

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Studium dlouhodobého vlivu zvýšení GABAergní inhibice
v perinatálním období na vývoj habituace u laboratorních
potkanů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Štěpánka Čejková

Obor studia: Zájmové chovy zvířat

Vedoucí práce: Ing. Jiří Šichtař, Ph.D.

Konzultant práce: doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Studium dlouhodobého vlivu zvýšení GABAergní inhibice v perinatálním období na vývoj habituace u laboratorních potkanů " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Haně Kubové, PharmDr., DrSc. za možnost provedení této diplomové práce na oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Děkuji jí za odborné vedení práce, zpřístupnění vědecké literatury a poskytnutí nezbytných znalostí o dané problematice. Nemenší poděkování patří paní RNDr. Nině Mikulecké, Ph.D. za pomoc při provádění experimentální části této práce v behaviorální laboratoři a při zhodnocení dosažených výsledků. Za pomoc při práci s laboratorními zvířaty děkuji rovněž ostatním zaměstnancům oddělení vývojové epileptologie. Poděkování patří také Ing. Jiřímu Šichtařovi, Ph.D. za pomoc s formální úpravou práce. Velké poděkování patří samozřejmě mojí rodině, příteli a blízkým za jejich podporu při psaní této práce. Rodičům moc děkuji za to, že mi umožnili studium na vysoké škole.

Studium dlouhodobého vlivu zvýšení GABAergní inhibice v perinatálním období na vývoj habituace u laboratorních potkanů

Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo experimentální ověření hypotézy, že farmakologické zvýšení GABAergní inhibice v perinatálním období ovlivní vývoj habituace spolu s dalšími prvky emocionálního chování (anxiety) u laboratorních potkanů.

Pro tento účel bylo použito samců laboratorních potkanů kmene Wistar, kterým byl v perinatálním období po dobu 5 po sobě jdoucích dní (P7 – P11) podán klonazepam (CZP, látka ze skupiny benzodiazepinů). Aplikace látky byla provedena intraperitoneálně v množství 1 mg/kg/den. Polovině testovaných zvířat byl podán CZP, druhé polovině zvířat byl aplikován fyziologický roztok ve stejném množství. Testování habituace jako nejjednodušší formy učení a anxiety (úzkosti), probíhalo v behaviorálním testu otevřeného pole (open field test). Testování začínalo 21. den postnatálního věku potkanů (P21) a probíhalo do věku P45. Experiment probíhal vždy 4 po sobě jdoucí dny v 15 minutových sezeních, poté následovala 3 denní pauza. Pro testování byly použity dvě velikostní modifikace OF arény v souvislosti se stářím pokusných zvířat. Pohyb zvířat v OF aréně byl nahráván kamerovým systémem a následně vyhodnocován příslušným programem. Sledované parametry zahrnovaly celkovou uběhnutou vzdálenost v aréně OF jako ukazatel habituace, délku setrvání zvířete v centru arény a dobu latence k prvnímu vstupu do centrální oblasti OF jako ukazatel anxiety. Získané údaje byly vyhodnoceny příslušnými statistickými testy.

Benzodiazepiny patří mezi léky, které mají širokou možnost využití, mimo jiné jsou také používány při léčbě epilepsie. Díky jejich vlastnostem se používají u všech věkových skupin pacientů (včetně novorozenců) a jsou také předepisovány těhotným ženám. Klinické a experimentální studie naznačují, že zde existuje jisté riziko v souvislosti s opakovaným podáváním benzodiazepinů během prenatálního, nebo časně postnatálního období v oblasti vývoje mozku a chování. Antiepileptika obecně mají vliv na vývoj mozku prostřednictvím ovlivnění buněčné proliferace, neurogeneze, migrace, neuronální apoptózy, synaptogeneze apod. Mimo jiné ovlivňují další vývoj prostřednictvím jejich působení na neurotransmitery, zejména GABA, jejíž jsou agonisté a zvyšují inhibici v CNS.

Výsledky této studie neukázaly zhoršené učení (zhoršenou habituaci) u potkanů, kteří byli perinatálně ovlivněni CZP. Anxiolytický efekt BZD nebyl rovněž statisticky prokázán. Patrná byla ovšem určitá tendence CZP zvířat projevovat chování spojené se sníženou úzkostí (vyšší aktivita a delší pobyty v centru OF při prvním umístění do neznámého prostředí apod.).

Klíčová slova: habituace, anxiety, vývoj, potkan, open field, GABAergní inhibice, benzodiazepin

Effects of augmentation of GABAergic inhibition on the development of habituation in immature rats: longitudinal study

Summary

The objective of this dissertation has been to experimentally verify the hypothesis that the pharmacological augmentation of GABA inhibition in the perinatal period influences the development of habituation along with other elements of emotional behaviour (anxiety) in laboratory rats. Male laboratory rats of the Wistar breed, which were administered clonazepam (CZP, a substance from the benzodiazepine group) on 5 consecutive days (P7 – P11) in the perinatal period, were used for this purpose. The application of the substance was undertaken intraperitoneally at the amount of 1mg/kg/day. Half the test animals were given CZP, while the second half of the animals were administered a physiological solution at the same amount. The testing of the habituation as the simplest form of learning and anxiety took place in behavioural open field behavioural tests. The testing commenced on the 21st day of the rats' postnatal age (P21) and continued until they reached the age of P45. The experiment always took place on 4 consecutive days in 15 minute sessions followed by a 3-day break. Two size modifications of the OF arena were used for the testing depending on the age of the test animals. The movements of the animals in the OF arena were recorded using a camera system and subsequently evaluated using the appropriate program. The monitored parameters included the total distance run in the OF arena as an indicator of the habituation, the amount of time which the animal spent in the centre of the arena and the latency period prior to the first entry into the central area of the OF arena as an anxiety indicator. The ascertained information was evaluated using the appropriate statistical tests.

Benzodiazepines belong to a group of medicines with a wide range of uses, including during the treatment of epilepsy. Thanks to their properties, they are used in all patient age groups (including newborns) and are also prescribed to pregnant women. Clinical and experimental studies have indicated that a certain risk exists in the area of cerebral and behavioural development in association with the repeated administration of benzodiazepines during the prenatal or postnatal period. Antiepileptic drugs generally influence the development of the brain by influencing cell proliferation, neurogenesis, migration, neuronal apoptosis and synaptogenesis etc. Amongst other things, they also influence further development by acting on neurotransmitters, especially GABA, which are agonists and increase inhibition in CNS.

The results of the study did not show any reduced learning (reduced habituation) in the rats which were perinatally influenced by the CZP. The anxiolytic effect of BZD was also not statistically proven. There was, however, a certain tendency of the CZP animals to manifest behaviour associated with reduced anxiety (greater activity and a longer stay in the centre of the OF during the initial placement in an unknown environment and so on).

Keywords: habituation, anxiety, development, rat, open field, GABAergic inhibition, benzodiazepin

Obsah

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Úvod | 1 |
| 2 | Vědecká hypotéza a cíle práce | 2 |
| 3 | Literární rešerše | 3 |
| 3.1 | Laboratorní potkan (<i>Rattus norvegicus</i>) | 3 |
| 3.2 | Vývoj (ontogeneze) | 3 |
| 3.2.1 | Období ve vývoji | 3 |
| 3.2.2 | Vývoj mozku a nervové soustavy | 4 |
| 3.2.3 | Srovnání s vývojem člověka | 6 |
| 3.2.4 | Porovnání věku potkana a člověka | 8 |
| 3.3 | Explorační chování a chování spojené s úzkostí | 11 |
| 3.4 | Habituace | 13 |
| 3.4.1 | Charakteristika | 13 |
| 3.4.2 | Vývoj habituace..... | 14 |
| 3.4.3 | Habituace intra- a intersession | 15 |
| 3.5 | Open field test (test otevřeného pole) | 17 |
| 3.6 | Benzodiazepiny | 19 |
| 3.6.1 | Obecné informace (využití, nežádoucí reakce)..... | 19 |
| 3.6.2 | Farmakologická charakteristika (farmakodynamika, farmakokinetika) ... | 20 |
| 3.6.3 | Specifické benzodiazepinové receptory | 21 |
| 3.6.4 | Působení na nezralý mozek | 23 |
| 3.6.5 | Klonazepam..... | 25 |
| 3.7 | GABAergní neurotransmise | 27 |
| 3.7.1 | GABAergní systém | 27 |
| 3.7.2 | GABAergní receptory | 28 |
| 3.7.3 | GABA _A receptor | 28 |
| 3.7.4 | Funkce GABA _A receptoru | 30 |
| 3.7.5 | Změny v průběhu vývoje..... | 31 |
| 4 | Metodika | 33 |
| 4.1 | Experimentální zvířata | 33 |
| 4.2 | Aplikace klonazepamu | 33 |
| 4.3 | Postup testování | 34 |
| 4.4 | Sledované ukazatele | 35 |
| 4.5 | Statistická analýza | 37 |
| 5 | Výsledky | 38 |
| 5.1 | Vliv BZP na hmotnostní přírůstky zvířat | 38 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.2 | Celková vzdálenost („distance moved“) | 39 |
| 5.2.1 | Habituace intersession..... | 39 |
| 5.2.2 | Habituace intrasession..... | 40 |
| 5.3 | Doba strávená v centru OF | 44 |
| 5.3.1 | Hodnocení mezi jednotlivými sezeními | 44 |
| 5.3.2 | Hodnocení v rámci sezení | 45 |
| 5.4 | Doba latence k prvnímu vstupu do centra OF | 48 |
| 6 | Diskuze | 49 |
| 7 | Závěr | 53 |
| 8 | Literatura | 54 |
| 9 | Seznam použitých zkratk a symbolů | 59 |

1 Úvod

Benzodiazepiny (BZD) jsou psychotropní látky, které jsou od svého zavedení r. 1960 používány i k léčbě epilepsie a epileptických stavů (Haefely 1989), patří tedy mezi skupinu léčiv označovaných jako antiepileptika (AED) (Turski & Ikonomidou 2012). BZD působí prostřednictvím kyseliny gama - aminomáselné (GABA), nejdůležitějšího inhibičního neurotransmiteru v savčí CNS, jako agonisté GABA_A receptorů (Haefely 1989). Glutamát a GABA jsou hlavní neurotransmitery v mozku savců, které regulují vývoj mozku na molekulární, buněčné a systémové úrovni. Sedativní, anestetické a antiepileptické léky s těmito neurotransmitery interagují a mohou vývoj značně ovlivnit (Turski & Ikonomidou 2012).

BZD se používají obecně v široké škále lékařských indikací a u všech věkových skupin pacientů, včetně novorozenců (Kubová et al. 2018). Klinické výhody těchto léků zahrnují rychlý nástup účinku, vysokou účinnost a minimální toxicitu. Mají široké spektrum klinické aktivity a mohou být podávány několika způsoby (Riss et al. 2008). Zjištění účinků časně expozice BZD na vývoj mozku má velký význam z důvodu použití těchto látek u pediatrických pacientů. Studie na hlodavcích prokázaly, že expozice BZD během vývoje mozku vedla k trvalé změně funkce mozku, změně chování a kognitivních deficitů (Kubová et al. 2018). Antiepileptika obecně mají vliv na vývoj mozku prostřednictvím ovlivnění buněčné proliferace, neurogeneze, migrace, neuronální apoptózy, synaptogeneze apod. ve vyvíjejícím se mozku. Kritickým obdobím vysoké zranitelnosti mozku vůči BZD je období růstu mozku (Turski & Ikonomidou 2012). Několik studií prokázalo, že časná postnatální léčba agonisty GABA je spojena s poruchou učení a paměti. Agonisté GABA způsobují také podstatnou neuroapoptózu ve vyvíjejícím se mozku potkanů (Bittigau et al. 2002; Kaindl et al. 2006; Stefovská et al. 2008). Mohou mít také nepříznivé účinky na lidský intelekt (Bittigau et al. 2002). I když jsou benzodiazepiny jednou z nejčastěji předepisovaných skupin anxiolytických léčiv těhotným ženám, mohou mít také nežádoucí účinky na plod (Iqbal et al. 2002). Proto se dnes se spekuluje o vhodnosti používání některých BZD těhotnými ženami, kojenci a dětmi (Turski & Ikonomidou 2012).

