysiological substrate of memory trace formation including spatial learning (Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2008), and (2) to modulate other forms of synaptic plasticity within the hippocampus (Zagrebelsky, Schweigreiter, Bandtlow, Schwab, & Korte,

2010). Complementing this result on the behavioral level, enhanced Nogo signaling (by means of increased NgR1 expression) was found to impair lasting long-term memory (after retention times of 30 and 60 days, but not one day or less) in both passive avoidance and the MWM (Karlen et al., 2009). Correlation between cognitive decline and increase in Nogo-A expression in the hippocampus was found in aged rats by Vanguilder et al. (2011). One would, thus, expect the L2 rats to exhibit facilitated, rather than impaired, learning and memory, but the opposite is true. It is conceivable that the normal level of Nogo-A dependent signaling in the hippocampus is fine-tuned to provide optimal levels of synaptic plasticity, and an artificial increase, as well as decrease, may lead to compromised hippocampal function.

In the literature, studies of the consequences of altered Nogo-A signaling on cognitive functions are rather sparse. Willi et al. (2010) demonstrated that Nogo-A knockout mice exhibited perseveration behavior during reversal learning in a water T-maze, while acquisition was not affected, suggesting specific impairment of behavioral flexibility. This parallels the findings of Tews et al. (2013). A previous study by Willi et al. (2009) reported intact learning in the reference-memory version of the MWM, even after reversal (changed platform position). Our results revealed perseveration neither in Carousel maze, nor in DMP test in MWM. This might suggest that the manifestation of the cognitive flexibility impairment is dependent either on the animal model or the behavioral paradigm used or both factors. A working memory deficit, typical for schizophrenia, was described previously in mice with Nogo receptor deletion in a delayed alternation task (Budel et al., 2008). Interestingly, the L2 rats have demonstrated a deficit in short-term object recognition and object relocation memory, tested in spontaneous object-exploration paradigms (Tews et al., 2013). On the other hand, our results obtained using the DMP test do not show any impairment in spatial working memory. It must be emphasized that the MWM testing in general involves high levels of motivation (Morris, 1981). Therefore, the working memory capabilities in this model may depend upon experiment configuration and level of motivation.

To sum up, Nogo-A knockdown results in a selective cognitive impairment, which is not apparent in the DMP version of the Water Maze, focused on precise place representation and spatial working memory, but expresses itself in the Carousel maze battery, where on-line management of spatial reference frames is required. This supports the hypothesis linking Nogo-A-dependent signalization disruption with neuropsychiatric symptoms and cognitive disorders.

Acknowledgments

This work was funded by GAUK grant 365911 awarded to TP, by GACR 303/10/J032, P304/12/G069, IGA MZ CR NT13386 and AVCR M200111204 awarded to AS. Partial support was provided by grants from the German Ministry for Education and Research (BMBF, 01GQ1003B) National Bernstein Network for Computational Neuroscience (<http://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/en/2478.php#Heidelberg>), HEALTH-F2-2007-201714 DEVANX (<http://devanx.vitamib.com>) awarded to DB and the Swiss National Science Foundation (Grant No. 31-122527/1) awarded to MES. We thank Peter M. Luketic for language proofreading.

References

- Abdel Baki, S. G., Kao, H. Y., Kelemen, E., Fenton, A. A., & Bergold, P. J. (2009). A hierarchy of neurobehavioral tasks discriminates between mild and moderate brain injury in rats. *Brain Research*, 1280, 98–106.
- Akbik, F., Cafferty, W. B., & Strittmatter, S. M. (2012). Myelin associated inhibitors: A link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Experimental Neurology*, 235, 43–52.

- Blahna, K., Svoboda, J., Telensky, P., & Klement, D. (2011). Inertial stimuli generated by arena rotation are important for acquisition of the active place avoidance task. *Behavioural Brain Research*, 216, 207–213.
- Budel, S., Padukkavidana, T., Liu, B. P., Feng, Z., Hu, F., Johnson, S., Lauren, J., Park, J. H., McGee, A. W., Liao, J., Stillman, A., Kim, J. E., Yang, B. Z., Sodi, S., Gelernter, J., Zhao, H., Hisama, F., Arnsten, A. F., & Strittmatter, S. M. (2008). Genetic variants of Nogo-66 receptor with possible association to schizophrenia block myelin inhibition of axon growth. *Journal of Neuroscience*, 28, 13161–13172.
- Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R., & Fenton, A. A. (2012). Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 22, 1795–1808.
- Cimadevilla, J. M., Kaminsky, Y., Fenton, A., & Bures, J. (2000). Passive and active place avoidance as a tool of spatial memory research in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 102, 155–164.
- Delekate, A., Zagrebelsky, M., Kramer, S., Schwab, M. E., & Korte, M. (2011). Nogo-A restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 2569–2574.
- Fouad, K., Klusman, I., & Schwab, M. E. (2004). Regenerating corticospinal fibers in the marmoset (*Callitrix jacchus*) after spinal cord lesion and treatment with the anti-Nogo-A antibody IN-1. *European Journal of Neuroscience*, 20, 2479–2482.
- Freund, P., Schmidlin, E., Wannier, T., Bloch, J., Mir, A., Schwab, M. E., & Rouiller, E. M. (2009). Anti-Nogo-A antibody treatment promotes recovery of manual dexterity after unilateral cervical lesion in adult primates – re-examination and extension of behavioral data. *European Journal of Neuroscience*, 29, 983–996.
- Gill, T. J., Smith, G. J., Wissler, R. W., & Kunz, H. W. (1989). The rat as an experimental animal. *Science*, 245, 269–276.
- Goldstein, L. B. (1993). Rapid reliable measurement of lesion parameters for studies of motor recovery after sensorimotor cortex injury in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 48, 35–42.
- Hsu, R., Woodroffe, A., Lai, W. S., Cook, M. N., Mukai, J., Dunning, J. P., Swanson, D. J., Roos, J. L., Abecasis, G. R., Karayiorgou, M., & Gogos, J. A. (2007). Nogo Receptor 1 (RTN4R) as a candidate gene for schizophrenia: analysis using human and mouse genetic approaches. *PLoS ONE*, 2, 1234.
- Huber, A. B., Weinmann, O., Brösamle, C., Oertle, T., & Schwab, M. E. (2002). Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *Journal of Neuroscience*, 22, 3553–3567.
- Jitoku, D., Hattori, E., Iwayama, Y., Yamada, K., Toyota, T., Kikuchi, M., Maekawa, M., Nishikawa, T., & Yoshikawa, T. (2011). Association study of Nogo-related genes with schizophrenia in a Japanese case-control sample. *American Journal of Medical Genetics B Neuropsychiatric Genetics*, 156B, 581–592.
- Josephson, A., Widenfalk, J., Widmer, H. W., Olson, L., & Spenger, C. (2001). NOGO mRNA expression in adult and fetal human and rat nervous tissue and in weight drop injury. *Experimental Neurology*, 169, 319–328.
- Karlen, A., Karlsson, T. E., Mattsson, A., Lundström, K., Codeluppi, S., Pham, T. M., Bäckman, C. M., Ogren, S. O., Aberg, E., Hoffman, A. F., Sherling, M. A., Lupica, C. R., Hoffer, B. J., Spenger, C., Josephson, A., Brene, S., & Olson, L. (2009). Nogo receptor 1 regulates formation of lasting memories. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 20476–20481.
- Kim, J. E., Li, S., GrandPre, T., Qiu, D., & Strittmatter, S. M. (2003). Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 38, 187–199.
- Kimble, D. P., & Kimble, R. J. (1965). Hippocampectomy and response perseveration in the rat. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, 60(3), 474.
- Kubik, S., & Fenton, A. A. (2005). Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *Journal of Neuroscience*, 25, 9205–9212.
- Lee, H., Dvorak, D., Kao, H. Y., Duffy, A. M., Scharfman, H. E., & Fenton, A. A. (2012). Early cognitive experience prevents adult deficits in a neurodevelopmental schizophrenia model. *Neuron*, 75, 714–724.
- Lee, H., Raiker, S. J., Venkatesh, K., Geary, R., Robak, L. A., Zhang, Y., Yeh, H. H., Shrager, P., & Giger, R. J. (2008). Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *Journal of Neuroscience*, 28, 2753–2765.
- Liebscher, T., Schnell, L., Schnell, D., Scholl, J., Schneider, R., Gullo, M., Fouad, K., Mir, A., Rausch, M., Kindler, D., Hamers, F. P., & Schwab, M. E. (2005). Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cordinjured rats. *Annals of Neurology*, 58, 706–719.
- Mingorance, A., Fontana, X., Sole, M., Burgaya, F., Ureña, J. M., Teng, F. Y., Tang, B. L., Hunt, D., Anderson, P. N., Bethea, J. R., Schwab, M. E., Soriano, E., & del Rio, J. A. (2004). Regulation of Nogo and Nogo receptor during the development of the entorhino-hippocampal pathway and after adult hippocampal lesions. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26, 34–49.
- Morris, R. G. M. (1981). Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239–260.
- Novak, G., Kim, D., Seeman, P., & Tallero, T. (2002). Schizophrenia and Nogo: Elevated mRNA in cortex, and high prevalence of a homozygous CAA insert. *Molecular Brain Research*, 107, 183–189.
- O'Carroll, C. M., Martin, S. J., Sandin, J., Frenguelli, B., & Morris, R. G. (2006). Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learning & Memory*, 13, 760–769.
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A. A., & Sacktor, T. C. (2006). Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, 313, 1141–1144.
- Pernet, V., & Schwab, M. E. (2012). The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell and Tissue Research*, 349, 97–104.
- Petrasek, T., Iva Prokopova, I., Sladek, M., Weissova, K., Vojtechova, I., Stepan Bahnik, S., Zemanova, A., Schonig, K., Berger, S., Tews, B., Bartsch, D., Schwab, M. E., Sumova, A., Stuchlik, A. (in preparation). Nogo-A-deficient transgenic rats show deficits in higher cognitive functions, decreased anxiety and altered circadian activity patterns. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, manuscript in preparation.
- Petrinovic, M. M., Duncan, C. S., Bourikas, D., Weinman, O., Montani, L., Schroeter, A., Maerk, D., Sommer, L., Stoeckli, E. T., & Schwab, M. E. (2010). Neuronal Nogo-A regulates neurite fasciculation, branching and extension in the developing nervous system. *Development*, 137, 2539–2550.
- Phillips, W. A., & Silverstein, S. M. (2003). Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. *Behavioral and Brain Sciences*, 26, 65–82.
- Prokopova, I., Bahnik, S., Doulames, V., Vales, K., Petrasek, T., Svoboda, J., & Stuchlik, A. (2012). Synergistic effects of dopamine D2-like receptor antagonist sulpiride and beta-blocker propranolol on learning in the Carousel maze, a dry-land spatial navigation task. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 102, 151–156.
- Schnell, L., & Schwab, M. E. (1990). Axonal regeneration in the rat spinal cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth inhibitors. *Nature*, 343, 269–272.
- Schwab, M. E. (2010). Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 11, 799–811.
- Schwab, M. E., & Schnell, L. (1991). Channelling of developing rat corticospinal tract axons by myelin-associated neurite growth inhibitors. *Journal of Neuroscience*, 11, 709–722.
- Serrano, P., Friedman, E. L., Kenney, J., Taubenfeld, S. M., Zimmerman, J. M., Hanna, J., Alberini, C., Kelley, A. E., Maren, S., Rudy, J. W., Yin, J. C., Sacktor, T. C., & Fenton, A. A. (2008). PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biology*, 6, 2698–2706.
- Simonen, M., Pedersen, V., Weinmann, O., Schnell, L., Buss, A., Ledermann, B., Christ, F., Sansig, G., van der Putten, H., & Schwab, M. E. (2003). Systemic deletion of the myelin-associated outgrowth inhibitor Nogo-A improves regenerative and plastic responses after spinal cord injury. *Neuron*, 38, 201–211.
- Sinibaldi, L., De Luca, A., Bellacchio, E., Conti, E., Pasini, A., Paloscia, C., Spalletta, G., Caltagirone, C., Pizzati, A., & Dallapiccola, B. (2004). Mutations of the Nogo-66 receptor (RTN4R) gene in schizophrenia. *Human Mutation*, 24, 534–535.
- Steele, R. J., & Morris, R. G. (1999). Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, 9, 118–136.
- Stuchlik, A., Fenton, A. A., & Bures, J. (2001). Substratal idiothetic navigation of rats is impaired by removal or devaluation of extramaze and intramaze cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3537–3542.
- Tan, E. C., Chong, S. A., Wang, H., Chew-Ping Lim, E., & Teo, Y. Y. (2005). Gender-specific association of insertion/deletion polymorphisms in the Nogo gene and chronic schizophrenia. *Molecular Brain Research*, 139, 212–216.
- Tews, B., Schöning, K., Arzt, M. E., Clementi, S., Riout-Pedotti, M. S., Zemmar, A., Berger, S., Schneider, M., Weinmann, O., Kasper, H., Schwab, M. E., & Bartsch, D. (2013). Synthetic miRNA-mediated downregulation of Nogo-A in transgenic rats reveals its role as regulator of plasticity, learning and memory. *PNAS*, 110, 6583–6588.
- VanGuilder, H. D., Farley, J. A., Yan, H., Van Kirk, C. A., Mitschelen, M., Sonntag, W. E., & Freeman, W. M. (2011). Hippocampal dysregulation of synaptic plasticity-associated proteins with age-related cognitive decline. *Neurobiology of Diseases*, 43, 201–212.
- Voineskos, A. N. (2009). Converging evidence for the Nogo-66 receptor gene in schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, 29, 5045–5047.
- Wang, J., Chan, C. K., Taylor, J. S., & Chan, S. O. (2008). The growth-inhibitory protein Nogo is involved in midline routing of axons in the mouse optic chiasm. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 2581–2590.
- Wang, X., Chun, S.-J., Treloar, H., Vartanian, T., Greer, C. A., & Strittmatter, S. M. (2002). Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact. *Journal of Neuroscience*, 22, 5505–5515.
- Wesierska, M., Dockery, C., & Fenton, A. A. (2005). Beyond memory, navigation, and inhibition: Behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *Journal of Neuroscience*, 25, 2413–2419.
- Wiessner, C., Bareyre, F. M., Allegrini, P. R., Mir, A. K., Frentzel, S., Zurini, M., Schnell, L., Oertle, T., & Schwab, M. E. (2003). Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23, 154–165.
- Willi, R., Aloy, E. M., Yee, B. K., Feldon, J., & Schwab, M. E. (2009). Behavioral characterization of mice lacking the neurite outgrowth inhibitor Nogo-A. *Genes, Brain and Behavior*, 8, 181–192.
- Willi, R., & Schwab, M. E. (2013). Nogo and Nogo receptor: Relevance to schizophrenia? *Neurobiology of Diseases*, 54, 150–157.
- Willi, R., Weinmann, O., Winter, C., Klein, J., Sohr, R., Schnell, L., Yee, B. K., Feldon, J., & Schwab, M. E. (2010). Constitutive genetic deletion of the growth regulator Nogo-A induces schizophrenia related endophenotypes. *Journal of Neuroscience*, 30, 556–567.
- Zagrebelsky, M., Schweigreiter, R., Bandtlow, C. E., Schwab, M. E., & Korte, M. (2010). Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 30, 13220–13234.
- Zörner, B., & Schwab, M. E. (2010). Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1198(Suppl. 1), E22–E34.

IV. Diskuze

1. Interakce β -adrenergních receptorů s jinými systémy

Vzájemné propojení jednotlivých receptorových systémů CNS a jejich vliv na chování experimentálních zvířat patří mezi častá a do hloubky studovaná téma behaviorální farmakologie. Obzvláště zajímavé a aktuální je sledování změn chování zvířat v kontextu testů zaměřených na prostorovou orientaci, učení a paměť. Existuje mnoho studií tohoto typu, včetně například testů v bludišti Kolotoč (dříve zvané jako úloha AAPA, z anglického *active allothetic place avoidance*, úloha aktivního vyhýbání se místu), které byly uskutečněny v naší laboratoři (Stuchlik et al., 2008; Stuchlik and Vales, 2006; Stuchlik and Vales, 2008).

Pro určení prahových dávek antagonistů daných receptorů sloužily pilotní studie v bludišti Kolotoč. Je však třeba zmínit, že prahová dávka pro kognitivní deficit je úzce spjatá s typem behaviorální úlohy. Zdá se, že testy v MWM nejsou v porovnání s bludištěm Kolotoč tak citlivé na deficit v prostorové orientaci potkanů. To je pravděpodobně způsobeno vyšší a kontinuální motivací zvířat k pohybu (plavání) a nalezení skrytého cíle (ostrůvek), což může překrýt případný deficit po podání daných farmak.

1a. Synergismus mezi α_1 - a β -adrenergními receptory

Jak potvrdila naše studie, podáním podprahových dávek antagonistů α_1 -adrenergních receptorů prazosinu nedochází k narušení kognitivních funkcí experimentálních zvířat. Ke stejným závěrům dospěla také studie zkoumající případné narušení pracovní paměti po podání prazosinu, nízké dávky neovlivnily výkon zvířat, vyšší snižovaly motorickou aktivitu, ale opět bez narušení kognice (Puumala and Sirviö, 1997). Ovlivnění α_1 receptorů má spíše vliv na motorickou aktivitu, motivaci a navigaci potkanů než na jejich pracovní paměť (Puumala et al., 1998; Riekkinen et al., 1996). V našich předešlých experimentech v bludišti Kolotoč (Stuchlik and Vales, 2008) jsme demonstrovali nepříznivý efekt prazosinu na aktivní vyhýbání se potkanů, a to při užití nejvyšších dávek (4 mg/kg), které snižovaly lokomoci zvířat a tedy i jejich schopnost řešit úlohu. Nízké dávky prazosinu, ze kterých vycházela nynější studie, neprokázaly žádný nepříznivý efekt.

Betablokátor propranolol je široce studovanou látkou, obzvláště v souvislosti s konsolidací paměti. Dokumentovány však byly i na dávce závislé poruchy (např. narušená prostorová orientace) v různých kognitivních testech, při podání propranololu před plněním úlohy (Heron et al., 1996; Miranda et al., 2007), a to také v bludišti Kolotoč (Stuchlík et al., 2009), kde byly stanoveny prahové dávky pro kognitivní deficit. Po aplikaci nízkých dávek propranololu nebyla zaznamenána motorická ani kognitivní změna výkonu zvířat v MWM (Decker et al., 1990; Saber and Cain, 2003) ani v radiálním bludišti (Hiraga and Iwasaki, 1984).

K zajímavému efektu v našem experimentu došlo po podání nižší dávky samotného propranololu (5 mg/kg). Ta zapříčinila pokles času do prvního vstupu během posledního sezení (měřítko dlouhodobé paměti mezi dvěma sezeními), po vyšší dávce však k poklesu nedocházelo. Propranolol byl podaný systematicky, proto je vysvětlení tohoto jevu pouze spekulativní. Naměřená nelinearita mohla být zapříčiněna rozdílnou farmakokinetikou propranololu v různých mozkových strukturách, tedy například rozdílným obsazením mozkových receptorů nebo odlišnou regulací kognitivních schopností jedince. V dalších experimentech s nižšími dávkami propranololu se však podobné deficity nevyskytly.

Během experimentů nebyla pozorována změněná lokomoční aktivita ani sedace potkanů po podání propranololu. Snížená pohyblivost potkanů se nevyskytla ani v jiných studiích s podobnými dávkami propranololu, přestože dávka 10 mg/kg již může ovlivňovat srdeční frekvenci a krevní tlak zvířat (Heron et al., 1996; Singh et al., 1990; Stuchlík et al., 2009). Výjimkou jsou však studie v *open-field* arénách, které jsou díky spontánnímu exploračnímu pohybu zvířat k poklesu lokomoce citlivější. V těchto úlohách docházelo ke snížení pohybové aktivity i po nízkých dávkách propranololu i prazosinu (Angrini et al., 1998; Haller et al., 1997).

Naším cílem bylo objasnit, zda podprahové dávky β -adrenergních a α_1 -adrenergních antagonistů, které jednotlivě podané nezpůsobují narušení prostorové kognice zvířat, mohou při vzájemné koaplikaci ovlivnit kognici či motorickou aktivitu zvířat. Podobný synergismus byl již v minulosti popsán u jiných systémů kognitivních mediátorů. Naší laboratoři se podařilo v minulosti prokázat závažné porušení lokomoce a zřejmě také prostorové orientace zvířat ve stejně navržené úloze v bludišti Kolotoč po podání α_1 -adrenergního antagonisty prazosinu a

D_2 antagonisty sulpiridu (Stuchlik et al., 2008). Prazosin působil v synergii také s raclopridem, antagonistou D_2 -receptorů (Wadenberg et al., 2000) či antagonistou NMDA receptorů (Riekkinen et al., 1996). Také u podprahových dávek propranololu byl popsán synergismus s jinými systémy mediátorů. Negativní vliv na učení a paměť vykazoval při současném podávání s anticholinergiky (Decker et al., 1990; Saber and Cain, 2003) či serotonergními antagonisty (Kenton et al., 2008).

Interakce mezi α a β adrenoceptory byly dříve pozorovány v *open-field* úlohách (Mogilnicka, 1986; Mogilnicka and Nielsen, 1986) či v úloze pasivního se vyhýbání (Ferry et al., 1999), kde autoři vysvětlují interakci regulací noradrenergní signální transdukce. Také *in vitro* experimenty popisují interakci α a β receptorů, která spočívá v ovlivňování vnitrobuněčných signálních kaskád (Copik et al., 2009). V naší studii se kognitivní deficit v bludišti Kolotoč projevil po podání prazosinu současně s propranololem ve všech použitých koncentracích látek. Vzhledem k nenarušené motorické aktivitě zvířat (k níž došlo pouze při současné aplikaci nejvyšších koncentrací obou látek), se dá předpokládat čistě kognitivní deficit, který se projevil v parametrech testu měřících pracovní a dlouhodobou paměť (*počet vstupů do zakázaného sektoru, čas do prvního vstupu, nejdelsí čas mezi dvěma vstupy*).

Jedním z možných vysvětlení narušení výkonu zvířat v našem experimentu je pravděpodobné oslabení noradrenergní stimulace v hipokampusu následkem souběžné blokády α - a β -adrenergních receptorů. Jak bylo prokázáno, hipokampus je struktura nezbytná pro splnění úlohy v bludišti Kolotoč, tj. správné rozlišení a organizace vnitřních a vnějších stimulů včetně jejich zapamatování (Cimadevilla et al., 2000; Kubik et al., 2006). Noradrenergní systém má významný vliv na utváření paměti v hipokampusu a její dlouhodobé potenciaci (Harley, 2007; Izquierdo et al., 1998). Velký vliv je přičítán hlavně β receptorům (Bramham et al., 1997; Pussinen and Sirviö, 1998; Straube a Frey, 2003), jejichž funkce je v tomto případě podporována souběžnou aktivací α receptorů (Ferry et al., 1999).

Další strukturou, pravděpodobně zapojenou do učení při silné averzivní motivaci testovaných zvířat v bludišti Kolotoč, je amygdala (Vafaei et al., 2007). Podílí se na řízení bdělosti a pozornosti, zpracování a uchování vzpomínek, obzvláště emočně zabarvených, a regulaci konsolidace paměti v jiných regionech, např.

v hipokampu (Cahill et al., 2000; Ferry et al., 1999; Phelps, 2006). Také její funkce je závislá na neporušené adrenergní inervaci, při synergii antagonistů adrenergních receptorů tedy může docházet k poškození paměti v různých kognitivních úlohách.

V úvahu jsme také vzali možnost nekognitivního působení propranololu, například díky anxiolytickému působení při antagonismu 5-HT1 a 5-HT2 serotoninových receptorů (Alexander a Wood, 1987; Angrini et al., 1998). Přímo v bludišti Kolotoč však nebyl pozorován žádný negativní efekt na kognici zvířat při zablokování serotoninových receptorů (Bubeníková-Valesová et al., 2008), antagonismus 5-HT1 navíc může v některých úlohách vykazovat i zlepšení kognitivních funkcí (Meltzer a Sumiyoshi, 2008).