V této diplomové práci jsme se zaměřili na látku ze skupiny benzodiazepinů - klonazepam (CZP). Předchozí studie ukázaly, že je to látka, která vykazuje značné antikonvulzivní a anxiolytické účinky u mladých potkanů v kojeneckém věku (Kubová & Mareš 1989; Mikulecká et al. 2011), zároveň ale časně podávání těchto látek vede ke změně. Z tohoto vyplývá trvalá změna kognitivních funkcí a sociálního chování u zvířat, která byla léčbě klonazepamu vystavena (Mikulecká et al. 2014a, b). Rozhodli jsme se proto otestovat vliv časně podávání CZP na neasociativní paměť a emocionální chování laboratorních potkanů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo v experimentální studii ověřit hypotézu, že farmakologické zvýšení GABAergní inhibice v perinatálním období dlouhodobě ovlivní vývoj neasociativní paměti a emocionální chování u laboratorních potkanů.

H1: Farmakologické zvýšení GABAergní inhibice v průběhu perinatálního období vede k ovlivnění vývoje habituace jako neasociativní formy učení a paměti u mláďat laboratorního potkana.

H2: Spolu s habituací bude ovlivněno emocionální chování zvířat (anxieta) při vystavení zvířat neznámému prostředí.

3 Literární rešerše

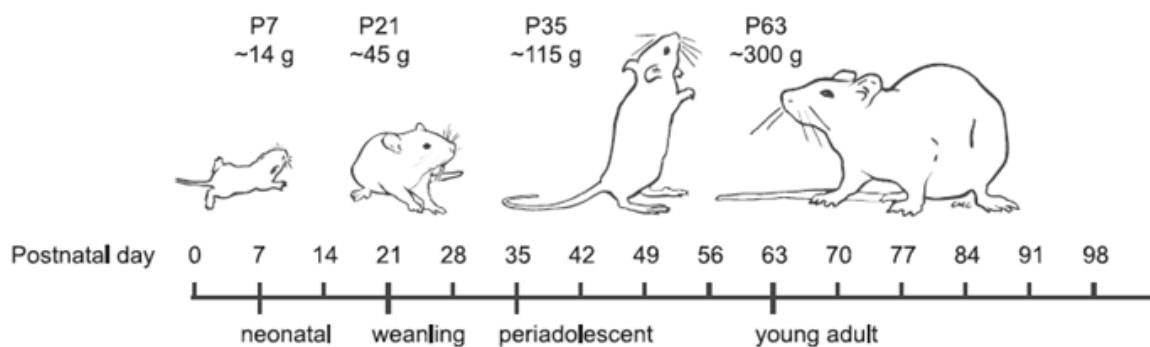
3.1 Laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*)

Laboratorní potkan je jedním z nejčastěji používaných druhů zvířat ve výzkumu a své prvenství má i mezi hlodavci, kteří tvoří téměř 80 % experimentálních zvířat (Sengupta 2013). Z velké části je to kvůli jejich malým rozměrům, nižším nákladům na odchov a chovné prostředí, vysoké reprodukční rychlosti a velikosti vrhu. V experimentech se také mohou použít ve větším počtu a při invazivnějších metodách výzkumu (Makowska & Weary 2013). Jako nejvýznamnější savčí modelový organismus má význam pro řadu biomedicínských výzkumů, široké využití nachází například v toxikologii, teratologii, experimentální onkologii, experimentální gerontologii, v kardiovaskulárním výzkumu, imunologii, imunogenetice, zubním výzkumu a experimentální parazitologii (Sengupta 2013). Své místo má také v oblasti psychologie při studiu duševních (mentálních) procesů, včetně emocí. (Makowska & Weary 2013). Je také nejpoužívanějším laboratorním savcem při studiu chování, kdy není příliš vhodné použití myši (Sengupta 2013).

3.2 Vývoj (ontogeneze)

3.2.1 Období ve vývoji

Mláďata potkanů se rodí po krátké gestaci (22,5 dne), jsou altriciální, což znamená, že se rodí na nízkém stupni vývoje, při narození jsou slepá, holá a mnoho neurogenických změn nastává až postnatálně (Clancy et al. 2007). Časné postnatální období je charakterizováno velkou plasticitou s tzv. kritickými okny, ve kterých může být jakýkoli zásah schopen ovlivnit jak pozitivně, tak nepříznivě další růst a vývoj. Po narození se potkani dostávají do tzv. "presuckling periody" (počátečních 6 hodin ukončené prvním ošetřováním), charakterizované přechodem z plodové vody do ovzduší, změnami teploty okolí, ukončením placentární výživy a oxidačním stresem. Po této etapě nastává období kojení a mláďata začínají konzumovat mléko svých matek. Spotřeba mléka kulminuje ve věku P15, pak klesá a končí ve věku P28. Konec období kojení a nástup fyziologického odstavu je určen okamžikem, kdy mláďata poprvé konzumují tuhou potravu společně s mlékem (P17). Ve věku P19 se objevuje první příjem pitné vody. Období odstavu končí poslední konzumací mateřského mléka ve věku P28 (Ošřádalová & Babický 2012). Vývojový profil potkana je zobrazen na obrázku č. 1. Po období odstavu (zde značen jako časný odstav ve věku P21) dochází k sexuálnímu zrání zvířat. Sexuální zralost je obecně zahájena tzv. otevřením vaginálního ústí u samic, a separací předkožky u samců. Tento jev pozorujeme u samic potkanů přibližně ve věku P32 - P34. U samců k tomu dochází mnohem později, většinou v rozmezí P45 – P48. Věk, ve kterém samec dosáhne pohlavní zralosti je ovšem velmi variabilní a může se pohybovat v rozmezí P40 - P76. Pohlavní zralost sama o sobě neznamena začátek dospělosti, ale spíše začátek adolescence. Dospělost začíná u potkanů 8 týdnů po narození, ve věku P63 (McCutcheon & Marinelli 2009).



Tělesná hmotnost potkanů se výrazně mění během prvních 2 postnatálních měsíců života. Samci potkanů váží přibližně 14g ve věku 7 dnů (P7), 45g v období odstavu (P21), 115g v období adolescence (P35) a 300g v rané dospělosti (>P63). Většina *ex vivo* studií se provádí během tohoto období rychlého růstu spíše, než u plně dospělých zvířat.

Obrázek 1: Vývojová stádia potkana spolu s orientační vahou zvířat v každém období (McCutcheon & Marinelli 2009).

3.2.2 Vývoj mozku a nervové soustavy

Během ontogeneze se odehrává značné množství vývojových procesů nutných k tomu, aby se z embrya stal dospělý jedinec (McCutcheon & Marinelli 2009). Četné studie dokazují, že vývoj mozku není zdaleka ukončen při narození, ale pokračuje během dětství, po celou dobu adolescence až do období dospělosti (Counotte et al. 2011). Některé změny se uskutečňují postupně, jiné vznikají náhle a mají různé trajektorie (McCutcheon & Marinelli 2009). Existuje obecné poznání, že vyvíjející se nervový systém je kvalitativně odlišný od nervového systému dospělých zvířat (Rice & Barone 2000). Nemůžeme proto tvrdit, že vyvíjející se mozek je v podstatě malý dospělý mozek (Dehorter et al. 2012). Díky této skutečnosti je při provádění experimentů důležité pracovat se stářím zvířete a jeho věkem jako s důležitým faktorem (McCutcheon & Marinelli 2009). Navzdory změnám v míře růstu mozku u savců je možné provést srovnání vývoje mozku mezi druhy (Turski & Ikonomidou 2012).

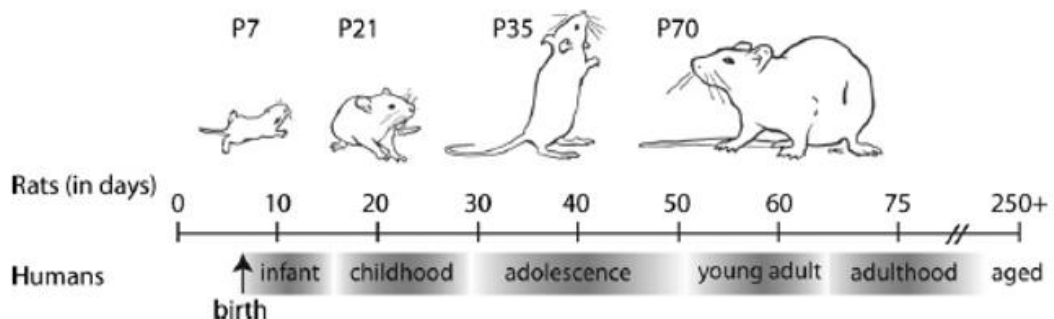
Samotný vývoj mozku a nervového systému je velice pozoruhodný proces. V embryonální fázi vývoje dochází nejprve k tvorbě neuronových progenitorových buněk. Tyto buňky později diferencují a migrují na své konečné umístění (Andersen 2003). Neurony vznikají většinou dříve, gliové buňky později (Squire et al. 2008). Jakmile se neurony dostanou na cílové místo, začne docházet ke tvorbě spojení. Migraci neuronů ovlivňuje řada faktorů, jako například nervový růstový faktor (NGF). Exprese růstových faktorů dosáhne své nejvyšší úrovně v prenatalním období, protože neurony poprvé vytvářejí synaptické kontakty, a opět narůstá v rámci různých oblastí mozku v průběhu postnatálního vývoje u potkanů. Růstové faktory hrají mimo jiné roli v synaptické plasticitě po celou dobu života a jsou nedílnou součástí neuronových změn spojených s učením, účinkem léčiv, nebo nervovým poškozením, například při úrazech (Andersen 2003). Základem pro vznik nervového systému je proces neurulace, tedy vznik neurální lišty a později nervové trubice. Nervový systém vzniká z ektodermální tkáně, ze které se druhotně diferencuje také epidermis. Neurulace je velmi náročný proces, kdy sebemenší chyba může znamenat rozsáhlé vývojové vady (Squire