Nelze vyloučit ani možné periferní působení propranololu a prazosinu. Z tohoto důvodu by bylo vhodné studii doplnit navazujícími experimenty s koaplikací látek pomocí mikroinjekcí do konkrétní mozkové struktury či porovnání se stejně působícími antagonisty, kteří by však neprocházeli hematoencefalickou bariérou. Možný sedativní či hypotenzní vliv prazosinu a propranololu na chování a úspěšnost zvířat v bludišti Kolotoč byl vyloučen, neboť k němu docházelo pouze při aplikaci nejvyšších dávek těchto antagonistů, zatímco kognitivní deficit se projevily již při koaplikaci nižších dávek.

K nalezené interakci mezi α_1 - a β -adrenergními receptory po podání podprahových dávek jejich antagonistů pravděpodobně přispívá hipokampem či amygdalou ovlivněná kognitivní porucha. Tento nález by mohl mít význam i pro klinickou praxi, vzhledem k častému užívání obou typů látek u mnoha polymorbidních pacientů. Kognitivní deficit již byly pozorovány u pacientů užívajících α či β blokátory pronikající hematoencefalickou bariérou (Cukor et al., 2009; Griebus a Lippa, 2007). Zároveň by však poznáný synergismus mezi α_1 - a β -adrenergními receptory mohl mít využití při léčbě chorob, kdy je částečná amnézie cílem léčby (např. stresové poruchy), o využití propranololu se také uvažuje v souvislosti s léčbou drogové závislosti nebo obezity (Fricks-Gleason a Marshall, 2008; Milton et al., 2008), či při vývoji nových antipsychotik (Houslay, 2009; Lopez-Gil et al., 2009).

1b. Interakce mezi D₂-podobnými a β-adrenergními receptory

Také této studii předcházely pilotní experimenty s určením podprahové dávky pro kognitivní deficit způsobené podáním D₂ antagonistu sulpiridu (Stuchlik et al., 2007; Stuchlik et al., 2008) a β₂ antagonistu propranololu (Stuchlik et al., 2009). O kognitivních a motorických deficitech propranololu podaného samostatně či v kombinaci s jinou farmakologicky aktivní látkou již bylo pojednáno výše. Co se týče lokomotorické aktivity, antagonismus D₂ receptorů vede k jejímu poklesu (Beaulieu and Gainetdinov, 2011). K tomuto jevu může docházet i v dávkách, jež nemají vliv na prostorovou navigaci potkanů, jak bylo patrné během našich experimentů.

Víme, že stejně tak D₂ receptory se účastní klasických funkcí hipokampu, procesů prostorového učení a dlouhodobé potenciace během konsolidace paměti. Modulují také činnost frontálního laloku a tedy exekutivní funkce včetně pracovní paměti (Takahashi et al., 2008; Xu and Yao, 2010). Během testování potkanů v paměťových úlohách závislých na *nucleus caudatus* či hipokampusu se prokázalo, že při podání dopaminového agonisty (amfetaminu) či selektivního D₂ agonisty (LY171555) po úloze dochází ke zlepšení paměti oproti kontrolní skupině, efekt se naopak neprokázal u selektivního D₁ agonisty (Packard and White, 1989). Vliv sulpiridu, antagonistu D₂ receptorů, byl také testovaný v mnoha kognitivních úlohách s využitím jeho periferní či přímo intracerebrální aplikace.

Při infúzi sulpiridu do basolaterální amygdaly po tréninku úlohy zaměřené na vyhýbání se místu docházelo k poruchám retence paměti. Při přidání infúze antagonistu β₂ receptorů (ale také při přidání cholinergního antagonistu) byl navíc zablokován efekt dopaminu, který při samostatném podání retenci paměti podporoval (Lalumiere et al., 2004). Tyto výsledky naznačují, že se dopaminergní aktivace v amygdale podílí na konsolidaci paměti a že zřejmě také zahrnuje současnou aktivaci β-adrenergních neuronů.

Existují však studie, které nepříznivý efekt antagonismu β receptorů na dopaminergně navozené zlepšení paměti neprokázaly. Mezi ně náleží experiment, při němž injekce propranololu neblokovaly efekt amfetaminu na paměť (Williams et al., 1994) a systémová aplikace diethyldithiocarbamátu (zvyšuje hladinu dopaminu a

snižuje hladinu noradrenalinu v mozku) po tréninku zlepšovala retenci paměti (Haycock et al., 1976). Je třeba mít na paměti, že existují jisté odlišnosti mezi úlohami, ve kterých byly látky podávány před či po tréninku zvířat. Během našich experimentů se při podání před testem prokázala u obou látek vzájemná potenciace efektu na osvojení úlohy založené na prostorovém učení. Vezmeme-li v úvahu také předešlé studie, zdá se, že tento efekt lze přičítat akutnímu působení daných látek, ne však modulaci konsolidace paměti.

V behaviorálních experimentech s navozeným deficitem po blokádě dopaminových receptorů haloperidolem, se ukázala interakce mezi dopaminovými a α -adrenergními receptory, podání propranololu však zůstalo bez efektu (Anisman et al., 1981). Také byla popsána specifická modulace subkortikální dopaminergní transmise skrze α_1 receptory v PFC, opět s nesignifikantním efektem $\beta_{1/2}$ -blokátoru alprenelolu (Nicnioccaill and Gratton, 2007). Prefrontální kůra zřejmě není místem působení interakce, která byla pozorována v naší studii.

V jednom z předešlých experimentů v bludišti Kolotoč jsme prokázali synergii v interakci mezi antagonistou D₂ receptorů sulpiridem a antagonistou α_1 -receptorů prazosinem. Při současném podání jejich nízkých dávek docházelo k narušení lokomotorické aktivity i prostorové navigace (Stuchlik et al., 2008). Interakce mezi dopaminergním a noradrenergním systémem v hipokampu (Borgkvist et al., 2011) naznačuje, že také *in vivo* pravděpodobně existuje synergismus mezi těmito dvěma systémy v hipokampu, a to na receptorové či synaptické úrovni.

V naší studii se podařilo prokázat akutní efekt na lokomotorickou aktivitu a prostorové učení a paměť po podání propranololu a sulpiridu před testy. Obě látky navíc vykazovaly synergismus v ovlivnění prostorové paměti při koaplikaci. Současná aplikace sulpiridu a propranololu vyústila k významnému deficitu výkonu potkanů, což naznačuje potenciaci efektů obou látek na parametry úlohy. Signifikantní zhoršení potkanů se projevilo u parametru „*nejdelší čas mezi dvěma vstupy*“, korelátu pracovní paměti. Ukázal se však také trend ke zhoršení zvířat v dalších parametrech, jako jsou „*celková nachovená vzdálenost*“ a „*počet vstupů do zakázaného sektoru*“, což dále podporuje význam uvedeného výsledku. Stejně jako v předešlé studii, kde byl pozorován synergismus mezi α a β -adrenergními receptory,

se dá předpokládat jako příčina deficitu hipokampem či amygdalou ovlivněná kognitivní porucha na úrovni synapse a receptorů.

Svůj vliv na výkon zvířat v dané studii mohly mít také nespecifické efekty sulpiridu či propranololu na chování zvířat, jejich kardiovaskulární systém či vnímání šoků. Zdají se však být nepravděpodobné, neboť v naší předešlé úloze (Stuchlik et al., 2009) i potkani po podání nejvyšších dávek propranololu vykazovali normální lokomotorickou aktivitu i přes hypotenzní vliv této dávky (Singh et al., 1990). V případě sulpiridu i podání jeho vysokých dávek neovlivnilo navigaci potkanů v MWM, procedurální funkce zvířat zůstaly intaktní (Stuchlik et al., 2007). Motorická aktivita v bludišti Kolotoč je však řazena mezi ty tzv. „nucené“ aktivity a neukazuje spontánní pohybovou aktivitu zvířat (jako například testy „*open-field*“). Z tohoto důvodu by k objasnění příspěvku centrálního či periferního mechanismu na výsledky našich experimentů jistě pomohly doplňující studie zaměřené na popsání případných systémových efektů propranololu a sulpiridu.

2. Kvalitativní a kvantitativní efekt nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů MK-801, farmakologického modelu schizofrenie, na behaviorální flexibilitu a lokomoci

Výsledky této studie prokázaly narušení behaviorální flexibility zvířat po podání MK-801 (dizocilpin), nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů. Behaviorální flexibilita, adaptace na měnící se podmínky prostředí, je často poškozena u schizofrenie. Látka MK-801 byla aplikována během sezení, při němž se měnily prostorové koordinanty úlohy (tzv. *reversal*), ovlivnila tedy právě flexibilitu testovaných potkanů, nikoliv proces učení a schopnost osvojit si úlohu.

Efekt MK-801 se projevil v úloze MWM i v bludišti Kolotoč. Porušení výkonů potkanů během reverzní úlohy bylo patrné v dávkách 0,12 – 0,15 mg/kg, některé deficity (např. *čas strávený v cílovém kvadrantu* MWM nebo *počet chyb* v bludišti Kolotoč) se projevily již při dávce 0,08 mg/kg. Bylo také pozorováno narušení výkonu během reverzního sezení v bludišti Kolotoč při dávce 0,08 mg/kg, ne však při aplikaci dávky 0,10 mg/kg. Tento jev se však s užitím současných dat nepodařilo uspokojivě vysvětlit.

Naše výsledky jsou v souladu s již dříve publikovanými daty z úloh s odlišnými podmínkami a modely. Podobné dávky MK-801 (0,06 a 0,10 mg/kg) podané juvenilním potkanům poškozovaly reverzní učení v T-bludišti. Tento efekt byl navíc nezávislý na behaviorální senzitizaci a nepoškozoval osvojení úlohy (Chadman et al., 2006). Později se též výzkumné skupině podařilo pomocí cílené intracerebrální aplikace MK-801 potvrdit závislost reverzního učení na NMDA receptorech v hipokampusu (Watson and Stanton, 2009a), dorsomedialní striatu (Watson and Stanton, 2009b) a mediální PFC (Watson and Stanton, 2009c). Dá se předpokládat, že deficit pozorované v našem experimentu jsou taktéž závislé na výše zmínovaných strukturách. Dávka 0,15 mg/kg navíc mohla indukovat celkový psychotomimetický stav včetně narušení procedurálních, senzorických a motivačních funkcí.

Podání MK-801 také poškozovalo reverzní učení v radiálním bludišti (Bischoff and Tiedtke, 1992; Caramanos and Shapiro, 1994), vysoké dávky 0,5 mg/kg měly negativní vliv na reverzní učení v MWM (Beninger et al., 2009), zřejmě však bez ovlivnění pracovní paměti (Caramanos and Shapiro, 1994; Steele and Morris, 1999).

Během našich experimentů v bludišti Kolotoč se ukázalo, že dávky MK-801 způsobující poškození výkonu potkanů v reverzních úlohách jsou nižší než dávky ovlivňující samotné osvojení úlohy. MK-801 zřejmě vykazuje preferenční senzitivitu k reverzní konfiguraci (Stuchlik et al., 2004; Stuchlik and Vales, 2005; Vales et al., 2006). K poškození osvojení dané úlohy docházelo v dávkách 0,15 či 0,20 mg/kg, přesto v některých specifických případech může k narušení akvizice dojít i v dávkách nižších – 0,10 mg/kg (Vales et al., 2010).

V Morrisově vodním bludišti je dávka MK-801 0,10 mg/kg stejná pro narušení osvojení úlohy i poruchy v reverzních sezeních, což bylo ověřeno předešlými experimenty (Stuchlik et al., 2004). V některých studiích však dochází k poškození akvizice MWM ještě v nižších dávkách (McLamb et al., 1990; van der Staay, 2011). Vysvětlením by mohl být fakt, že v úlohách byly použity různé kmeny potkanů a potkani Long-Evans z našeho chovu mohou mít nižší sensitivitu k účinkům MK-801 v porovnání například s potkany Wistar, jak již bylo popsáno již dříve (Vales et al., 2006).

V úvahu byly také vzaty možné procedurální deficitu po podání MK-801. V Morrisově vodním bludišti lze těžko odlišit tyto defekty od poruch navigace. Z tohoto důvodu se k eliminaci procedurálních deficitů využívá trénink před úlohou, který není závislý na prostorové navigaci, a potkani si během něj osvojí pravidla úlohy. Toto seznámení s úlohou bylo použito v našich experimentech a mohlo zmírnit sensitivitu potkanů během druhého dne testů. Dávka MK-801 0,10 a 0,12 mg/kg v MWM ovlivňovala primárně navigační funkce, na rozdíl od bludiště Kolotoč, kde byla hyperlokomotiva pozorována již v nízkých dávkách.

Zmiňovaná zvýšená pohybová aktivita potkanů byla pozorována po podání téměř všech dávek MK-801 (kromě nejnižší 0,05 mg/kg), byť bývá ve většině případů patrná až při aplikaci dávek vyšších (Beninger et al., 2009; Nilsson et al., 2004; Stuchlik et al., 2004; Vales et al., 2010). Dá se tedy předpokládat, že námi pozorovaná hyperaktivita potkanů při relativně nízkých dávkách MK-801 je spíše důsledkem vyššího počtu šoků, který narostl při změně prostorových koordinát (reverzní úloha) společně se zvýšenými kognitivními nároky úlohy. Tento závěr podporuje také fakt, že v MWM bylo zvýšení rychlosti plavání potkanů pozorováno pouze po podání nejvyšších dávek 0,15 mg/kg, což je v souladu s našimi předešlými experimenty v aréně (Stuchlik and Vales, 2005).

3. Efekt redukované exprese Nogo-A proteinu u potkanů, genetického modelu schizofrenie, v testech prostorové navigace, prostorové paměti a behaviorální flexibility

V této studii byla využita speciální baterie testů v bludišti Kolotoč, která je zaměřena na schopnost kontinuální prostorové navigace během neustále se měnících podmínek. Tato baterie testů je senzitivní i na drobné kognitivní deficitu a vyžaduje kromě nenarušené paměti také schopnost behaviorální flexibility zvířat (Abdel-Baki et al., 2009; Burghardt et al., 2012; Wesierska et al., 2005). Pro její řešení je nutné rozlišit relevantní a irrelevantní podněty z arény i jejího okolí, proto se tato schopnost popisuje jako kognitivní koordinace (Kubik and Fenton, 2005; Wesierska et al., 2005).

Transgenní potkani s down-regulací exprese proteinu Nogo-A (zkráceně potkani L2) vykazovali v této úloze lehce zvýšenou lokomotorickou aktivitu a

výrazně zhoršený výkon. V porovnání s kontrolními potkany byl jejich výkon narušený v parametrech *počet chyb* (tj. počet vstupů do zakázaného sektoru), v *čase do první chyby a maximálním čase vyhýbání se sektoru*. Během prvních dnů baterie testů, kdy byl zakázaný sektor stabilní a určený vzhledem povrchu arény, L2 potkani vykazovali vyšší latenci do první chyby (zřejmě v důsledku odlišné strategie a imobility), celkový počet chyb však byl srovnatelný. Později však již L2 potkani vykazovali zhoršené parametry řešení úlohy. V poslední fázi baterie testů, kdy došlo k přemístění zakázaného sektoru na opačnou stranu, došlo ke zhoršení výkonu u obou skupin, u L2 potkanů však v mnohem větší míře, což zřejmě koreluje s jejich deficitem kognitivní flexibility. Podobných výsledků bylo dosaženo v předešlých testech, ve vodním T-bludišti došlo k narušené reverzní učení L2 potkanů (Tews et al., 2013).

Během našeho experimentu byli stejní potkani testováni také v Morrisově vodním bludišti, verzi *delayed-matching-to-place* (O'Carroll et al., 2006; Steele & Morris, 1999). Tato úloha umožňuje studium prostorové pracovní paměti a zachování naučeného engramu během jednotlivých nezávislých sezení. L2 potkani se v tomto případě nelíšili od kontrol, prokázali nenarušenou schopnost prostorové koordinace za užití vzdálených vodítek a zachování paměťové stopy i po nejdelším intervalu mezi dvěma plavbami (120min).

Případné nepříznivé procedurální vlivy na výkon potkanů se zdají být nepravděpodobné, neboť všechna zvířata byla pečlivě obeznámena s procesem baterie testů a zároveň byla silně posílena jejich motivace (sbírání pelet v bludišti Kolotoč). Jejich motorická koordinace byla nenarušená, jak prokázal test chůze po tyči (*beam-walking*). Stejně neporušená pohybová koordinace byla pozorována také u Nogo-A *knock-out* myší (Kim et al., 2003; Willi et al., 2009).

Lehce zvýšená celková nachozená vzdálenost L2 potkanů v bludišti Kolotoč není zcela v souladu s popsáným fenotypem pro Nogo-A deficienci. Například v práci Willi et al. (2009) byla popsána zvýšená spontánní lokomoce během tmavé fáze cirkadiánního rytmu Nogo-A-*knock-out* myší, ovšem v následné studii v testech otevřeného pole byla lokomoce stejného typu myší srovnatelná s kontrolami (Willi et al., 2010). Celkovou nachozenou vzdálenost L2 potkanů v našich testech nelze zcela porovnat se spontánní lokomocí v klecích zvířat či v testech otevřeného pole. Její

mírné zvýšení v bludišti Kolotoč zřejmě odpovídá spíše odlišné prostorové strategii řešení úlohy a je silně ovlivněné stresující povahou testu. Tento závěr podporuje i fakt, že v MWM byla celková uplavená vzdálenost L2 potkanů a kontrol srovnatelná.

Zatím nebylo provedeno mnoho studií, které by se zabývaly behaviorálními následky narušené Nogo-A signalizace. Ve většině případů jsou navíc využívané genetické myší modely, které se od potkaních mírně odlišují, metodika je též rozdílná. Bylo pozorováno perseverační chování Nogo-A deficientních myší během reverzního učení v T-bludišti, při nenarušeném osvojení dané úlohy, což svědčí pro porušenou behaviorální flexibilitu (Willi et al., 2010). Stejné výsledky jsme pozorovali v závěrečné fázi baterie testů v bludišti Kolotoč. Willi et al. (2009) však také popsali neporušené učení Nogo-A deficientních myší v MWM, dokonce i při reverzním sezení (změna pozice skrytého ostrůvku). Toto zjištění opět potvrzuje, že projev narušené kognitivní flexibility je silně závislý nejenom na typu animálního modelu, ale také na typu behaviorální úlohy.

Jak již bylo řečeno, narušená kognitivní flexibilita patří do fenotypu schizofrenního chování. Stejně tak sem lze zařadit poškozenou kognitivní koordinaci (Phillips and Silverstein, 2003), která byla již v minulosti pozorována i na zvířecích modelech schizofrenie (Lee et al., 2012; Powell and Miyakawa, 2006). Nedávná studie provedena na stejném transgenním modelu potkanů, jaký byl využit během našich experimentů, popsala pozorované behaviorální změny L2 potkanů jako schizofrenii podobný endofenotyp (Tews et al., 2013). Narušená kognitivní koordinace (Wesierska et al., 2005), inflexibilita a poruchy učení v reverzních úlohách (Kimble and Kimble, 1965; Lee et al., 2008) jsou silně závislé na intaktním hipokampusu. Právě bludiště Kolotoč je v porovnání s MWM senzitivnější úlohou pro animální modely s hipokampální lézí (Kubik and Fenton, 2005). Můžeme tedy předpokládat, že defekty u L2 potkanů, které byly pozorované v bludišti Kolotoč, mohou být způsobené poruchou v oblasti hipokampusu (struktura s prominentní expresí Nogo-A) a zároveň náleží do širšího komplexu endofenotypů schizofrenie popsaných již dříve u Nogo-A deficientních zvířat (Tews et al., 2013; Willi et al., 2010).

U Nogo-A deficientních myší byly pozorovány i další deficity související s fenotypem schizofrenie. Vykazovaly zhoršení v testu prepulzní a latentní inhibice,

abnormality neuropřenašečů dopaminu a serotoninu (Willi et al., 2010). Snížená exprese Nogo-A na buněčné úrovni podporuje hipokampální a neokortikální dlouhodobou potenciaci (LTP) (Delekate et al., 2011), formaci paměťové stopy během prostorového učení (Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2008) a moduluje synaptickou plasticitu v hippokampusu (Zagrebelsky et al., 2010). Na behaviorální úrovni pak zvýšení Nogo signalizace zákonitě ústí v poškození dlouhodobé paměti během různých kognitivních úloh (Karlen et al., 2009). Přestože by se dalo předpokládat, že u Nogo-deficientních potkanů bude učení a paměť spíše zlepšena, opak je pravdou. Je možné, že optimální signalizace v hipokampusu je závislá na nezměněné hladině Nogo-A, jejíž nepřirozené zvýšení či snížení narušuje hipokampální paměťové procesy včetně LTP.

V. Závěr

V prvních dvou experimentech jsme se zabývali objasněním možné synergie mezi jednotlivými systémy mozkových neuropřenašečů a jejím vztahem k prostorové orientaci, učení a paměti v bludišti Kolotoč, úloze vysoce selektivní na neurofarmakologické kognitivní poškození.

Bylo prokázáno, že systémová aplikace prazosinu, antagonisty α_1 receptorů, a propranololu, blokátoru β receptorů, synergicky narušuje prostorové učení v bludišti Kolotoč a kognici potkanů. Vysoké dávky navíc snižovaly lokomotorickou aktivitu. Tyto výsledky naznačují, že α_1 a β receptory interagují *in vivo* a to nikoliv pouze při regulaci autonomní odpovědi a chování, ale též při modulaci prostorového učení závislého na hipokampu. Vzhledem k rozšířenému užití obou typů látek v klinické praxi, mohou naše závěry také vést k diskuzi, zda by nebylo vhodné zaměřit se na kontrolu kognitivních funkcí u pacientů užívajících současně blokátory α a β receptorů.

Také současná aplikace propranololu se sulpiridem, antagonistou D_2 receptorů, vede k narušení kognitivních schopností experimentálních zvířat. Postihuje lokomoci a osvojení úlohy v bludišti Kolotoč. Ko-aplikace obou těchto látek i v subklinických dávkách potencovala jejich efekt na prostorové učení potkanů. Výsledky experimentu signalizují interakci mezi dopaminovým a noradrenergním systémem neuropřenašečů, včetně jejího vlivu na paměťové funkce. Vzhledem k charakteru kognitivní úlohy je tento efekt je pravděpodobně závislý na hipokampu a amygdale. Sulpirid i různé typy betablokátorů jsou široce užívanými látkami, výsledky tedy mohou mít opět dopad na klinickou praxi.

V následném experimentu jsme popsali kvalitativní a kvantitativní efekt podání MK-801, nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů a farmakologického animálního modelu schizofrenie, ve dvou široce užívaných kognitivních úlohách – bludišti Kolotoč a Morrisově vodním bludišti (MWM). V obou případech došlo k narušení kognitivní flexibility testovaných potkanů během reverzního sezení, nikoliv však k samotnému k narušení osvojení úlohy či procesu učení a paměti. Navíc naše data naznačují vyšší senzitivitu reverzní konfigurace

v bludišti Kolotoč (prahová dávka již 0,08 mg/kg) v porovnání s MWM (senzitivní od dávky 0,10 mg/kg). Obě použité úlohy (reverzní konfigurace) se jeví jako vysoce užitečné pro testování nových molekul s antipsychotickým či prokognitivním účinkem.