et al. 2008). Notochord (struna hřbetní) definuje primitivní osu embrya a bude začleněna do obratlového systému. Notochord indukuje nad ním uložený ektoderm (překrývající se ektodermální tkáň), aby se vyvinul v neurální ploténku. Neurální ploténka invaginuje podél své centrální osy, aby vytvořila neurální brázdičku s neurálními záhyby (valy) na každé straně. Neurální záhyby poté srostou a vytvoří neurální trubici v blízkosti předního konce notochordu; tato fúze probíhá jak kraniálně, tak kaudálně způsobem podobným zipu. Jakmile vznikne neurální trubice, populace buněk se od povrchu ektodermu odděluje na vrcholu nervových záhybů, čímž vznikne neurální lišta. Z buněk neurální lišty vzniknou například sensorická ganglia hlavových nervů, spinální ganglia a ganglia autonomních nervů, Schwannovy buňky (buňky pokrývající periferní nervy) a mozkové a míšní pleny (Rice & Barone 2000). Při vývoji rovněž dochází k větvení axonů a dendritů, čímž vytvářejí důležitá synaptická spojení, která tvoří prostor pro kódování informací potenciálně po zbytek života (Andersen 2003). Zpočátku jsou synaptická spojení nervových buněk nadbytečná a hladina receptorů se zvyšuje. V průběhu dalšího vývoje dochází na základě neuronální aktivity v rámci tzv. „activity dependent processes“ k postupnému vytváření funkčních neuronálních sítí (Counotte et al. 2011). Jakmile nastane počáteční fáze tvorby neuronálních spojení, přibližně 50 % všech neuronů je eliminováno během období bezprostředně před narozením, a to procesem známým jako programovaná buněčná smrt neboli apoptóza. Během tohoto období dochází k dramatickému morfologickému přeskupení s cílem zvýšit efektivitu synaptického přenosu. Druhá vlna zvýšené tvorby neuronálních spojů a eliminace neuronů nastává během periadolescence (Andersen 2003). Během adolescence se také zvyšuje myelinizace axonů a tím i rychlost přenosu. Dlouhé spoje mezi různými oblastmi mozku jsou ještě nezralé a crosstalk mezi těmito oblastmi musí dosáhnout konečně rovnováhy. Mozek adolescentů se tedy funkčně liší od mozku dospělých jedinců a je nutno podotknout, že období adolescence hraje v celkovém vývoji podstatnou roli (Counotte et al. 2011). Jednotlivé oblasti mozku dozrávají podle různých časových schémat. Mezi později se vyvíjející struktury patří například kůra, hipokampus a mozeček (Andersen 2003). Struktury zadního mozku se tedy vyvíjejí dříve než struktury předního mozku a mediální struktury rovněž zrají dříve než laterální (Rice & Barone 2000). V rámci jednotlivých oblastí mozku se také subpopulace neuronů vyvíjejí odlišně. Purkyňovi buňky, které se nacházejí v kůře mozečku se například vyvíjejí brzy, a to 13. – 15. embryonální den u potkanů a v rozmezí 5. – 7. týdne u lidí. Granulární buňky kůry mozečku se tvoří mnohem později, a to 4. – 19. postnatální den u potkanů a 24. – 40. týden těhotenství u lidí (Kaindl et al. 2006).

V CNS jsou struktury budovány proliferací buněk, migrací a sekvencí kroků nazývaných diferenciací. Normální funkce vyžaduje specifický počet buněk s odpovídajícími vlastnostmi na správném místě. Migrace buněk umožňuje, aby neurony dosáhly své konečné lokality, kde mezi sebou vytvoří fyzický kontakt a vytvoří složité obvody. Spojení probíhá prostřednictvím procesu synaptogeneze. Vývojové období synaptogeneze je kritické pro tvorbu základních neuronálních okruhů, i když neurony jsou schopny vytvářet nové synapse po celý život (Turski & Ikonomidou 2012). Neurotransmitery modulují proliferaci nervových kmenových buněk, neuroblastů a glioblastů, regulují migraci a indukují diferenciaci. Farmakologické látky, které interferují s neurotransmisí během vývoje, mohou způsobit trvalé defekty v CNS. Apoptóza (zmněná výše) je regulována růstovými faktory a cytokiny stejně jako neurotransmitery a je prováděna řadou intracelulárních proteinů. Jakákoli látka, která

zasahuje do těchto procesů, může tempo apoptózy ovlivnit (Kaindl et al. 2006). Apoptóza nastává v mozku potkanů mezi postnatálním dnem P0 a P3 v subkortikálních strukturách (př. hipokampus a talamus), v neokortikálních oblastech ve věku P3 až P7, poté postupně klesá a končí ve věku P21. Mezi látky, které mohou apoptózu neuronů ve vyvíjejícím se mozku zvýšit, patří mimo jiné agonisté receptorů GABA_A, a to například barbituráty, benzodiazepiny a alkohol (Stefovska et al. 2008). Mnoho látek, jako je například tolik známé rentgenové záření, způsobuje poškození mozku tím, že zasahuje do proliferace buněk (Kaindl et al. 2006). Období nejvýraznějšího růstu mozku nastává u různých živočišných druhů v různých fázích vývoje. U potkanů a myši se vyskytuje postnatálně, u lidí nastává od šestého měsíce těhotenství a trvá několik let po narození (Stefovska et al. 2008). Kaindl et al. (2006) uvádí, že u potkanů toto období představuje první 2 postnatální týdny, zatímco u lidí je to třetí trimestr těhotenství a první dva roky života (Kaindl et al. 2006). Pro správný vývoj mozku je nutná souhra řady faktorů a správná stimulace neurotransmiterů. Jako příklad můžeme uvést dopamin a serotonin, neurotransmitery, které jsou zapojené do počátečního vývoje (rozdělení neuroblastů, migrace buněk a tvorba synapsí). Například dopamin zvyšuje neuronální větvení a růst prostřednictvím receptorů D2 (Andersen 2003). Dalším neurotransmitterem, který ovlivňuje vývoj je GABA, o které bude pojednáváno v další kapitole této diplomové práce.

3.2.3 Srovnání s vývojem člověka



Obrázek 2: Relativní srovnání věku potkana s vývojovými stádii vývoje lidského mozku (Counotte et al. 2011).

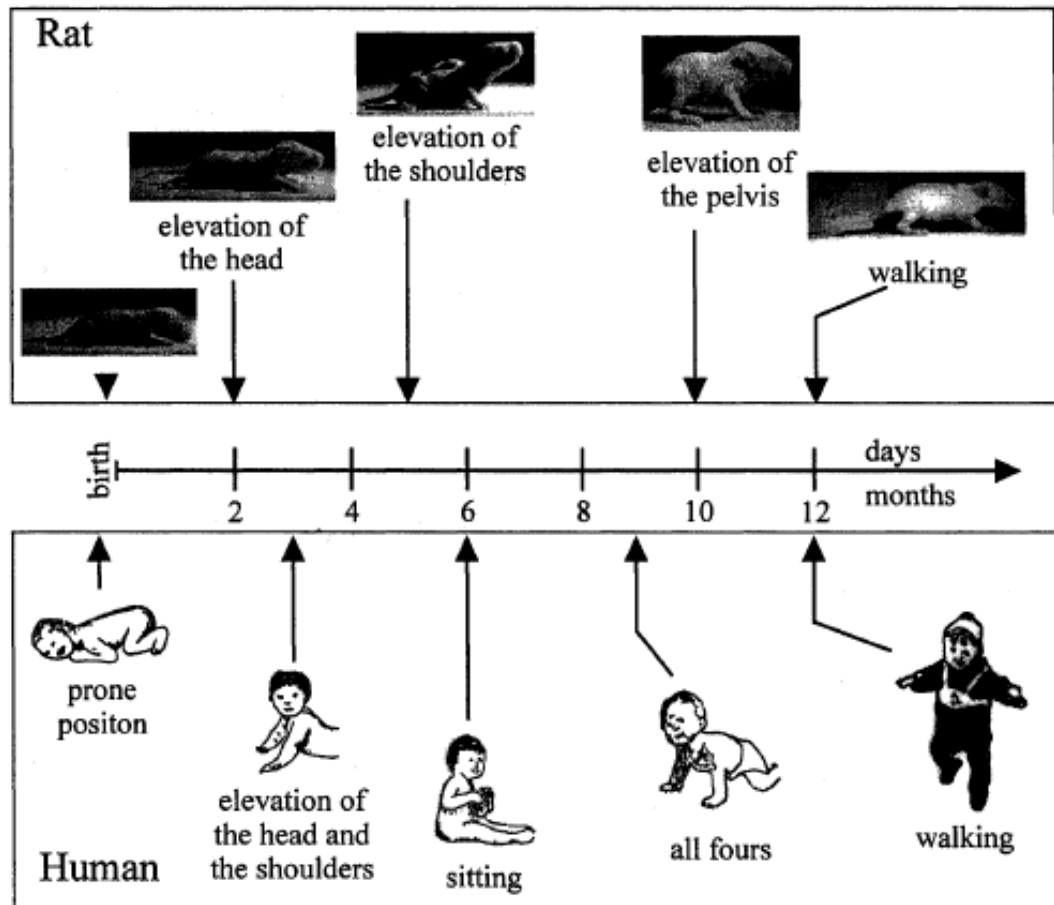
Rozdíly v délce trvání prenatalního a postnatalního vývoje způsobují, že se vývoj potkana a člověka zdá odlišný (Vinay et al. 2005). U hlodavců probíhá významná část vývoje nervového systému postnatálně, zatímco u lidí dochází ke srovnatelnému vývoji prenatalně (Rice & Barone 2000). Období těhotenství trvá u lidí přibližně 40 týdnů (280 dní), zatímco gestační období u potkanů trvá kolem tří týdnů (22 - 23 dní). Mláďata potkanů se rodí více než dva týdny před otevřením očí a v době, kdy začíná neurogeneze populací granulárních buněk v čichové baňce, hipokampu a mozečku. Člověk se rodí s otevřenými víčky a velká část granulárních neuronů v mozečku je již vytvořena (Bayer et al. 1993). První týden postnatalního života u potkana je srovnatelný s pozdní gestací u člověka (Kubová, pers. comm.).

Také Rice and Barone (2000) uvádějí, že je celkový sled vývojových událostí srovnatelný mezi druhy, ačkoli jsou časová rozmezí značně odlišná.

I když je vývoj potkana a člověka časově odlišný, všechny hlavní mozkové struktury, které nacházíme u lidí, jsou také přítomny u hlodavců a zprostředkovávají zhruba stejné funkce. Mozkový kmen je většinou zodpovědný za autonomní funkce, funkcí mozečku jsou motorické schopnosti a motorické učení. Hipokampus je zodpovědný za prostorovou paměť a krátkodobé uchování paměti. Mozková kůra je rozdělena na oblasti, z nichž některé jsou zodpovědné za motorickou funkci, jiné za senzorické funkce (vizuální, sluchové apod.). Ke tvorbě nervové trubice, která tvoří základ pro celý nervový systém, dochází však rozdílně. Nervová trubice je kompletní za 10,5 - 11 dní gestace u potkanů a za 26 - 28 dní gestace u lidí. Na začátku druhého týdne gestace u hlodavců a prvního měsíce gestace u lidí se začínají vytvářet specifické oblasti CNS neurogenezí a migrací buněk v předním mozku, středním mozku a zadní mozku. Následuje sekvence vývojových procesů zahrnující proliferaci, migraci, diferenciaci, synaptogenezi, apoptózu a myelinizaci, o nichž je pojednáno výše. Rozvinutí myelinu se objeví ve vývoji později, nežli proliferace a migrace neuronové populace. Vrchol myelinizace nastává ve druhém týdnu postnatálního vývoje u potkanů a během posledního trimestru těhotenství u lidí. V tomto období může být také myelinizace nejsnáze negativně ovlivněna postnatální podvýživou či narušením endokrinního systému. Myelinizace poté pokračuje napříč adolescencí, a to jak u hlodavců, tak u lidí. Synapse jako prostředky komunikace mezi neurony dozrávají během prvních 3 týdnů postnatálního období u potkanů a během adolescence u primátů a lidí (Rice & Barone 2000). Obecně platí, že vývoj jednotlivých částí mozku probíhá u hlodavců v rámci dnů, ale v rámci týdnů až měsíců u lidí. Hipokampus se u potkanů vyvíjí perinatálně, ale prenatálně u lidí nebo primátů během posledního trimestru. Existují také rozdíly v relativní hmotnosti a objemu specifické struktury mezi jednotlivými druhy. Snad největším rozdílem mezi hlodavci a primáty (člověkem) je skutečnost, že primáti jsou živočichové, kteří jsou závislí na získávání podnětů z prostředí vizuálně. Hlodavci naopak spoléhají převážně na sluchové a čichové vjemy, a na hmatové receptory. Větší část mozku u primátů je tedy zaměřená na zpracování zrakových vjemů, kdežto u hlodavců dominuje čichový systém. Dalším rozdílem mezi mozkem potkana a člověka lze pozorovat ve velikosti a struktuře neokortexu. Hlodavci mají hladkou (liscephalickou) mozkovou tkáň s relativně málo zastoupeným neokortexem, zatímco lidé mají mozky s vysoce spleťtým povrchem (gyrencefalická mozková tkáň), což vyplývá z enormní fylogenetické expanze neokortexu (Rice & Barone 2000).