V posledním z prezentovaných experimentů byl sledován efekt deficience Nogo-A proteinu (animální model schizofrenie) u L2 potkanů na prostorové učení, paměť, kognitivní koordinaci a flexibilitu v bludišti Kolotoč a MWM. Ukázalo se, že Nogo-A *knock-down* vede v selektivní kognitivní poškození. Tento efekt nebyl pozorovatelný v testu DMP (*delayed matching to place*), který je zaměřený na přesnou prostorovou reprezentaci a pracovní paměť, ale byl prokázán ve speciální baterii testů v bludišti Kolotoč, jež vyžaduje neporušené *on-line* zpracování prostorových referenčních rámců a behaviorální flexibilitu v řešení neustále se měnících podmínek úlohy. Naše výsledky podporují hypotézu, že defekt signalizace závislé na Nogo-A proteinu je úzce spjatý s endofenotypem neuropsychiatrických symptomů a kognitivních poruch.

VI. Seznam literatury

1. Abdel Baki SG, Kao HY, Kelemen E, Fenton AA, Bergold PJ. A hierarchy of neurobehavioral tasks discriminates between mild and moderate brain injury in rats. *Brain Res*, 2009, 1280, s. 98-106
2. Adamec R, Muir C, Grimes M, Pearcey K. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. *Behav Brain Res*. 2007, 179(2), s. 192-207
3. Adamusova E, Cais O, Vyklicky V, Kudova E, Chodounská H, Horak M, Vyklický L Jr. Pregnenolone sulfate activates NMDA receptor channels. *Physiol Res*, 2013, 62 (6), s. 731-6
4. Ahlquist, RP. A study of adrenotropic receptors. *Am J Physiol*, 1948, 153, s. 586–600
5. Akbik F, Cafferty WB, Strittmatter SM. Myelin associated inhibitors: A link between injury-induced and experience-dependent plasticity. *Exp Neurol*, 2012, 235, s. 43-52
6. Alexander BS, Wood MD. Stereoselective blockade of central (3H)5-hydroxytryptamine binding to multiple sites (5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT1C) by mianserin and propranolol. *J Pharm Pharmacol*. 1987, 39(8), s. 664-666
7. Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JPA, Kavvoura FK, Khouri MJ, Tanzi RE, Bertram L. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet*, 2008, 40 (7), s. 827–834
8. Andersen JD and Pouzet B. Spatial memory deficits induced by perinatal treatment of rats with PCP and reversal effect of D-serine. *Neuropsychopharmacology*, 2004, 29 (6), s. 1080–1090
9. Anis NA, Berry SC, Burton NR, et al. The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *Br J Pharmacol*, 1983, 79, s. 565-575

10. Anisman H, Ritch M, Sklar LS. Noradrenergic and dopaminergic interactions in escape behavior: analysis of uncontrollable stress effects. *Psychopharmacology*, 1981, 74 (3), s. 263–268
11. Angrini M, Leslie JC, Shephard RA. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacol Biochem Behav*. 1998, 59(2), s. 387-397
12. Arguello A and Gogos JA. Modeling madness in mice: one piece at a time. *Neuron*, 2006, 52, s. 179-196
13. Arnsten AFT and Li B-M. Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biol Psychiatry*, 2005, 57 (11), s. 1377–1384
14. Bai O, Zhang H, Li XM. Antipsychotic drugs clozapine and olanzapine upregulate bcl-2 mRNA and protein in rat frontal cortex and hippocampus. *Brain Res*, 2004, 1010, s. 81-86
15. Bardgett ME, Points M, Ramsey-Faulkner C, Topmiller J, Roflow J, McDaniel T, Lamontagne T, Griffith MS. The effects of clonidine on discrete-trial delayed spatial alternation in two rat models of memory loss. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33 (8), s. 1980-1991
16. Beaulieu JM and Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharm Rev*, 2011, 63, s. 182-217
17. Beninger RJ, Forsyth JK, Van Adel M, Reynolds JN, Boegman RJ, Jhamandas K. Subchronic MK-801 behavioural deficits in rats: partial reversal by the novel nitrate GT 1061. *Pharmacol Biochem Behav*, 2009, 91 (4), s. 495-502
18. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, 2000, 47, s. 351–354
19. Berridge CW, Schmeichel BE, España RA. Noradrenergic modulation of wakefulness/ arousal. *Sleep Med Rev*, 2012, 16 (2), s. 187-197

20. Berridge CW and Waterhouse BD. The locus coeruleus–noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev*, 2003, 42, s. 33–84
21. Bischoff C and Tiedtke PI. Competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists in spatial learning tasks. *Eur J Pharmacol*, 1992, 213 (2), s. 269-273
22. Boctor SY and Ferguson SA. Altered adult locomotor activity in rats from phencyclidine treatment on postnatal days 7, 9 and 11, but not repeated ketamine treatment on postnatal day 7. *Neurotoxicology*, 2010, 31, s. 42–54
23. von Bohlen und Halbach O and Dermietzel, R. Neurotransmitters and Neuromodulators. In: *Handbook of Receptors and Biological Effects*, 2nd Ed, 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, s. 123-132
24. Boksa P. Animal models of obstetric complications in relation to schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004, 45(1), s. 1-17
25. Boksa P. Of rats and schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*, 2007, 32 (1), s. 8-10
26. Boksa P and Luheshi GN. On the use of animal modeling to study maternal infection during pregnancy and prenatal cytokine exposure as risk factors for schizophrenia. *Clin Neurosci Res* 2003, 3, s. 339-346
27. Borovska J, Vyklicky V, Stastna E, Kapras V, Slavikova B, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L Jr. Access of inhibitory neurosteroids to the NMDA receptor. *Br J Pharmacol*, 2012, 166 (3), s. 1069-83
28. Borgkvist A, Malmlöf T, Feltmann K, Lindskog M, Schilström B. Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2012, 15 (4), s. 531-540
29. Bramham CR, Bacher-Svendsen K, Sarvey JM. LTP in the lateral perforant path is β -adrenergic receptor-dependent. *Neuroreport*, 1997, 8(3), s. 719-724

30. Brennan AR and Arnsten AF. Neuronal mechanisms underlying attention deficit hyperactivity disorder: the influence of arousal on prefrontal cortical function. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1129, s. 236-245
31. Broberg BV, Glenthøj BY, Dias R, Larsen DB, Olsen CK. Reversal of cognitive deficits by an ampakine (CX516) and sertindole in two animal models of schizophrenia – sub-chronic and early postnatal PCP treatment in attentional set-shifting. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009, 206, s. 631–640
32. Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, Vales K. Risperidone and ritanserin but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(3), s. 1061-1066
33. Burghardt NS, Park EH, Hen R, Fenton AA. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 2012, 22, s. 1795-1808
34. Bylund D. Alpha- and beta-adrenergic receptors: Ahlquist's landmark hypothesis of a single mediator with two receptors. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293, s. 1479-1481
35. Cahill L, Pham CA, Setlow B. Impaired memory consolidation in rats produced with beta-adrenergic blockade. *Neurobiol Learn Mem*, 2000, 74(3), s. 259-266
36. Cahill L and McGaugh JL. Modulation of memory storage. *Curr Opin Neurobiol*, 1996, 6 (2), s. 237–242
37. Calzada BC and De Artinano AA. Alpha-Adrenoceptor Subtypes. *Pharmacol Res*, 2001, 44, s. 196-208
38. Caramanos Z and Shapiro ML. Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behav Neurosci*, 1994, 108 (1), s. 30-43
39. Carlsson A, Lindquist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 1957, 180, s. 1200

40. Carlsson A and Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh.)*, 1963, 20, s. 140-144
41. Carlsson A, Waters N, Carlsson ML. Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications. *Biol Psychiatry*, 1999, 46 (10), s. 1388-1395
42. Carlsson A. A half century of neurotransmitter research: impact on neurology and psychiatry. *Nobel Lecture*, 2000, s. 303-322
43. Caspi A, Moffitt TE, Cannon M, McClay J, Murray R, Harrington H, Taylor A, Arseneault L, Williams B, Braithwaite A, Poulton R, Craig IW. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: Longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biol Psychiatry*, 2005, 57 (10), s. 1117-1127
44. Centonze D, Grande C, Saulle E, Martin AB, Gubellini P, Pavón N, Pisani A, Bernardi G, Moratalla R, Calabresi P. Distinct roles of D1 and D5 dopamine receptors in motor activity and striatal synaptic plasticity. *J Neurosci*, 2003, 23 (24), s. 8506-8512
45. Chadman KK, Watson DJ, Stanton ME. NMDA receptor antagonism impairs reversal learning in developing rats. *Behav Neurosci*, 2006, 120 (5), s. 1071-1083
46. Chen J, Lipska BK, Weinberger DR. Genetic mouse models of schizophrenia: from hypothesis-based to susceptibility gene-based models. *Biol Psychiatry*, 2006, 59, 1180-1188
47. Chéritat J, Taupignon A, Froux L, Morin S, Bouali-Benazzouz R, Naudet F, Kadiri N, Gross CE, Bioulac B, Benazzouz A. Inhibiting subthalamic D5 receptor constitutive activity alleviates abnormal electrical activity and reverses motor impairment in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2013, 33 (37), s. 14840-9
48. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience Letters*, 1985, 58 (3), s. 293-297

49. Cimadevilla JM, Fenton AA, Bures J. Functional inactivation of dorsal hippocampus impairs active place avoidance in rats. *Neurosci Lett*, 2000, 285(1), s. 53-56
50. Conti F, Minelli A, Debiasi S, Melone M. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol Neurobiol*, 1997, 14, s. 1-18
51. Copik AJ, Ma C, Kosaka A, Sahdeo S, Trane A, Ho H, Dietrich PS, Yu H, Ford AP, Button D, Milla ME. Facilitatory interplay in alpha 1a and beta 2 adrenoceptor function reveals a non-Gq signaling mode: implications for diversification of intracellular signal transduction. *Mol Pharmacol*, 2009, 75(3), s. 713-728
52. Crowe SF and Shaw S. Salbutamol overcomes the effect of the noradrenergic neurotoxin DSP-4 on memory function in the day-old chick. *Behav Pharmacol*, 1997, 8 (2-3), s. 216-222
53. Cukor J, Spitalnick J, Difede J, Rizzo A, Rothbaum BO. Emerging treatments for PTSD. *Clin Psychol Rev*, 2009, 29(8), s. 715-726
54. Dahlstroem A and Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand*, 1964, 232 (Suppl), s. 231-255
55. Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M. Dopamine, depression and antidepressants. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 2004, 18, s. 601-607
56. Decker MW, Gill TM, McGaugh JL. Concurrent muscarinic and beta-adrenergic blockade in rats impairs place-learning in a water maze and retention of inhibitory avoidance. *Brain Res*. 1990, 513(1), s. 81-85
57. Delekate A, Zagrebelsky M, Kramer S, Schwab ME and Korte M. NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108, s. 2569-2574
58. Dickenson AH. Amino Acids: Excitatory. In: *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function* (ed. by Webster, R.) John Wiley & Sons Ltd 2001, s. 211-223
59. Dickinson SL, Gadie B, Tulloch IF. Alpha 1- and alpha 2-adrenoreceptor antagonists differentially influence locomotor and stereotyped behaviour

induced by damphetamine and apomorphine in the rat. Psychopharmacology (Berl.), 1988, 96(4), s. 521-527

60. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. Pharmacological reviews, 1999, 51 (1), s. 7–61
61. D'Hooge R and De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res Rev, 2001, 36, s. 60-90
62. Dongsoo K. Practical use and risk of modafinil, a novel waking drug. Environ Health Toxicol, 2012, 27, e2012007
63. Egerton A, Reid L, McKerchar CE, Morris BJ, Pratt JA. Impairment in perceptual attentional set-shifting following PCP administration: a rodent model of set-shifting deficits in schizophrenia. Psychopharmacology (Berl), 2005, 179, s. 77–84
64. Eshel G, Ross SB, Kelder D, Edis LE, Jackson DM. Alpha 1 (but not alpha 2)- adrenoceptor agonists in combination with the dopamine D2 agonist quinpirole produce locomotor stimulation in dopamine-depleted mice. Pharmacol Toxicol, 1990, 67 (2), s. 123-131
65. Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. Involvement of alpha1-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. Eur J Pharmacol, 1999, 372 (1), s. 9-16
66. Finley C and Duty S. Therapeutic potential of targeting glutamate receptors in Parkinson disease. J Neural Transm, 2014, v tisku
67. Floresco SB. Prefrontal dopamine and behavioral flexibility: shifting from an "inverted-U" toward a family of functions. Front Neurosci, 2013, 7, s. 62
68. Freed WJ, Bing LA, Wyatt RJ. Effects of neuroleptics on phencyclidine (PCP)-induced locomotor stimulation in mice. Neuropharmacology, 1984, 23, s. 175–181
69. Fricks-Gleason AN and Marshall JF. Post-retrieval beta-adrenergic receptor blockade: effects on extinction and reconsolidation of cocaine-cue memories. Learn Mem, 2008, 15(9), s. 643-648
70. Fujishiro H, Umegaki H, Suzuki Y, Oohara-Kurotani S, Yamaguchi Y, Iguchi A. Dopamine D2 receptor plays a role in memory function: implications of

- dopamine-acetylcholine interaction in the ventral hippocampus. *Psychopharmacol* 2005;182, s. 253–261
71. Gasparini CF and Griffiths LR. The Biology of the Glutamatergic System and Potential Role in Migraine. *Int J Biomed Sci*, 2013, 9 (1), s. 1-8
 72. Gibb AJ. Neurotransmitter receptors. In: *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function* (ed. by Webster, R.) John Wiley & Sons Ltd 2001, s. 57-79
 73. Gibbs ME and Summers RJ. Role of adrenoceptor subtypes in memory consolidation. *Prog Neurobiol*, 2002, 67 (5), s. 345-391
 74. Gibbs, ME and Summers, RJ. Contrasting roles for beta1, beta2 and beta3-adrenoceptors in memory formation in the chick. *Neuroscience*, 2005, 131 (1), s. 31-42
 75. Giorgi FS, Pizzanelli C, Biagioni F, Murri L, Fornai F. The role of norepinephrine in epilepsy: from the bench to the bedside. *Neurosci Biobehav Rev*, 2004, 28 (5), s. 507-524
 76. Gliebus G and Lippa CF. The influence of beta-blockers on delayed memory function in people with cognitive impairment. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, 2007, 22(1), s. 57-61
 77. Gonzalez-Burgos G, Hashimoto T, Lewis DA. Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*, 2010, 12(4), s. 335-344
 78. Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*, 2003, 160, 636-645
 79. Gurden H, Takita M, Jay TM. Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *J Neurosci*, 2000, 20 (22), s. RC106
 80. Haller J, Makara GB, Pinter I, Gyertyan I, Egyed A. The mechanism of action of alpha 2 adrenoceptor blockers as revealed by effects on open field locomotion and escape reactions in the shuttle-box. *Psychopharmacology (Berl)*. 1997, 134(2), s. 107-114
 81. Harich S, Gross G, Bespalov A. Stimulation of the metabotropic glutamate 2/3 receptor attenuates social novelty discrimination deficits induced by

- neonatal phencyclidine treatment. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007, 192, s. 511–519
82. Harley CW. Norepinephrine and the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 2007, 163, s. 299-318
83. Harrison PJ and Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*, 2005, 10 (1), s. 40–68
84. Hasbi A, O'Dowd BF, George SR. Dopamine D1-D2 receptor heteromer signaling pathway in the brain: emerging physiological relevance. *Molecular Brain*, 2011, 4 (26), s. 1-6
85. Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous systém. *Keio J Med*, 1954, 3, s. 183-192
86. Haycock JW, van Buskirk R, McGaugh JL. Facilitation of retention performance in mice by posttraining diethyldithiocarbamate. *Pharmacol Biochem Behav*, 1976, 5, s. 525–528
87. Heal DJ. Phenylephrine-induced activity in mice as a model of central alpha 1-adrenoceptor function. Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs and electroconvulsive shock. *Neuropharmacology*, 1984, 23, s. 1241-1251
88. Heidbreder C. Selective antagonism at dopamine D3 receptors as a target for drug addiction pharmacotherapy: a review of preclinical evidence. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2008, 7 (5), s. 410-421
89. Hermann N, Lanctot KL, Khan LR. The role of norepinephrine in the behavioral and psychological symptoms of dementia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2004, 16 (3), s. 261-276
90. Heron C, Gould TJ, Bickford P. Acquisition of a runway motor learning task is impaired by a beta adrenergic antagonist in F344 rats. *Behav Brain Res*, 1996, 78(2), s. 235–241
91. Hertzmann M, Reba RC, Kotlyarov EV. Single photon emission computed tomography in phencyclidine and related drug abuse. *Am J Psychiatry*, 1990, 147 (2), s. 255–256

92. Hieble JP, Bondinell WE, Ruffolo RR Jr. α - and β -adrenoceptors: From the gene to the clinic. 1. Molecular biology and adrenoceptor subclassification. *J Med Chem*, 1995, 38 (19), s. 3415-3444
93. Hiraga Y and Iwasaki T. Effects of cholinergic and monoaminergic antagonists and tranquilizers upon spatial memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1984, 20(2), s. 205-207
94. Houslay MD. Arrestin times for developing antipsychotics and beta-blockers. *Sci Signal*, 2009, 2(66), pe22
95. Imaki J, Mae Y, Shimizu S, Ohno Y. Therapeutic potential of alpha2 adrenoceptor antagonism for antipsychotic-induced extrapyramidal motor disorders. *Neurosci Lett*, 2009, 454 (2), s. 143-147
96. Ishizuka K, Paek M, Kamiya A, Sawa A. A review of Disrupted-In-Schizophrenia-1 (DISC1): neurodevelopment, cognition, and mental conditions. *Biol Psychiatry*, 2006, 59, s. 1189-1197
97. Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, de Souza TM. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem*, 1998, 69(3), s. 219-224
98. Javitt DC. Negative schizophrenic symptomatology and the PCP (phencyclidine) model of schizophrenia. *The Hillside journal of clinical psychiatry*. 1987, 9 (1), s. 12–35
99. Javitt DC. Twenty-five Years of Glutamate in Schizophrenia: Are We There Yet? *Schizophrenia Bulletin*. 2012, 38 (5), s. 911-913
100. Javitt DC, Schoepp D, Kalivas PW, Volkow ND, Zarate C, Merchant K, Bear MF, Umbricht D, Hajos M, Potter WZ, Lee CM. Translating glutamate: from pathophysiology to treatment. *Sci Transl Med*, 2011, 3 (102), s. 1-29
101. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 1991, 148(10), s. 1301-1308
102. Javitt DC, Zukin SR, Heresco-Levy U, Umbricht D. Has an Angel Shown the Way? Etiological and Therapeutic Implications of the

- PCP/NMDA Model of Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 2012, 38 (5), s. 958-966
103. Jones CA, Watson DJG, Fone KCF. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(4), s. 1162-1194
104. Karlen A, Karlsson TE, Mattsson A, Lundströmer K, Codeluppi S, Pham TM, Bäckman CM, Ogren SO, Aberg E, Hoffman AF, Sherling MA, Lupica CR, Hoffer BJ, Spenger C, Josephson A, Brene S, Olson L. Nogo receptor 1 regulates formation of lasting memories. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106, s. 20476-20481
105. Kato E, Liptak L, Shujaa N, Matyus P, Gyires K, Ronai AZ. Alpha2B-adrenoceptor agonist ST-91 antagonizes beta2-adrenoceptor-mediated relaxation in rat mesenteric artery rings. *Eur J Pharmacol*, 2008, 580 (3), s. 361-365
106. Kelly A and Stanley CA. Disorders of glutamate metabolism. *MRRD Research Reviews*, 2001, 7, s. 287-295
107. Kenton L, Boon F, Cain DP. Combined but not individual administration of betaadrenergic and serotonergic antagonists impairs water maze acquisition in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2008, 33(6), s. 1298-1311
108. Kew JNC and Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*, 2005, 179, s. 4-29
109. Kim JE, Li S, GrandPr T, Qiu D, Strittmatter SM. Axon regeneration in young adult mice lacking Nogo-A/B. *Neuron*, 2003, 38, s. 187-199
110. Kimble DP and Kimble RJ. Hippocampectomy and response perseveration in the rat. *J Comp Physiol Psych*, 1965, 60.3, s. 474
111. Kloda A, Clements JD, Lewis RJ, Adams DJ. Adenosine triphosphate acts as both a competitive antagonist and a positive allosteric modulator at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol*, 2004, 65, s. 1386-1396

112. Kovács P and Hernádi I. Yohimbine acts as a putative in vivo alpha2A/D-antagonist in the rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett*, 2006, 402 (3), s. 253-258
113. Kubik S and Fenton AA. Behavioral evidence that segregation and representation are dissociable hippocampal functions. *J Neurosci*, 2005, 25, s. 9205-9212
114. Kubik S, Stuchlik A, Fenton AA. Evidence for hippocampal role in place avoidance other than merely memory storage. *Physiol Res*, 2006, 55 (4), s. 445-452
115. Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology*, 2001, 25, s. 455–467
116. Lalumiere RT, Nguyen LT, Mcgaugh JL. Post-training intrabasolateral amygdala infusions of dopamine modulate consolidation of inhibitory avoidance memory: involvement of noradrenergic and cholinergic systems. *Eur J Neurosci*, 2004, 20, s. 2804–2810
117. Langer SZ. Presynaptic regulation of cathecolamine release. *Biochem Pharmacol*, 1974, 23, s. 1793–1800
118. Lapidus KAB, Soleimani L, Murrough JW. Novel glutamatergic drugs for the treatment of mood disorders. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2013, 9, s. 1101-1112
119. Lee H, Dvorak D, Kao HY, Duffy AM, Scharfman HE, Fenton AA. Early cognitive experience prevents adult deficits in a neurodevelopmental schizophrenia model. *Neuron*, 2012, 75, s. 714-724
120. Lee H, Raiker SJ, Venkatesh K, Geary R, Robak LA, Zhang Y, Yeh HH, Shrager P, Giger RJ. Synaptic function for the Nogo-66 receptor NgR1: regulation of dendritic spine morphology and activity-dependent synaptic strength. *J Neurosci*, 2008, 28 (11), s. 2753–2765
121. Lee MC, Ting KK, Adams S, Brew BJ, Chung R, Guillemin GJ. Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *Plos One*, 2010, 5 (11), s. e14123

122. Levcik D, Stuchlik A and Klement D. Effect of Block of α 1-adrenoceptors on Overall Motor Activity but not on Spatial Cognition in the Object-Position Recognition Task. *Physiol Res*, 2013, 62, s. 561-567
123. Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(4), s. 312-324
124. LeWitt PA. Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. *Transl Neurodegener*, 2012, 1 (4), s. 1-4
125. Liao RM, Lai WS, Lin JY. The role of catecholamines in retention performance of a partially baited radial eight-arm maze for rats. *Chin J Physiol*, 2002, 45, s. 177-185
126. Liebscher T, Schnell L, Schnell D, Scholl J, Schneider R, Gullo M, Fouad K, Mir A, Rausch M, Kindler D, Hamers FP and Schwab ME. Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cordinjured rats. *Ann Neurol*, 2005, 58, s. 706-719
127. Lipska BK. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*, 2004, 29(4), s. 282-286
128. Lobellova V, Entlerova M, Svojanovska B, Hatalova H, Prokopova I, Petrasek T, Vales K, Kubik S, Fajnerova I, Stuchlik A. Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: a dose-response study. *Behav Brain Res*, 2013, 246, s. 55-62
129. Lopez-Gil X, Artigas F, Adell A. Unraveling monoamine receptors involved in the action of typical and atypical antipsychotics on glutamatergic and serotonergic transmission in prefrontal cortex. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(5), s. 502-515
130. Low CM and Wee KSL. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol Pharmacol*, 2010, 78 (1), s. 1-11
131. Marcotte ER, Pearson DM, Srivastava LK. Animal models of schizophrenia: a critical review. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 2001, 26 (5), s. 395-410
132. Maas S, Kawahara Y, Tamburro KM, Nishikura K. A-to-I RNA editing and human disease. *RNA Biol*, 2006, 3 (1), s. 1-9