Mozek potkana zvyšuje svoji hmotnost po narození ve 3 fázích. Rapidně roste 2 týdny od narození, pomaleji potom od 2 do 5 týdnů a nejpomaleji od 5 týdnů do 5 měsíců. Od 5 měsíců do věku 1 roku je váha mozku stejná a nemění se (Rosenberg & Stern 1966). Dobbing & Sands (1979) uvádějí, že procentuální hmotnost mozku při narození dosahuje u lidí 27 % z hmotnosti mozku dospělého jedince. Hmotnost mozku u potkana dosahuje 12 % z hmotnosti dospělého mozku. Určité podobnosti můžeme pozorovat také mezi motorickým vývojem člověka a potkana, pokud budeme uvažovat, že jeden den u potkana odpovídá jednomu měsíci věku dítěte. Potkaní mládě a lidský novorozenec jsou z pohledu motorických schopností při narození poměrně nezralí a jejich motorický vývoj nastává podél rostrokaudální osy. Jak ukazuje obrázek číslo 3, dokáže potkan ležící v poloze na bříše

zvednout hlavu ve věku P2, což odpovídá zhruba třetímu měsíci věku u dítěte. Kolem věku P5 dokáže potkan zvednout ramena od země (zapojení předních končetin), zadní končetiny jsou zapojeny zhruba ve věku P10. Od P12 a vyššího stáří začíná zvíře pomalu chodit. Stejně tak lidské dítě začne chodit kolem konce prvního roku života (Vinay et al. 2005).



Obrázek 3: Porovnání postnatálního motorického vývoje u člověka a potkana. Jeden den potkana odpovídání jednomu měsíci dítěte (Vinay et al. 2005).

Závěrem je také možno říci, že při vývoji potkana a člověka dochází k určitým podobnostem i v oblasti chování. Například období dospívání je u potkana i člověka doprovázeno zvýšeným rizikovým chováním (tzv. risk – taking) a zvýšenými sociálními hrami. To má za úkol připravit jedince na přechod do období dospělosti a samostatnosti (McCutcheon & Marinelli 2009).

3.2.4 Porovnání věku potkana a člověka

Pro animální ontogenetické studie je důležité používat zvířata, která svým obdobím ve vývoji co nejpřesněji odpovídají věkové skupině osob, na kterou bude výsledek výzkumu aplikován. Významné je to zejména při studiu a vývoji léčiv u nemocí, jejichž vznik či rozvoj je vázán na určité vývojové stadium. Mezi takové můžeme řadit například schizofrenii, parkinsonovu chorobu, nebo Alzheimerovu chorobu (McCutcheon & Marinelli 2009). Přesná korelace mezi věkem laboratorních potkanů a věkem člověka je stále předmětem debaty.

Průměrná očekávaná délka života laboratorního potkana jsou 3 roky, zatímco lidé se dožívají průměrně 80 let. Z výpočtu dostaneme, že 13,8 dne u potkana odpovídá 1 roku lidského života a 1 den u potkana odpovídá 26,7 dnům života lidského. Pokud ale zohledníme různé fáze života (od odstavu po stáří), dostaneme zcela jiná čísla. Tyto rozdíly jsou výsledkem rozdílné anatomie, fyziologie a vývojových procesů potkana a člověka (Sengupta 2013).

Metody určení věku laboratorního potkana

Existují řady metod, které slouží k porovnání věku malých savců a věku člověka (Sengupta 2013). U experimentálních zvířat je poměrně snadné stanovit embryonální stáří, protože známe den, kdy došlo k oplození. U lidí je toto obtížné a den fertilizace je těžké přesně stanovit (Bayer et al. 1993). Mezi metody určení věku patří metoda, kdy se určuje hmotnost očních čoček. Hmotnost čočky se zvyšuje během života a u laboratorních potkanů je toto zvýšení z velké části nezávislé na nutričním stavu zvířat. Tato technika počítá s přesností pouze 3 – 4 měsíce a je tedy nedostatečná pro stanovení přesného věku jedince. Mezi další metody patří měření růstu stoliček, určování počtu vrstev v tibii, muskuloskeletární růst spolu se zesílením epifýz, tělesná hmotnost zvířete apod. (Sengupta 2013). Použití metody muskuloskeletárního růstu k určení dospělosti potkanů je značně problematické, protože na rozdíl od člověka není u potkanů v dlouhých kostech uzavřena epifýza. Růst skeletu se zastavuje přibližně v 7. – 8. měsíci věku u samců i samic potkanů kmene Sprague - Dawley. U lidí je uzavření růstové destičky (growth plate) poněkud variabilní mezi jednotlivci a mezi různými růstovými destičkami v těle. Jeden z posledních růstových talířů je v lopatce a průměrně se uzavírá ve věku kolem 20 let (Quinn 2005). Všechny používané techniky jsou ale pouze relativními metodami a nepřesně definují absolutní věk zvířat. Obvykle se k určení věku používá několik metod dohromady (Sengupta 2013).

Narození, dospělost a stáří potkana a člověka

Novorozený potkan váží přibližně 5 až 6 g. Průměrná hmotnost dospělého samce potkana kmene Sprague - Dawley, který byl krmený ad libitum, se pohybuje kolem 550 g. Proto novorozenecká hmotnost potkana tvoří přibližně 1 % jejich hmotnosti v dospělosti. Hmotnost lidských novorozenců je průměrně 2,7 kg. Průměrná hmotnost dospělého muže je přibližně 82 kg. Proto tvoří porodní hmotnost člověka přibližně 3 % hmotnosti dospělého jedince (Quinn 2005). Potkani mají krátké a zrychlené dětství vůči lidem. Také se rychle rozvíjejí v kojeneckém věku. Lidé se naopak vyvíjejí pomalu. V období odstavu je unikátní pouto mezi matkou a jejími mláďaty přerušeno a představuje významnou změnu ve způsobu života jedince, který přestává přijímat mateřské mléko a přechází na stravu dospělých (Sengupta 2013). Mladí potkani začínají přijímat pevnou stravu okolo P17 dne věku. Čas strávený sáním mateřského mléka začne klesat kolem věku P15 a příjem pevné stravy roste. U laboratorních potkanů dochází k odstavu průměrně ve věku P28. (Ošťádalová & Babický 2012). Naproti tomu k odstavu u člověka dochází přibližně kolem 6 měsíců (180 dní) věku. Další důležitou fází po odstavu je puberta. Puberta je období zrání pohlavních buněk a možnosti prvního páření (Sengupta 2013). Potkani dosahují pohlavní dospělosti ve věku 40 – 60 dní, průměrně tedy kolem 50 dní věku. Lidé dosahují puberty ve věku 11,5 roku (Quinn 2005). Dospělost začíná ve věku 8 týdnů (63 dní) u potkana (Sengupta 2013) a ve věku 20 let u člověka (Vinnay et al. 2005). Stáří z pohledu reprodukce (menopauza) zvažujeme pouze u

samic, protože u samců nastává toto období velmi variabilně a u některých zvířat vůbec neexistuje. Samice laboratorního potkana se dostane do období ukončení reprodukce mezi 15 – 24 měsícem života. Podle Americké lékařské asociace nastává období menopauzy u žen ve věku kolem 51 let (Quinn 2005). Samice potkana žije v průměru 485 dní po dosažení stáří, naproti tomu žena žije v průměru 10,585 dní po dosažení menopauzy. V tomto období se tedy 17,1 dne života u potkana rovná jednomu lidskému roku života (Sengupta 2013).

Z výše uvedeného vyplývá, že ačkoli jsou laboratorní potkani hojně využíváni jako pokusná zvířata, nejsou to ale miniatury člověka. Jejich rozdílná anatomie, fyziologie, vývojové a biologické parametry musí být zvažovány při provádění, a především vyhodnocování experimentů, kde je věk považován za hlavní faktor (Sengupta 2013).

3.3 Explorační chování a chování spojené s úzkostí

Explorace je definována jako aktivní pátrání za pomoci pohybové aktivity, které vede k získání informací o životním prostředí, ve kterém se jedinec vyskytuje. Toto průzkumné chování, které se vyskytuje ve zvýšené míře během adolescence, umožňuje mladým jedincům, aby se seznámili s novými aspekty životního prostředí, rozptýlili se na nová území, případná teritoria, a získali potřebné dovednosti pro samostatnou existenci. Explorace je tedy nejvýraznější během adolescence, která zahrnuje období od odstavu po rannou dospělost. Lze ji dále rozdělit na časnou (P21 - P33), střední (P34 - P46) a pozdní (P47 - P59), jak uvádějí Lynn & Brown (2009). Také Spear (2000) uvádí, že největší explorace je pozorována u potkanů v období dospívání, a to zejména ve věku P28 – P42. Do věku P28 potkani neopouštějí hnízdo, ve věku P34 adolescenti aktivně zkoumají okolí a dochází k interakcím s jinými potkany (Spear 2000). Potkani mají systém polygynního až polyandrického páření a samci disponují ve srovnání se samicemi nižšími rodičovskými investicemi. Pro samce jsou typické disperze z rodného hnízda, jsou teritoriální a navzájem si konkurují z hlediska přístupu k noře a samicím. Pro samce je tedy výhodnější projevovat tzv. vysoce rizikové chování („high risk behaviour“), což vede k rychlejšímu shromažďování informací o okolí. Samice vykazují naopak chování orientované k zajištění bezpečnosti a je pro ně důležité získávat informace o jejich blízkém životním prostředí (Jolles at al. 2015). Na základě výše uvedeného můžeme předpokládat, že explorace u potkanů bude zvýšená napříč adolescencí a bude větší u samčích adolescentů (Lynn & Brown 2009).

Explorace je úzce spojená s anxiétou (úzkostí) a strachem z nových a neznámých prostor. Například pokud umístíme zvíře do testovacího prostředí Open Fieldu (OF, viz. níže), úzkost může potlačit tendenci potkana explarovat. Díky tomu je počáteční aktivita zvířete po nuceném umístění do OF spíše odrazem emocionality nežli explorace. Explorace a anxieta jsou různě ovlivněny manipulacemi a prostředím chovu. Například neonatální handling působí primárně na nervové systémy související se strachem a stresem. Naproti tomu, obohacení životního prostředí (enrichment) vyvolává morfologické a biochemické změny ve formaci kůry a hippocampu, což má pozitivní vliv na učení a paměť (Zimmermann et al. 2001). Bylo také zjištěno, že zvířata chovaná izolovaně vykazují řadu behaviorálních a fyziologických změn ve srovnání se zvířaty chovanými ve skupinách. Potkani izolováni během juvenilní fáze vykazovali snížené explorační chování, které se projevilo sníženou dobou trvání pobytu v centrální zóně OF, zvýšenou latencí a sníženým trváním exploračního chování, ve srovnání s potkany chovanými v párech (Arakawa 2005).

Úzkost (anxieta) je základní emoci, která se vyvíjela v průběhu evoluce. Emoce koordinují reakční systémy a připravují organismus k řešení problémů. Úzkost je doprovázena behaviorálními a fyziologickými reakcemi, díky kterým může jedinec správně reagovat na nejrůznější situace projevem obranného, nebo útočného chování. Umožňuje tedy zvířeti uniknout z nebezpečí a vyhnout se mu i v budoucnu. Posouzení chování spojeného s úzkostí u zvířat je založeno na předpokladu, že jejich úzkost je srovnatelná s úzkostí u lidí. Ve skutečnosti nelze prokázat, že zvíře zažívá úzkost stejným způsobem jako člověk (Ohl et al. 2008). Úzkost je nutné odlišit od strachu. Úzkost a strach jsou normální emoce s velkou adaptivní hodnotou, které byly selektovány v průběhu evolučního procesu. Zatímco strach se

vyskytuje v reakci na konkrétní hrozby, na současné nebezpečí a podílí se na tom, aby organismus správně reagoval na podněty a signály, zdroj úzkostného chování je obvykle nedefinovaný nebo neznámý. Úzkost je tedy reakcí na potenciální nebezpečí. Na rozdíl od normální, adaptivní úzkosti, ovlivňují poruchy úzkosti každodenní život zvířete či člověka (Campos et al. 2013). Pokud je úzkost trvalá, nekontrolovatelná, nadměrná, nevhodná a dysfunkční, která vyvolává fyziologické a behaviorální odezvy postrádající adaptivní hodnotu, hovoříme o patologické úzkosti. Chování spojené s patologickou úzkostí je reakcí na zveličené očekávání nebo vnímání hrozeb, které jsou nesourodé s aktuální situací (Ohl et al. 2008). Behaviorální vyjádření úzkosti je regulováno Centrálním nervovým behaviorálním inhibičním systémem (BIS). Rovnováha mezi aktivací a deaktivací úzkosti závisí na adaptační schopnosti jednotlivce. Za kontrolu zodpovídá amygdala, která aktivuje hypotalamická jádra, které aktivují sympatický autonomní nervový systém a osu hypotalamus – hypofýza - nadledviny. Současně mohou být aktivovány vyšší mozkové oblasti, jako je hipokampus a mozková kůra (Ohl et al. 2008).

Mezi behaviorální projevy anxiety patří například vyhýbací chování, které představuje určitou tendenci hlodavců vyhýbat se nechráněné oblasti nového prostředí, když do něj poprvé vstupují. V experimentálních podmínkách hlodavci začnou zkoumat prostředí podél stěn a zároveň se vyhýbají otevřeným, tj. nechráněným a potenciálně nebezpečným oblastem. Kromě tohoto chování specifického pro hlodavce většina zvířat velmi opatrně vstupuje do nových a neznámých oblastí, či se přibližuje k novým objektům a jednotlivcům (Ohl et al. 2008). S anxiety je také spojena explorace a inhibice. Pokud je zvíře dáno do konfrontace s něčím novým a neznámým, je výsledné chování dáno konfliktem mezi snahou o prozkoumání neznámého prostředí, objektu nebo zvířete na jedné straně a motivace vyhnout se potenciálnímu nebezpečí na straně druhé. Průzkumné chování může zahrnovat chování pro posouzení rizik a sběr informací. Například napřímený postoj těla, lokomoce, čichání a manipulace s objekty. Biologická funkce těchto chování spočívá v shromažďování informací o možných hrozbách opatrným přiblížením potenciálně ohrožujících podnětů a skenováním okolí (např. nalezení úkrytu nebo únikových tras) a svědčí o úzkosti. Explorace může být částečně nebo úplně potlačena úzkostí (viz výše), proto snížený průzkum může představovat nepřímou míru úzkosti. Tato inhibice průzkumného chování může být obrácena léčbou anxiolytickými sloučeninami (Ohl et al. 2008). Ke zkoumání explorace a anxiety se používají nejrůznější testy a nejrůznější modifikace těchto testů. Nejčastějším z nich je test otevřeného pole (OF). Explorace je nejčastěji měřena jako změna v motorické aktivitě zvířete, kdy se posuzuje například vzdálenost, kterou zvíře uběhne, četnost protínání drah, určité typy chování, panáčkování apod. Úzkost lze také posuzovat podle času, který potkan stráví přímo v centru OF, nebo podle frekvence vstupu do centra OF. S úrovní explorace souvisí také habituace (Leussis & Bolivar 2006) a úroveň anxiety, kdy například snížený počet vstupů do centrální zóny a zvýšený čas strávený v rohových oblastech arény vypovídá o úzkostném chování. Jsou k dispozici také jiné testy na měření habituace, anxiety a explorace, jako například EPM a EZM (Hammels et al. 2015).

3.4 Habituace

3.4.1 Charakteristika

Dlouhodobá paměť, do které řadíme také habituaci, může být rozdělena na asociativní a neasociativní v závislosti na mechanismech, které jsou požadovány pro její utváření. Asociativní paměť je založena na získávání prediktivní vazby mezi konkrétní událostí a podnětem (např. klasické podmiňování, nebo paměť pro strach). Neasociativní paměť je získána po opakované nebo kontinuální expozici novému stimulu, díky čemuž se změní behaviorální odpověď na něj (habituace). Pro paměť je velice důležitý hipokampus. Molekulární události v hipokampu požadované pro formaci dlouhodobé paměti byly studovány především v oblasti asociativního učení. Mnohem méně je toho známo o formaci neasociativní paměti. Nejzákladnější forma neasociativního učení je behaviorální habituace ve vztahu k novému prostředí (Vianna et al. 2000). Harris (1943) definoval habituaci jako vymezení odpovědi na opakované vystavení stejnému stimulu. Habituace pomáhá organismu selektivně reagovat na biologicky významné podněty a ignorovat ty méně relevantní. Je jednou z nejjednodušších forem učení, která je pozorována u všech živočichů, včetně bezobratlých a prvoků (Harris 1943). Habituaci řadíme k tzv. základním formám učení a je nezbytná pro přežití druhu. Ke studiu habituace bylo použito různých organismů, chování a experimentálních postupů, ale přesto je překvapivě málo známo o základních mechanismech (Schmid et al. 2015). I když se jedná o jednoduchou formu učení, z pohledu neurobiologických, biochemických a genetických studií se jedná o proces velmi komplikovaný (Bolivar 2009).

Jednou z nejobvyklejších forem habituace, která se projevuje u hlodavců, je snížení explorativního chování jako reakce na pokračující, nebo opakované vystavení novému prostředí. Když umístíme jedince do nového prostředí, začne vytvářet vnitřní mapu tohoto prostředí v hipokampu. Jakmile je tato hipokampální mapa dokončena, sníží se explorační aktivita a můžeme usuzovat, že zvíře se habituovalo na nové prostředí (Leussis & Bolivar 2006). Je důležité si uvědomit, že habituace může být ovlivněna mnoha faktory. Například počáteční úroveň explorační aktivity během setkání s novým prostředím může mít vliv na úroveň habituace, obzvláště na habituaci „across sessions“. Zvíře, které neprozkoumá velmi rychle nové prostředí, nemusí být schopno vytvořit úplnou kognitivní mapu oblasti v určeném čase. Během pozdějšího vystavení stejnému prostředí může výkon souviset právě s nedostatečným prvotním průzkumem celé oblasti a nemusí být výsledkem deficitu paměti. K nedostatečnému průzkumu nového prostředí může dojít vlivem vysoké úrovně úzkosti, nízké úrovně lokomoční aktivity, nebo díky senzorickým deficitům. Při hodnocení habituace chování tedy musí být zohledněny určité úrovně aktivity (Bolivar 2009). Mezi další faktory, které ovlivňují průzkumné chování a tím i habituaci patří míra excitability, úroveň pozornosti, schopnost učení, paměť a strach z nového prostředí. Kdykoli je hlodavec umístěn do nového prostředí, vyvolá to u něho explorační chování, protože musí začít shromažďovat informace o neznámém místě. Tyto informace se týkají řady faktorů, které souvisejí s přežitím v přírodě. Jedná se například o dostupnost partnera, zdrojů potravy, přítomnosti predátorů a potenciálních únikových cest (Leussis & Bolivar 2006). Také Platel & Porsolt (1982) uvádějí, že v důsledku schopnosti zvířete zapamatovat si neznámé prostředí, kterému bylo již

jednou vystaveno dochází při druhém vystavení stejnému prostředí k poklesu aktivity, což indikuje, že si zvíře prostředí zapamatovalo (Platel & Porsolt 1982). Behaviorální habituace ve vztahu k novému prostředí je běžně používána u potkanů a myši jako paradigmatu pro zkoumání neasociativního učení a paměťových procesů. Studium habituace se také používá k posouzení vlivu účinků léčiv, která jsou určena pro učení a paměť (Leussis & Bolivar 2006). Je známa řada neuroaktivních látek, které habituaci ovlivňují. Z neurotransmiterů se na habituaci podílejí především serotonin, acetylcholin, dopamin a glutamát. Studie za poslední dvě desetiletí ukázaly, že existuje také genetická komponenta habituace (Bolivar 2009).

3.4.2 Vývoj habituace

V dospělosti mají hlodavci velmi dobrou schopnost habituace na nové prostředí. Existují četné studie zaměřující se na schopnost habituace po celou délku života hlodavce, které dokumentují vývoj habituace. Velmi mladí potkani, kteří byli velmi brzy odstaveni, nevykazují intrasession habituaci. Naproti tomu starší potkani, kteří ještě nejsou zcela dospělí, intrasession habituaci vykazují (Leussis & Bolivar 2006). Toto bylo prokázáno ve studii porovnávající explorační aktivitu u potkanů ve věku P15 a P36. Přestože mladší potkani nevykazovali sníženou aktivitu typicky spojenou s habituací, explorační aktivita u těchto mládřat byla nízká už v začátku. Ve skutečnosti byla aktivita mládřat zhruba ekvivalentní s aktivitou starších potkanů poté, co byli habituováni (Feigley et al. 1972). Také Bronstein et al. (1974) uvádějí, že potkani ve věku P15 nebyli schopni intrasession habituace. Schopnost projevit habituaci k novému prostředí je paralelní s vývojem cholinergních mechanismů předního mozku a odehrává se během 3. – 4. postnatálního týdne, kdy cholinergní systém mozku potkanů rychle dozrává (Bronstein et al. 1974). Jiné experimenty prokázaly, že například myši ve věku P21 a mladší nejsou schopny explarovat stejně jako myši dospělé a vykazují kvantitativní i kvalitativní rozdíly ve zkoumání nového prostředí (Chapillon & Rouillet 1997). Explorační chování, které se podobá chování dospělých zvířat začíná ve třetím týdnu života potkana. Explorační aktivita byla velmi nízká ve věku P10. Nejvyšších hodnot dosahovala od P20 – P30. Také Ba & Seri (1995) uvádějí, že u potkanů ve věku P10 – P15 nebyla pozorována habituace. Habituovat začala zvířata až ve věku P20 (Ba & Seri 1995). Tyto poznatky naznačují ontogenetickou úlohu ve vývoji explorační a habituace (Leussis and Bolivar 2006). Deficit habituace, který vykazují velmi mladí hlodavci byl připisován neschopnosti učit se a zpracovávat prostorové informace. To se ovšem ukázalo jako nepravděpodobné, protože mladé myši nevykazovali žádné deficity ve vodním bludišti („Morris water maze“). Namísto neschopnosti učit se možná mladé myši potřebují větší vnitřní motivaci, jakou může být odměna v rámci potravy, nebo možnost úniku z vody. Kontakt s novým prostředím tak nemusí představovat dostatečnou motivaci (Chapillon & Rouillet 1997). Dle Leussis & Bolivar (2006) je také možné, že mladí potkani potřebují jenom delší dobu expozice v OF, aby se naučili a zapamatovali nové prostředí.