133. Mansbach RS and Geyer MA. Parametric determinants in pre-stimulus modification of acoustic startle: interaction with ketamine. *Psychopharmacology (Berl)*, 1991, 105(2), s. 162-168
134. McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J Neurosci Res*, 2007, 85 (15), s. 3347-3358
135. McLamb RL, Williams LR, Nanry KP, Wilson WA, Tilson HA. MK-801 impedes the acquisition of a spatial memory task in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 1990, 37 (1), s. 41–45
136. McQuade R and Stanford SC. A microdialysis study of the noradrenergic response in rat frontal cortex and hypothalamus to a conditioned cue for aversive, naturalistic environmental stimuli. *Psychopharmacology*, 2000, 148 (2), s. 201-208
137. Meltzer HY and Sumiyoshi T. Does stimulation of 5-HT(1A) receptors improve cognition in schizophrenia? *Behav Brain Res*, 2008, 195(1), s. 98–102
138. Meyer U and Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog Neurobiol*, 2010, 90(3), s. 285-326
139. Milton AL, Lee JL, Everitt BJ. Reconsolidation of appetitive memories for both natural and drug reinforcement is dependent on {beta}-adrenergic receptors. *Learn Mem*, 2008, 15(2), s. 88-92
140. Miranda MA, Ferry B, Ferreira G. Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiol Learn Mem*, 2007, 88(2), s. 260–263
141. Misu Y and Kubo T. Presynaptic beta-adrenoceptors. *Med Res Rev*, 1986, 6 (2), s. 197-225
142. Mitchell HA and Weinshenker D. Good night and good luck: Norepinephrine in sleep pharmacology. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79 (6), s. 801-809
143. Mogilnicka E. Are beta- and alpha 2-adrenoceptors co-regulated during their stimulation? Behavioral studies. *Pol J Pharmacol Pharm*. 1986, 38(5-6), s. 521-528

144. Mogilnicka E and Nielsen M. Repeated treatment with clenbuterol produces desensitization of rat brain beta- and alpha 2-adrenoceptors without changes of alpha 1-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, 1986, 121(1), s. 107-111
145. Mony L, Kew JNC, Gunthorpe MJ, Paoletti P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 2009, 157 (8), s. 1301-1317
146. Moreno JL, Sealfon SC, González-Maesco J. Group II metabotropic glutamate receptors and schizophrenia. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66 (23), s. 3777-3785
147. Myhrer T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews*, 2003, 41, s. 268–287
148. Nazarian A, Christianson CA, Hua XY, Yaksh TL. Dexmedetomidine and ST-91 analgesia in the formalin model is mediated by alpha2A-adrenoceptors: a mechanism of action distinct from morphine. *Br J Pharmacol*, 2008, 155 (7), s. 1117-1126
149. Nicholas AP, Hökfelt T, Pieribone VA. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. *Trends Pharmacol Sci*, 1996, 17, s. 245-255
150. Niciu MJ, Ionescu DF, Richards EM, Zarate CA Jr. Glutamate and its receptors in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. *J Neural Transm*, 2013, December 8, v tisku
151. Nicniocail B and Gratton A. Medial prefrontal cortical alpha1 adrenoreceptor modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress in Long-Evans rats. *Psychopharmacol*, 2007, 191 (3), s. 835–842
152. Nilsson M, Carlsson A, Markinhuhta KR, Sonesson C, Pettersson F, Gullme M, Carlsson ML. The dopaminergic stabiliser ACR16 counteracts the behavioural primitivization induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 in mice: implications for cognition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2004, 28 (4), s. 677-685

153. Niswender CM and Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50: 295-322
154. O'Carroll CM, Martin SJ, Sandin J, Frenguelli B, Morris RG. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn Mem*, 2006, 13 (6), s. 760-769
155. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 1969, 164 (3880), s. 719-721
156. O'Neill MF, Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 1999, 145, s. 237-250
157. Packard MG and White NM. Memory facilitation produced by dopamine agonists: role of receptor subtype and mnemonic requirements. *Pharmacol Biochem Behav*, 1989, 33(3), s. 511-518
158. Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*, 2006, 313, s. 1141-1144
159. Pernet V and Schwab ME. The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell Tissue Res*, 2012, 349, s. 97-104
160. Petrasek T, Prokopova I, Bahnik S, Schonig K, Berger S, Vales K, Tews B, Schwab ME, Bartsch D, Stuchlik A. Nogo-A downregulation impairs place avoidance in the Carousel maze but not spatial memory in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem*, 2014, 107, s. 42-49
161. Phelps EA. Emotion and Cognition: Insights from Studies of the Human Amygdala. *Annu Rev Psychol*, 2006, 57, s. 27-53
162. Phillips WA and Silverstein SM. Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. *Behav Brain Sci*, 2003, 26, s. 65-82

163. Pichler R and Kobinger W. Alpha 2-adrenoceptor blocking properties of the alpha 1-selective agonist 2-(2-chloro-5-trifluoromethylphenylimino)imidazolidine (St 587). *Arzneimittelforschung*, 1985, 35 (1A), s. 201-205
164. Pizzanelli C, Lazzeri G, Fulceri F, Giorgi FS, Pasquali L, Cifelli G, Murri L, Fornai F. Lack of alpha 1b-adrenergic receptor protects against epileptic seizures. *Epilepsia*, 2009, 50 Suppl 1, s. 59-64
165. Poli A and Palermo-Neto J. Effects of d,l-propranolol on open field behavior of rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 1985, 86 (1-2), s. 153-155
166. Powell CM and Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry*, 2006, 59 (12), s. 1198-1207
167. Prokopová I. Noradrenalin a chování. *Cesk Fysiol*, 2010, 59 (2), s. 51-58
168. Puumala T and Sirviö J. Stimulation and blockade of alpha1 adrenoceptors affect behavioural activity, but not spatial working memory assessed by delayed nonmatching to position task in rats. *J Psychopharmacol*, 1997, 11(1), s. 45-51
169. Puumala T, Greijus S, Narinen K, Haapalinna A, Riekkinen P, Sirviö J. Stimulation of alpha-1 adrenergic receptors facilitates spatial learning in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 1998, 8(1), s. 17-26
170. Pussinen R and Sirviö J. Minor role for alpha1-adrenoceptors in the facilitation of induction and early maintenance of long-term potentiation in the CA1 field of the hippocampus. *J Neurosci Res*, 1998, 51(3), s. 309-315
171. Ramos, BP and Arnsten, AFT. Adrenergic pharmacology and cognition: Focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther*, 2007, 113 (3), s. 523-536
172. Ramos BP, Colgan L, Nou E, Ovadia S, Wilson SR, Arnsten AFT. The β -1 adrenergic antagonist, betaxolol, improves working memory performance in rats and monkeys. *Biol Psychiatry*. 2005, 58 (11), s. 894-900
173. Ratajczak P, Wozniak A, Nowakowska E. Animal models of schizophrenia: Developmental preparation in rats. *Acta Neurobiol Exp*, 2013, 73, s. 472-484

174. Riekkinen M, Jäkälä P, Kejonen K, Riekkinen P Jr. The alpha2 agonist, clonidine, improves spatial working performance in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 1999a, 92 (3), s. 983-989
175. Riekkinen M, Laakso MP, Jäkälä P. Clonidine impairs sustained attention and memory in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 1999b, 92 (3), s. 975-982
176. Riekkinen M, Stefanski R, Kuitunen J, Riekkinen P Jr. Effects of combined block of alpha 1-adrenoceptors and NMDA receptors on spatial and passive avoidance behavior in rats. *Eur J Pharmacol*, 1996, 300, s. 9-16
177. Rodriguez De Fonseca F, Gorriti MA, Bilbao A, Escuredo L, Garcia-Sequa LM, Piomelli D, Navarro M. Role of the endogenous cannabinoid system as a modulator of dopamine transmission: implications for Parkinson's disease and schizophrenia. *Neurotox Res*, 2001, 3 (1), s. 23-35
178. Rubin RP. A brief history of great discoveries in pharmacology: In celebration of the centennial anniversary of the founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacol Rev*, 2007, 59, s. 289-359
179. Ruffolo RR Jr., Bondinell WE, Hieble JP. α - and β -adrenoceptors: From the gene to the clinic. 2. Structure-activity relationships and therapeutic applications. *J Med Chem*, 1995, 38 (19), s. 3681-3716
180. Rung JP, Carlsson A, Rydén Markinhuhta K, Carlsson ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2005, 29(5), s. 827-832
181. Řiháček I, Souček M, Fráňa P. Betablokátory v léčbě kardiovaskulárních onemocnění. *Medicína pro praxi*, 2005, 2, s. 58-61
182. Saber AJ and Cain DP. Combined beta-adrenergic and cholinergic antagonism produces behavioral and cognitive impairments in the water maze: implications for Alzheimer disease and pharmacotherapy with beta-adrenergic antagonists. *Neuropsychopharmacology*. 2003, 28(7), s. 1247-1256

183. Sallinen J, Höglund I, Engström M, Lehtimäki J, Virtanen R, Sirviö J, Wurster S, Savola JM, Haapalinna A. Pharmacological characterization and CNS effects of a novel highly selective alpha2C-adrenoceptor antagonist JP-1302. *Br J Pharmacol*, 2007, 150 (4), s. 391-402
184. Sams-Dodd F, Lipska BK, Weinberger DR. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology*, 1997, 132, s. 303–310
185. Santangelo RM, Acker TM, Zimmerman SS, Katzman BM, Strong KL, Traynelis SF, Liotta DC. Novel NMDA Receptor Modulators: An Update. *Expert Opin Ther Pat*, 2012, 22 (11), s. 1337-1352
186. Sara, SJ. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10 (3), s. 211-223
187. Schmandke A and Schwab ME. Nogo-A: Multiple Roles in CNS Development, Maintenance, and Disease. *Neuroscientist*, 2014 Jan 8. [Epub ahead of print]
188. Schmeichel BE and Berridge CW. Wake-promoting actions of noradrenergic α 1 - and β -receptors within the lateral hypothalamic area. *Eur J Neurosci*, 2013, 37 (6), s. 891-900
189. Schwab ME. Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 2010, 11, s. 799-811
190. Sealfon SC and Olanow CW. Dopamine receptors: from structure to behavior. *Trends Neurosci*, 2000, 23 (10 Suppl), s. S34-40
191. Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, 1987, 1, s. 133-152
192. Seeman MV and Seeman P. Is schizophrenia a dopamine supersensitivity psychotic reaction? *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 48, s. 155-160
193. Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JC, Sacktor TC, Fenton AA. PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biol*, 2008, 6, s. 2698-2706

194. Shi YF and Yu YQ. The roles of glutamate in sleep and wakefulness. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2013, 42 (5), s. 583-590
195. Sibley DR. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1999, 39, s. 313-341
196. Singh PP, Junnarkar AY, Varma RK, Thomas GP, Tripathi RM. Effect of various hypotensive agents on locomotor activity and blood pressure of rats. Mater Med Pol, 1990, 22 (3), s. 176–178
197. Sirviö J and MacDonald E. Central α 1-adrenoceptors: Their role in the modulation of attention and memory formation. Pharmacol Therap, 1999, 83 (1), s. 49-65
198. Smythies J. Section III. The Norepinephrine System. Int Rev Neurobiol, 2005, 64, s. 173-211
199. Sneader W. Drug Discovery: A History. John Wiley & Sons Ltd, 2005, s. 157
200. Snyder SH, Taylor KM, Coyle JT, Meyerhoff JL. The role of brain dopamine in behavioral regulation and the actions of psychotropic drugs. Am J Psychiatry, 1970, 127, s. 199-207
201. Sokoloff P, Diaz J, Le Foll B, Guillen O, Leriche L, Bezard E, Gross C. The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2006, 5 (1), s. 25-43
202. Stanford, SC. Noradrenaline. In: Neurotransmitters, Drugs and Brain Function (ed. by Webster, R.) John Wiley & Sons Ltd 2001, 163-185
203. van der Staay FJ, Rutten K, Erb C, Blokland A. Effects of the cognition impairer MK- 801 on learning and memory in mice and rats. Behav Brain Res, 2011, 220 (1), s. 215-229
204. Stefani MR and Moghaddam B. Transient N-methyl-D-aspartate receptor blockade in early development causes lasting cognitive deficits relevant to schizophrenia. Biol Psychiatry, 2005, 57, s. 433–436
205. van Stegeren AH. The role of the noradrenergic system in emotional memory. Acta Psychol, 2008, 127 (3), s. 532–541