V nezralém mozku mají neurotransmitery, které se podílejí na exploraci a habituaci zcela jinou úlohu, než jakou mají v plně zralém mozku dospělců. Pokud do vývoje mozku zasáhneme například farmakologickými manipulacemi, může to vést k dlouhodobým neurologickým deficitům, zejména, pokud toto provedeme během kritického vývojového období určitého systému (Leussis & Bolivar 2006). Například vysoké snížení hladin 5 – HT u

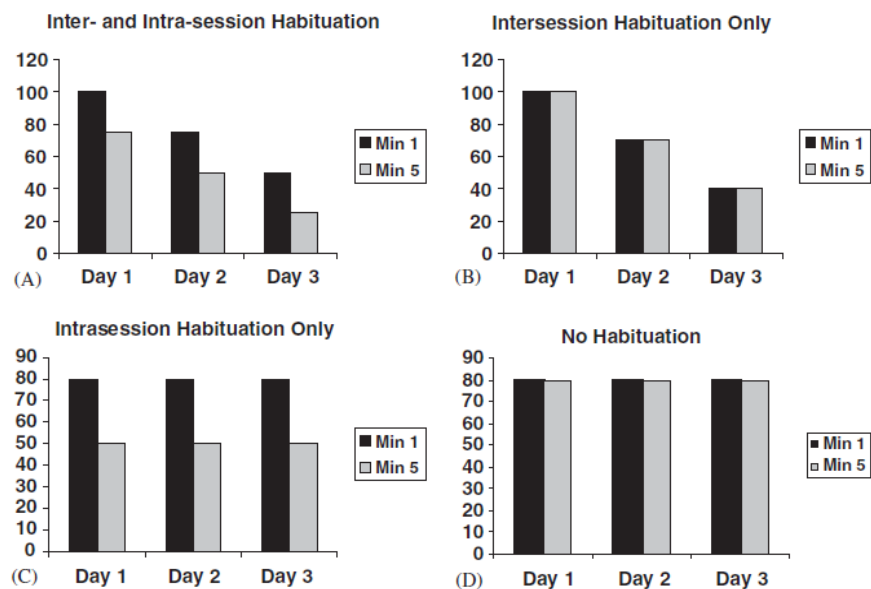
potkanů ve věku P10 – P20 může vést k trvalému poklesu počtu synaptických spojů a tím ke snížení funkce dané neuronální sítě, což vede ke snížené schopnosti učení, včetně snížené schopnosti prostorového učení, která přetrvává až do dospělosti (Mazer et al. 1997). Podle studie Chen et al. (1997) se hladina 5 – HT v hipokampu zvyšuje od narození do věku P45, poté klesá až do věku P90. Naproti tomu DA v hipokampu se postupně snižuje na nejnižší úroveň ve věku P30, poté opět roste. (Chen et al. 1997). Vývoj habituace ovlivňují také faktory prostředí, ke kterým řadíme například stres, sociální izolaci zvířat a podávání léčiv. V neposlední řadě existuje mnoho genů, které se podílejí na regulaci postnatálního vývoje hipokampu, například *Emx2*, *Lhx2* apod. (Leussis & Bolivar, 2006).

Neurotransmise prochází četnými změnami rovněž v průběhu stárnutí. Zvířata v pokročilém věku mohou vykazovat určitý pokles v intra a intersession habituaci, nicméně za určitých okolností mohou i starší zvířata vykazovat oba typy habituace, podobně jako zvířata dospělá. Potkani, kteří se považují za stárnoucí (13 až 24 měsíců), habituaci vykazují zpravidla daleko lépe, než mláďata před odstavem (Leussis & Bolivar 2006). Změnami prochází například serotonergní hipokampální systém. Dochází ke změnám 5 – HT v určitých oblastech mozku, snížené koncentrace můžeme pozorovat například ve frontálním kortexu. Potkani s deficitem učení vykazují snížené hladiny 5 – HT. Snížená aktivita je také pozorována u acetylcholinesterázy v řadě oblastí mozku (Stemmelin et al. 2000). Byla vyslovena myšlenka, že dopaminergní systém je citlivější na změny související se stárnutím, než systém serotonergní (Moretti et al. 1987). Hladina glutamátu, který usnadňuje habituaci je také změněna u starých zvířat. Další studie naznačují, že koncentrace glutamátu v mozku se s věkem snižuje (Wheeler 1980; Price et al. 1981). Palmer et al. (1994) uvádí, že koncentrace glutamátu zůstávají od dospělosti do stáří nezměněny. Ve stáří existují také změny v genové expresi (Leussis & Bolivar 2006).

3.4.3 Habituace intra- a intersession

Obecně se rozlišují dvě formy habituace: krátkodobá habituace (STH = short - term habituation), která se obvykle označuje jednoduše jako „habituace“ a která popisuje snižující se odpověď v rámci jedné expozice novému prostředí. V angličtině se jí také říká tzv. within session habituace, nebo intrasession habituace. Intervaly mezi stimuly jsou většinou v rozmezí několika sekund, nebo jen málo minut. Druhým typem habituace je habituace dlouhodobá (LTH = long - term habituation), která se také označuje termínem habituace between session, nebo intersession habituace, protože popisuje odpověď na vystavení novému prostředí opakovaně, nejčastěji s několikadenními intervaly mezi jednotlivými expozicemi (Pilz et al. 2014). Také Bolivar (2009) uvádí, že habituace může nastat během jedné relace (jedné session), nebo napříč relacemi (across session). Naznačuje také, že vliv na habituaci má genetika a že jsou zde zapojeny určité geny, které jsou zodpovědné za oba typy habituace (Bolivar 2009). U tzv. intersession habituace se testuje paměť neboli schopnost zapamatovat si předchozí vystavení novému prostředí. Zjišťuje se, zda hlodavec reaguje tak, jako by dosud nebyl obeznámen s testovacím prostředím, což ukazuje úroveň explorační zhruba ekvivalentní k exploraci, která byla pozorována při prvním seznámení neznámým s novým prostředím (např. OF), nebo zda se zvíře chová tak, jako by prostředí již znalo, což se projeví sníženou

explorací. Habituační intrasession nastává, když se hlodavec seznámí s prostředím, do kterého byl umístěn a termín odkazuje na pokles explorační aktivity, který nastává specificky v časovém období jedné expozice v prostředí OF (Leussis & Bolivar 2006). Lze tvrdit, že intrasession habituace měří adaptivitu, zatímco intersession habituace odráží schopnost vyvolat vzpomínku (paměť) na předchozí expozici novému prostředí (Bolivar 2009). Většina hlodavců tedy během několika relací oddělených stanovenou délkou času vykazují oba typy habituace. Intersession habituace, při které musí hlodavec uchovávat informace o daném prostředí, je často považována za lepší indikátor učení a paměti. Stupeň obtížnosti této habituace může být zprostředkován řadou faktorů, například značnou roli hraje délka vystavení novému prostředí a interval mezi jednotlivými expozicemi. Nicméně neschopnost habituace v rámci jedné expozice (intrasession habituace) může být také považována za silný ukazatel deficitu učení a paměti. V tomto případě je nedostatek návyku v rámci pobytu větší, protože nastává bez retenčního intervalu (Leussis & Bolivar 2006).



Obrázek 4: Příklad grafů jako demonstrace rozdílu intra a intersession habituace. Grafy představují lokomoční aktivitu během tří po sobě následujících dní (5 minut každý den). Aktivita pro každý den je prezentována jako celková aktivita za 1 minutu (0 - 60 s) a 5 minut (240 - 300 s). (A) Grafické znázornění intersession a intrasession habituace, což se projevuje poklesem aktivity napříč dny a v rámci dne. (B) Intersession habituace bez habituace intrasession. Toto se projevuje jako snížení aktivity napříč dny, bez současného snížení aktivity mezi minutami 1 a 5 v daném testovacím dni. (C) Intrasession habituace bez Intersession habituace, což se projevuje jako snížení aktivity mezi minutami 1 a 5 každý den, ale žádné snížení celkové aktivity od 1.dne do 3. dne. (D) Žádný důkaz habituace, protože aktivita se nesnižuje napříč dny, nebo mezi minutami 1 a 5 v kterémkoli daném zkušebním dni (Převzato z Leussis & Bolivar 2006).

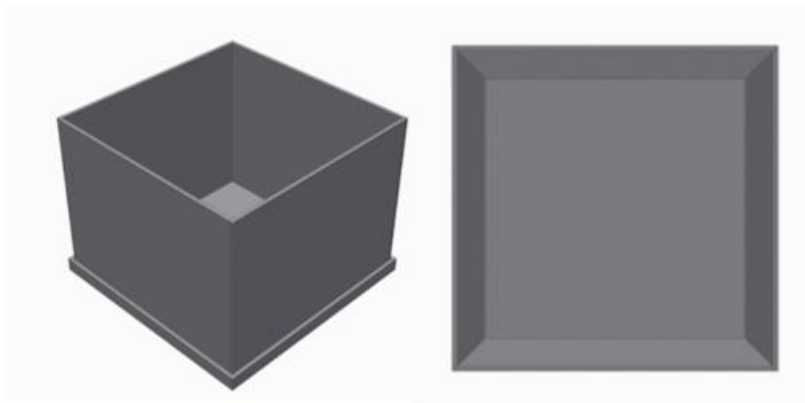
3.5 Open field test (test otevřeného pole)

Tvůrce OF byl Calvin Hall, který popsal v roce 1934 OF pro studium emocionality u potkanů. Testování spočívá v umístění zvířete (nejčastěji hlodavce) do neznámého prostředí, přičemž útek z tohoto prostředí je zvířeti znemožněn přiléhajícími zdmi (Pрут & Belzung 2003). Hall používal defekaci zvířat v OF jako index plachosti. Chování zvířete je ovlivněno řadou faktorů, jakými jsou stimulační v důsledku odebrání zvířete ze známého domácího prostředí, stimulační při přenosu zvířete do OF, vystavení zkušebnímu prostředí, které se skládá z OF samotného a jeho okolí, veškeré předchozí zkušenosti s prostředím OF - návyk a učení (Walsh & Cummins 1976). Od roku 1934 získal OF status jedné z nejrozšířenější a nejvíce používané aparatury, která slouží k měření chování zvířat (Seibenhener & Wooten 2015). Jedná se o poměrně jednoduchý, snadno proveditelný, rychlý a poměrně levný test a jasnou interpretací výsledků. Některé měřené parametry jsou navíc citlivé na širokou škálu genetických, experimentálních, psychologických a farmakologických manipulací a jsou za standardizovaných podmínek dostatečně spolehlivá. Jednoduchost, snadnost kvantifikace a široká použitelnost jsou tedy pravděpodobně hlavními determinanty jeho popularity (Walsh & Cummins 1976). V OF jsou často testovány efekty různých látek. Některé léky byly testovány pro jejich anxiolytický efekt (benzodiazepiny, serotoninové ligandy, neuropeptidy), jiné pro jejich stimulační efekt (amphetaminy, kokain), sedativa (neuroleptika), nebo antiepileptika (Pрут & Belzung 2003).

OF je nyní jedním z nejvíce populárních testů užívaných ve zvířecí psychologii (Pрут & Belzung 2003). Ačkoli je OF někdy považován za tzv. standardizovaný test, procedurální detaily se v rámci jednotlivých studií značně liší. Různá je často velikost OF (od 20 cm po značně velké rozměry), tvar OF (kruh, čtverec, obdélník), úroveň osvětlení, opakovaná x jednorázová expozice, doba trvání testování (1 ± 30 min), rozdílný čas testování během dne, motivace (zvířata zbavená jídla a / nebo vody), podmínky zvířete před testováním (sociální, individuální), pohlaví zvířat, přítomnost potravy, nových předmětů, přístřešků, dravců a / nebo zápachu dravce, lišit se může také způsob shromažďování dat a způsob prováděné analýzy chování (Choleris et al. 2001). Nejčastěji se chování hlodavců analyzuje v prázdném bludišti. Přidáním objektů je možné hodnotit chování zvířete k novému objektu, například počet přístupů k objektu, preference, nebo averze vůči určitému objektu (Seibenhener & Wooten 2015). Zvíře je umístěno do centra, nebo v blízkosti stěn OF a následně je hodnoceno chování zvířete po dobu od 2 do 20 minut (obvykle to je 5 minut). Pokud se zvířata pohybují poblíž zdí, chování se nazývá tigmotaxí. Chování zvířete v OF závisí zejména na hmatových sensorických faktorech. Myši bez hmatových fousků nevykazují tigmotaktické chování, protože ztrácejí hmatový kontakt se stěnami. Díky tomu vykazují zvýšené vstupy do centra OF. Zvýšení času stráveného v centrální části, jakož i poměru centrální / celková lokomoce nebo snížení latence pro vstup do centrální části poukazuje na sníženou úzkost po podání anxiolytik, jako například BZD (Pрут & Belzung 2003). Velká, prostá a osvětlená aréna je vnímána jako averzivní, děsivé prostředí a chování subjektu, který je do ní umístěn, odráží jeho reakci na tuto stresující událost. Všeobecně se uznává, že stres vyvolává úzkostné chování, které je vyjádřeno v OF prostřednictvím snížené lokomoce. Naopak vzrůst lokomoce vyplývající z účinků anxiolytických léků pak znamená, že odráží snížení úrovně úzkosti (Hlíňák et al. 2009). Chování spojené s úzkostí v OF je spušteno dvěma faktory: Jedinec je při

testování umístěn mimo svoji skupinu (mimo sourozence apod.) a může být také přítomna agorafobie (pokud je aréna příliš velká vzhledem k přirozenému prostředí zvířete). Toto je typické pro hlodavce – žijí v sociálních skupinách a v malých prostorech. Toto není případ skotu a ovcí, kteří žijí na rozsáhlých pastvinách (Prut & Belzung 2003).

OF se stal natolik populární, že jeho využití bylo rozšířeno i mezi další druhy zvířat, jako například telata, prasata, jehňata, králíky, kuřata, křepelky, primáty, včely, šváby, pavouky a humry (Choleris et al. 2001; Prut & Belzung 2003). Ačkoli OF byl původně vyvinut behaviorálními psychology, jeho použití se rozšířilo do několika dalších disciplín včetně neurovědy a psychofarmakologie. V psychofarmakologických studiích se zvířata obvykle nacházejí v nové oblasti a vyhodnocují se účinky různých farmakologických činidel na trvání a frekvenci určitého chování (lokomoce, panáčkování, grooming, spánek atd.). Při testování behaviorálních účinků anxiolytických léků se OF nejčastěji používá k vyhodnocení nescifických, nebo vedlejších účinků daného předpokládaného anxiolytického léčiva. OF však může být také interpretován v tzv. evoluční perspektivě. Zvířata byla „fylogeneticky připravena“ přirozenou selekcí pro zobrazení strachu a / nebo úzkosti. Pro malé hlodavce může být stresující pobyt v neznámém otevřeném prostoru, vystavení jasnému světlu apod. OF umožňuje vyhodnocení účinků léků na různé aspekty chování zvířat a jeho základní motivaci. V tomto ohledu opakované testování, kterými jednotlivé zvíře prochází, výrazně ovlivňuje jeho chování a pravděpodobně jeho základní motivaci. Po opakovaném testování se zvířata rychle habituují a jejich lokomoce má tendenci k poklesu v průběhu testovacích sezení, dokud aktivita nedosáhne stabilní úrovně. Tato stabilizovaná úroveň aktivity se často používá k posouzení účinků léků na lokomoci jako takovou (Choleris et al. 2001).



Obrázek 5: Open field čtvercová aréna (převzato z: <https://www.noldus.com/animal-behavior-research/open-field-test>)

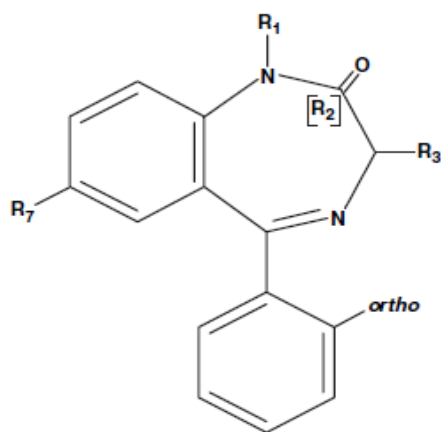
3.6 Benzodiazepiny

3.6.1 Obecné informace (využití, nežádoucí reakce)

Od zavedení do klinické praxe patří benzodiazepiny (BZD) mezi nejčastěji používané léky. Jejich stabilní účinnost v průběhu vývoje byla dokumentována v klinických i preklinických studiích (Kubová et al. 2018). BZD jsou léky hojně využívané k léčbě epilepsie. Patří do skupiny tzv. antiepileptických léků (AED), do které patří například i barbituráty. (Kaindl et al. 2006). BZD jsou léky první volby pro status epilepticus, pro léčbu různých záchvatových poruch (Riss et al. 2008), léčbu úzkosti, nespavosti, a používají se také jako přidružující léčba u depresí a schizofrenie (Jacob et al. 2012). Využívané jsou rovněž k navození sedace (Iqbal et al. 2002). BZD se zkrátka používají pro širokou škálu lékařských indikací a napříč všemi věkovými skupinami, včetně novorozeneckého období, díky jejich odlišným antikonvulzivním, sedativním, anxiolytickým, hypnotickým a myorelaxačním účinkům (Kubová et al. 2018). Jejich používání je známé již od šedesátých let 20. století. V současnosti je dostupných zhruba 35 BZD. Pouze několik z nich je používáno k léčbě záchvatů a epilepsie, například klonazepam (Riss et al. 2008). BZD se vzájemně liší také svým terapeutickým spektrem a aktivitou. Například klonazepam má více antikonvulzivních vlastností než většina z nich (Lader 2011). Klinické výhody těchto léků zahrnují rychlý nástup účinku, vysokou účinnost a minimální toxicitu. Mají široké spektrum klinické aktivity a mohou být podávány několika způsoby (Riss et al. 2008). BZD nejsou ovšem vhodnou volbou u všech úzkostných poruch, například u obsedantně kompulzivní poruchy je léčba BZD neúčinná (Norman et al. 1997). Benzodiazepiny jsou jednou z nejčastěji předepisovaných skupin anxiolytických léčiv. Zároveň patří mezi léky nejčastěji předepisované ženám v reprodukčním věku a těhotným ženám ke snížení úzkosti a zvládnutí preeklampsie nebo eklampsie v pozdější části těhotenství. Potenciální přínosy benzodiazepinů pro matku mohou být ovšem kompenzovány vysokým rizikem nežádoucího působení těchto látek na plod (Iqbal et al. 2002). I Norman et al. (1997) doporučují, že užívání těchto látek v těhotenství musí být pečlivě zváženo (Norman et al. 1997).

Běžné nežádoucí účinky u všech BZD zahrnují ospalost, letargii a únavu. Při vyšších dávkách může dojít k narušení motorické koordinace, závratím, dysartrií, rozmazanému vidění a změnám nálad. V některých případech mohou způsobit agresivní a jinak změněné chování (Griffin et al. 2013). Mezi hlavní nežádoucí účinky patří nadměrná sedace, která je nebezpečná zejména pro lidi staršího věku, kdy může na tomto základě a díky ztrátě koordinace docházet k častým pádům. Může se také objevit špatná koncentrace, ataxie, zmatenost (Norman et al. 1997) a amnézie. BZD jsou rovněž látky, které ovlivňují paměť. Účinky jsou často odlišné v závislosti na použitém BZD. Například Lorazepam zhoršuje jak explicitní paměť, tak implicitní paměť. Diazepam narušuje explicitní paměť, ale výsledky týkající se poškození implicitní paměti diazepamem jsou smíšené (Riss et al. 2008). Významným nežádoucím účinkem je také vznik závislosti. BZD se pomalu vylučují z těla, takže opakované dávky po delší dobu mohou mít za následek významnou akumulaci v tukových tkáních (Griffin et al. 2013). Léčba benzodiazepinem by tedy neměla probíhat dlouhodobě (Norman et al. 1997). Nejprve se předpokládalo, že BZD nezpůsobují vznik závislosti. Pozdější studie ovšem ukázaly opak. I přesto se odhaduje, že v západních zemích

užívá 10 až 20 % dospělých pravidelně tyto léky (Norman et al. 1997). Nežádoucí je také možná kontraindikace s jinými léky (př. perorální antikoncepční pilulky, některá antibiotika), které mají vliv na cytochromové enzymy p450. Tyto enzymy se účastní metabolismu BZD v játrech a působením jiných léčiv může docházet ke snížení, nebo zvýšení biologického poločasu eliminace BZD (Griffin et al. 2013).



Obrázek 6: Obecná chemická struktura 1,4 – benzodiazepinu (Riss et al. 2008).

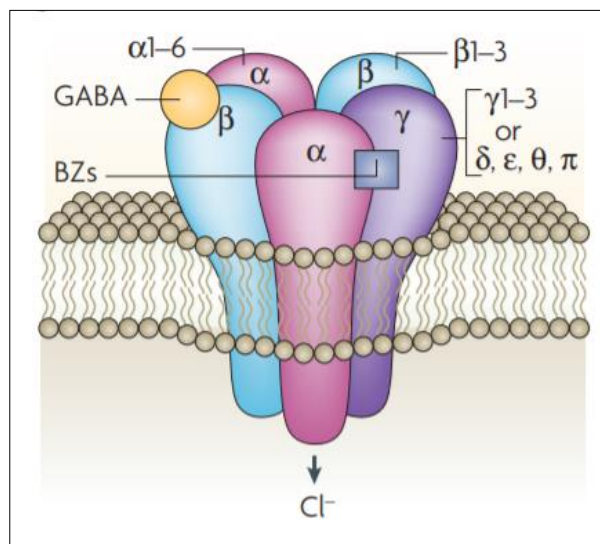
3.6.2 Farmakologická charakteristika (farmakodynamika, farmakokinetika)

Základní chemická struktura BZD je tvořena fúzí benzenového kruhu a sedmičlenného diazepinového kruhu (obr. 6). Klobazam je výjimkou se strukturou 1,5 – benzodiazepin. Všechny BZD sdílejí podobné neurofarmakologické vlastnosti, včetně snížení úzkosti, sedace, navození spánku, antikonvulsivní účinky a svalové relaxace. Existují však rozdíly mezi BZD v afinitě k receptorovým podtypům, které mohou vyvolat různé farmakologické účinky. BZD mají také velmi rozdílné farmakokinetické profily. Pozorovány byly rozdíly v absorpci, nástupu a trvání účinku a tvorbě aktivních metabolitů. Farmakokinetické rozdíly tak často určují použití specifických BZD a způsob podání. Rozdíly ve farmakokinetice a farmakodynamice BZD je třeba vzít v úvahu, aby tyto léky byly používány bezpečně a účinně. (Riss et al. 2008).