206. Steele RJ and Morris RG. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, 1999, 9 (2), s. 118-136
207. Stone TW. CNS neurotransmitters and neuromodulators: glutamate. Svazek 2, CRC Press, 1995
208. Straube T and Frey JU. Involvement of beta-adrenergic receptors in protein synthesis dependent late long-term potentiation (LTP) in the dentate gyrus of freelymoving rats: the critical role of the LTP induction strength. *Neuroscience*, 2003, 119(2), s. 473–479
209. Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. Dopamine D₂ receptors and alpha1-adrenoceptors synergistically modulate locomotion and behavior of rats in a place avoidance task. *Behav Brain Res*, 2008, 189 (1), s. 139-144
210. Stuchlik A, Petrasek T, Vales K. A dose-response study of the effects of pretest administration of beta-adrenergic receptor antagonist propranolol on the learning of active place avoidance, a spatial cognition task, in rats. *Behav Brain Res*, 2009, 200(1), s.144–149
211. Stuchlik A, Rehakova L, Rambousek L, Svoboda J, Vales K. Manipulation of D2 receptors with quinpirole and sulpiride affects locomotor activity before spatial behavior of rats in an active place avoidance task. *Neurosci Res*, 2007, 58 (2), s. 233–239
212. Stuchlik A, Rezacova L, Vales K, Bubenikova V, Kubik S. Application of a novel Active Allothetic Place Avoidance task (AAPA) in testing a pharmacological model of psychosis in rats: comparison with the Morris Water Maze. *Neurosci Lett* 2004, 366 (2), 162–166
213. Stuchlik A and Vales K. Systemic administration of MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist, elicits a behavioural deficit of rats in the Active Allothetic Place Avoidance (AAPA) task irrespectively of their intact spatial pretraining. *Behav Brain Res*, 2005, 159 (1), s. 163-171
214. Stuchlik A and Vales K. Effect of dopamine D₁ receptor antagonist SCH23390 and D₁ agonist A77636 on active allothetic place avoidance, a spatial cognition task. *Behav Brain Res*, 2006, 172 (2), s. 250-255

215. Stuchlik A and Vales K. Role of alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the regulation of locomotion and spatial behavior in the active place avoidance task: a dose- response study. *Neurosci Lett*, 2008, 433 (3), s.235-40
216. Sundaram RS, Gowtham L., Nayak BS. The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian J Pharm Clin Res*, 2012, 5 (2), s. 1-7
217. Szczurowska E and Mares P. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. Review. *Physiol Res*, 2013, 62 (Suppl.1), s. S21-S38
218. Takahashi H, Kato M, Takano H, Arakawa R, Okumura M, Otsuka T, Kodaka F, Hayashi M, Okubo Y, Ito H, Suhara T. Differential contributions of prefrontal and hippocampal dopamine D(1) and D(2) receptors in human cognitive functions. *J Neurosci*, 2008, 28 (46), s. 12032-8
219. Tamminga CA, Lahti AC, Medoff DR, Gao XM, Holcomb HH. Evaluating glutamatergic transmission in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 1003, s. 113–118
220. Tews B, Schönig K, Arzt ME, Clementi S, Rioult-Pedotti MS, Zemmar A, Berger S, Schneider M, Weinmann O, Kasper H, Schwab ME, Bartsch D. Synthetic miRNAMediated downregulation of Nogo-A in transgenic rats reveals its role as regulator of plasticity, learning and memory. *PNAS*, 2013, 110 (16), s. 6583-6588
221. Umehara M, Ago Y, Kawanai T, Fujita K, Hiramatsu N, Takuma K, Matsuda T. Methylphenidate and venlafaxine attenuate locomotion in spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention-deficit/hyperactivity disorder, through α 2-adrenoceptor activation. *Behav Pharmacol*, 2013, 24 (4), s. 328-331
222. Vafaei AA, Jezek K, Bures J, Fenton AA, Rashidy-Pour A. Post-training reversible inactivation of the rat's basolateral amygdala interferes with hippocampus-dependent place avoidance memory in a time-dependent manner. *Neurobiol Learn Mem*, 2007, 88(1), s. 87-93

223. Vales K, Bubenikova-Valesova V, Klement D, Stuchlik A. Analysis of sensitivity to MK-801 treatment in a novel active allothetic place avoidance task and in the working memory version of the Morris water maze reveals differences between Long-Evans and Wistar rats. *Neurosci Res*, 2006, 55(4), s. 383-388
224. Vales K, Svoboda J, Benkovicova K, Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A. The difference in effect of mGlu2/3 and mGlu5 receptor agonists on cognitive impairment induced by MK-801. *Eur J Pharmacol*, 2010, 639 (1-3), s. 91-98
225. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2000, 24, s. 125-132
226. Wadenberg ML, Hertel P, Fernholm R, Hygge Blakeman K, Ahlenius S, Svensson TH. Enhancement of antipsychotic-like effects by combined treatment with the alpha1- adrenoceptor antagonist prazosin and the dopamine D2 receptor antagonist raclopride in rats. *J Neural Transm*. 2000, 107(10), s. 1229-1238
227. Watkins JC and Jane DE. The glutamate story. *British Journal of Pharmacol*, 2006, 147, s. 100-108
228. Watson DJ and Stanton ME. Intrahippocampal administration of an NMDA-receptor antagonist impairs spatial discrimination reversal learning in weanling rats. *Neurobiol Learn Mem*, 2009a, 92(1), s. 89-98
229. Watson DJ and Stanton ME. Spatial discrimination reversal learning in weanling rats is impaired by striatal administration of an NMDA-receptor antagonist. *Learn Mem*, 2009b, 16(9), s. 564-572
230. Watson DJ and Stanton ME. Medial prefrontal administration of MK-801 impairs T-maze discrimination reversal learning in weanling rats. *Behav Brain Res*, 2009c, 205(1), s. 57-66
231. Webster RA. Dopamine (DA). In: *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function* (ed. by Webster, R.) John Wiley & Sons Ltd 2001, s. 137-161
232. Webster RA. Schizophrenia. In: *Neurotransmitters, Drugs and Brain Function* (ed. by Webster, R.) John Wiley & Sons Ltd 2001, s. 351-373

233. Wesierska M, Dockery C, Fenton AA. Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *J Neurosci*, 2005, 25 (9), s. 2413–2419
234. White FJ, Bednarz LM, Wachtel SR, Hjorth S, Brooderson RJ. Is stimulation of both D1 and D2 receptors necessary for the expression of dopamine mediated behaviors? *Pharmacol Biochem Behav*, 1988, 30, s. 189-193
235. Wiessner C, Bareyre FM, Allegrini PR, Mir AK, Frentzel S, Zurini M, Schnell L, Oertle T, Schwab ME. Anti-Nogo-A antibody infusion 24 hours after experimental stroke improved behavioral outcome and corticospinal plasticity in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23, s. 154-165
236. Wiley JL, Buhler KG, Lavecchia KL, Johnson KM. Pharmacological challenge reveals long-term effects of perinatal phencyclidine on delayed spatial alternation in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27 (5), s. 867–873
237. Willard SS and Koochekpour S. Glutamate, Glutamate Receptors, and Downstream Signaling Pathways. *Int J Biol Sci*, 2013, 9 (9), s. 948-959
238. Willi R, Aloy EM, Yee BK, Feldon J, Schwab ME. Behavioral characterization of mice lacking the neurite outgrowth inhibitor Nogo-A. *Genes Brain Behav*, 2009, 8, s. 181-192
239. Willi R, Weinmann O, Winter C, Klein J, Sohr R, Schnell L, Yee BK, Feldon J, Schwab ME. Constitutive genetic depletion of the growth regulator Nogo-A induces schizophrenia related endophenotypes. *J Neurosci*, 2010, 30, s. 556-567
240. Williams GV and Castner SA. Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience*, 2006, 139 (1), s. 263-276
241. Williams CL, Packard MG, McGaugh JL. Amphetamine facilitation of win-shift radialarm maze retention: the involvement of peripheral adrenergic and central dopaminergic systems. *Psychobiology*, 1994, 22, s. 141–148

242. Xu TX and Yao WD. D1 and D2 dopamine receptors in separate circuits cooperate to drive associative long-term potentiation in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107, s. 16366-16371
243. Yuen EY, Zhong P, Li X, Wei J, Yan Z. Restoration of glutamatergic transmission by dopamine D4 receptors in stressed animals. *J Biol Chem*, 2013, 288 (36), s. 26112-20
244. Zagrebelsky M, Schweigreiter R, Bandtlow CE, Schwab ME, Korte M. Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons. *J Neurosci*, 2010, 30, s. 13220-13234
245. Zörner B and Schwab ME. Anti-Nogo on the go: from animal models to a clinical trial. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1198 Suppl 1, E22-34

Internetové zdroje:

1. International Union of Basic and Clinical Pharmacology database, <http://www.iuphar-db.org/>, přístup 9.1.2013
2. Státní ústav pro kontrolu léčiv, www.sukl.cz, přístup 14.1.2014
3. Journals on the web, www.journal.prous.com, přístup 18.1.2014

Poznámka: Literatura použitá k vypracování jednotlivých publikovaných článků je kompletně uvedena v daných reprintech.

VII. Seznam publikovaných prací autorky

Primární práce

Petrasek T, Doulames V, Prokopova I, Vales K, Stuchlik A. Combined administration of alpha1-adrenoceptor antagonist prazosin and beta-blocker propranolol impairs spatial avoidance learning on a dry arena. Behav Brain Res, 2010, 208(2), s. 402-407, IF=3,393

Prokopova I, Bahnik S, Doulames V, Vales K, Petrasek T, Svoboda J, Stuchlik A. Synergistic effects of dopamine D2-like receptor antagonist sulpiride and β-blocker propranolol on learning in the carousel maze, a dry-land spatial navigation task. Pharmacol Biochem Behav, 2012, 102(1), s. 151-156, IF=2,532

Lobellova V, Entlerova M, Svojanovska B, Hatalova H, Prokopova I, Petrasek T, Vales K, Kubik S, Fajnerova I, Stuchlik A. Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia like behaviour induced by acute MK-801: a dose-response study. Behav Brain Res, 2013, 246, s. 55-62, IF=3,327

Petrasek T, Prokopova I, Bahnik S, Schonig K, Berger S, Vales K, Tews B, Schwab ME, Bartsch D, Stuchlik A. Nogo-A downregulation impairs place avoidance in the Carousel maze but not spatial memory in the Morris water maze. Neurobiol Learn Mem, 2014, 107, s. 42-49, IF=3,327

Přehledné články

Prokopová I. Noradrenaline and behavior. Cesk Fysiol, 2010, 59(2), s. 51-58

Stuchlik A, Petrasek T, Prokopova I, Holubova K, Hatalova H, Vales K, Kubik S, Dockery C, Wesierska M. Place avoidance tasks as tools in the behavioral neuroscience of learning and memory. Physiol Res, 2013, 62 (Suppl 1), S1-S19, IF=1,531

Doplňující publikace

Petrasek T, Prokopova I, Sladek M, Weissova K, Vojtechova I, Bahnik S, Zemanova A, Schönig K, Berger S, Tews B, Bartsch D, Schwab ME, Sumova A, Stuchlik A. Nogo-A-deficient Transgenic Rats Show Deficits in Higher Cognitive Functions, Decreased Anxiety, and Altered Circadian Activity Patterns. *Front Behav Neurosci*, 2014, 8 (90), s. 1-15, IF=4,758

Rulcova A, Prokopova I, Krausova L, Bitman M, Vrzal R, Dvorak Z, Blahos J, Pavek P. Stereoselective interactions of warfarin enantiomers with the pregnane X nuclear receptor in gene regulation of major drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(12), s. 2708-2717, IF=5,439