Farmakodynamika BZD

Benzodiazepiny působí jako pozitivní alosterické modulátory na receptoru gama aminomáselné kyseliny (GABA_A receptor) (Griffin et al. 2013). Váží se na specifická benzodiazepinová vazebná místa (Lader 2011) na rozhraní mezi α a γ podjednotkou GABA_A receptoru (Jacob et al. 2012). GABA_A receptor je chlorid selektivní iontový kanál s ligandem, kterým je GABA. GABA je nejčastější neurotransmitter v centrální nervové soustavě, nacházející se ve vysokých koncentracích v kůře a limbickém systému. GABA má inhibiční povahu a tím snižuje excitabilitu neuronů. GABA má tři receptory, které jsou označeny jako A, B a C. Benzodiazepiny interagují s receptorem GABA_A. GABA_A receptorový komplex se

skládá z 5 glykoproteinových podjednotek, z nichž každá má několik izoform. $GABA_A$ receptory obsahují 2 α podjednotky, 2 β podjednotky a 1 γ podjednotku. Každý receptorový komplex má 2 místa vázající GABA, ale pouze 1 vazebné místo pro BZD. Vazebné místo benzodiazepinu je ve specifickém místě mezi podjednotkami α a γ . Uvnitř podjednotky α izoform 1, 2, 3 a 5 je umístěn histidinový zbytek (H101, H101, H126 a H105), který má vysokou afinitu k BZD. Izoformy 4 a 6 α podjednotky obsahují arginin zbytek a nemají afinitu k BZD. Jakmile se BZD naváže na $GABA_A$ receptor, indukují jeho konformační změnu (Griffin et al. 2013), zvýší se afinita vazebného místa tohoto receptoru pro GABA, která se aktivněji váže. Dojde ke zvýšení frekvence otevírání chloridových kanálů (zvýší se průtok chloridových iontů) a zpomalí se úbytek miniaturních inhibičních postsynaptických proudů (mIPSCs) (Jacob et al. 2012). Změna v chloridovém kanálu receptoru $GABA_A$ vyvolá hyperpolarizaci buňky a ovlivní inhibiční účinek GABA v celém centrálním nervovém systému (Griffin et al. 2013). Inhibiční synapse jsou důležité pro kontrolu aktivity excitačních neuronů a pro inhibici synchronizovaných epileptiformních výbojů (Kaindl et al. 2006).



Obrázek 7: $GABA_A$ receptor a vazebné místo pro benzodiazepiny, značeno jako BZs (Jacob et al. 2008).

3.6.3 Specifické benzodiazepinové receptory

Benzodiazepinový receptor byl rozdělen do několika typů založených na izoformách α podjednotek a klinických účincích vztahujících se ke každému typu. Receptor BZ1 obsahuje izoformu $\alpha 1$. Receptor BZ1 je vysoce koncentrovaný v kůře, thalamu a mozečku; je zodpovědný za sedativní účinky BZD a anterográdní amnézii a za některé antikonvulzivní účinky diazepamu. Šedesát procent receptorů $GABA_A$ obsahuje podjednotku $\alpha 1$. Proto je amnézie běžným vedlejším účinkem při užívání BZD, protože většina receptorů $GABA_A$ obsahuje receptor BZ1. BZ2 receptory obsahují izoformu $\alpha 2$ a zprostředkovávají anxiolytické a do značné míry i myorelaxační účinky BZD. Receptory BZ2 jsou vysoce koncentrované v oblastech, jako je limbický systém, motorické neurony a dorzální roh míchy. Předpokládá se,

že anxiolytické účinky BZD jsou zprostředkovány prostřednictvím receptorů BZ2 lokalizovaných v limbickém systému a vlastnosti myorelaxantů jsou zprostředkovány prostřednictvím receptorů obsahujících $\alpha 2$ v míše a motorických neuronech. Ne všechny benzodiazepiny interagují se stejným typem receptoru BZ nebo mají stejnou afinitu k určitému receptoru. Tyto rozdíly v α podjednotkových izoformách, afinitě typu receptoru BZ a umístění v centrálním nervovém systému představují různé účinky různých benzodiazepinů (Griffin et al. 2013).

Farmakokinetika

Farmakokinetické vlastnosti jednotlivých BZD se značně liší (Norman et al. 1997). Farmakokinetické vlastnosti léku určují nástup a trvání jeho účinku. Farmakokinetika konkrétně popisuje absorpci, distribuci, metabolismus a způsob vylučování léku. Je ovlivněna cestou podání, absorpcí a distribučním objemem (Griffin et al. 2013). Rychlost nástupu účinku je určena rychlostí absorpce a distribuce, která pro většinu benzodiazepinů je po perorálním podání rychlá a kompletní. Trvání účinku závisí částečně na poločas rozpadu léčiva a na přítomnosti nebo nepřítomnosti aktivních metabolitů. Léčiva s dlouhým poločasem rozpadu (například diazepam) mohou být podávány jednou denně, zatímco léky se středním až krátkým poločasem rozpadu (např. alprazolam) vyžadují častější podávání (Norman et al. 1997).

BZD mohou být podávány intramuskulárně, intravenózně, orálně, sublingválně, intranasálně, nebo rektálně. Léky jsou charakterizovány na základě jejich lipidové rozpustnosti, vazby na plazmatické proteiny a velikosti molekul. Poločas eliminace, který může být ovlivněn patologickými stavy a stářím je obzvláště důležitý při podávání BZD (Griffin et al. 2013). Z farmakologického hlediska jsou BZD obvykle po perorálním podání dobře absorbovány v gastrointestinálním traktu (Lader 2011). Při perorálním podání se většina BZD rozsáhle a rychle vstřebává, biologická dostupnost se pohybuje od 80 % do 100 % a časy do vrcholové koncentrace v rozmezí od několika minut do několika hodin. Benzodiazepiny rychle procházejí hematoencefalickou bariérou, ačkoli rychlost difúze do mozku se mění podle léku a je z velké části určována jejich lipofilitou. Čím rychlejší je difúze, tím dřívější je začátek farmakodynamických účinků (Riss et al. 2008). Po intravenózním podání se BZD rychle rozdělují do mozku a centrálního nervového systému (Griffin et al. 2013). Po intramuskulárním podání je absorpce diazepamu (Lader 2011), nebo chlordiazepoxidu pomalá a nepravidelná, zatímco absorpce intramuskulárního podání lorazepamu nebo midazolamu se jeví jako rychlá a úplná. Lorazepam se po sublingválním podání dobře vstřebává a dosahuje maximálních hladin za 60 minut. Benzodiazepiny a jejich metabolity jsou vysoce proteinově vázány. Jsou široce distribuovány v těle a přednostně se hromadí v oblastech bohatých na lipidy, jako je centrální nervový systém a tuková tkáň. Více lipofilních činidel má tedy obecně nejvyšší míru absorpce a nejrychlejší nástup klinických účinků (Griffin et al. 2013).

BZD působí prakticky bez přímých účinků na biologické systémy mimo CNS (např. kardiovaskulární systém). Většina BZD jsou velmi účinnými léky, některé mají terapeutické účinky v dávkách nižších než jeden miligram. Jsou to látky výjimečně dobře tolerovány, charakteristická je nízká toxicita (Haefely 1989). Lze předpokládat, že všechny hlavní

skupiny benzodiazepinových sloučenin jsou vylučovány do mléka, nebo snadno difundují přes placentu k plodu. Toto závisí na konkrétní vazbě léku na plazmatické proteiny, ionizaci, stupni lipofilnosti, molekulární hmotnosti, poločasu rozpadu, koncentracích v krvi matky a farmakokinetice. Rozpustnost v lipidech a molekulová hmotnost léčiva jsou nejdůležitějšími determinanty určující nebezpečí přechodu na plod, nebo novorozence během těhotenství a laktace (Iqbal et al. 2002). Benzodiazepiny mají také velké distribuční objemy, vysoce se váží na plazmatické bílkoviny a snadno se dostávají do placenty a mateřského mléka (Riss et al. 2008).

BZD jsou klasifikovány z hlediska jejich eliminačního poločasu. Krátkodobě působící BZD mají střední eliminační poločas 1-12 hodin, středně působící BZD mají průměrný eliminační poločas 12-40 hodin a dlouhodobě působící BZD mají průměrný eliminační poločas 40-250 hodin. Jak bylo uvedeno výše, 5 poločasů je obecně nutných k tomu, aby byl přípravek vyloučen z těla (Griffin et al. 2013). Mezi sloučeniny s dlouhodobým účinkem patří například diazepam, chlordiazepoxid a flurazepam. BZD se střednědobým účinkem jsou například klonazepam, lorazepam a estazolam. Krátkodobý účinek mají například alprazolam, oxazepam a midazolam (Iqbal et al. 2002). Riss et al. (2008) dělí BZD podle délky jejich působení podobně na krátkodobé (účinek <10 hodin), středně dobé (10-24 hodin) a na dlouhodobé (> 24 hodin) (Riss et al. 2008). Většina BZD je oxidativně metabolizována enzymy cytochromu P450 (fáze I), konjugovaná s glukuronidem (fáze II) a vylučována téměř zcela v moči. Některé BZD vyvíjejí další působení prostřednictvím produkce aktivních metabolitů (Griffin et al. 2013). Několik BZD navíc vytváří aktivní metabolity. Například diazepam je metabolizován do dlouhodobě působícího metabolitu DMD. Naproti tomu klonazepam nevytváří žádné aktivní metabolity (Riss et al. 2008).

3.6.4 Působení na nezralý mozek

Novorozenecký mozek je citlivý na teratogenní látky, které mají vliv na migraci neuronů a synaptickou organizaci. Zhoršené učení bylo připisováno benzodiazepinům (Kaindl et al. 2006). Studie, které byly prováděny na hlodavcích prokázaly, že užívání BZD během vývoje mozku vedlo k trvalé změně jeho funkce, ke změnám chování a ke kognitivním deficitům. Pokud je nervový systém vystaven těmto látkám po dokončení diferenciaci neuronů, ale před úplným dokončením zrání CNS, tj. během prvních 3 týdnů života u potkanů, dochází také k behaviorálním, biochemickým a molekulárním změnám (Kubová et al. 2018). Pokud jsou antiepileptika obecně používána u dětí, kojenců a těhotných žen, způsobují často kognitivní poruchy, mikrocefalii, různé vrozené vady a také dochází k opožděnému vývoji. Mohou mít také nepříznivé účinky na lidský intelekt (Bittigau et al. 2002). Užívání benzodiazepinů se v prvním trimestru těhotenství obvykle nedoporučuje, protože plod je v tomto období aktivní organogeneze nejzranitelnější vůči toxickým účinkům léků. Pokud jsou léky podávány kolem období porodu, mohou způsobit závislost již u plodu a eventuální abstinční příznaky. Žádné benzodiazepiny nebyly ovšem testovány přímo těhotnými a kojícími ženami, aby se zjistily účinky na plod, novorozence nebo na kojící dítě. (Iqbal et al. 2002). Benzodiazepiny se také vylučují do mateřského mléka a kojenci jsou zvláště citliví na jejich účinky (Norman et al. 1997). Aby se zabránilo potenciálnímu riziku vrozených vad,

měli by lékaři užívat benzodiazepiny, které mají dlouhodobé záznamy o bezpečnosti a měly by předepisovat benzodiazepiny jako monoterapii při nejnižší účinné dávce za co nejkratší dobu (Iqbal et al. 2002). Krátkodobé a dlouhodobé škodlivé účinky vyplývající z jakéhokoli zásahu do normálního vývoje mozku a liší se podle povahy interference a vývojové období podání léčiv (Turski & Ikonomidou 2012). V posledních několika desetiletích poskytly studie provedené u hlodavců podstatné informace o vývoji mozku. I když existují rozdíly v míře růstu mozku u savců, je možné srovnávat vývoj mozku mezi druhy. Vývojový věk embryí a plodů člověka a potkana je srovnatelný, když jsou anatomické rysy a histologické orientační body u obou druhů podobné. V CNS jsou struktury budovány proliferací buněk, migrací a sekvencí kroků nazývaných diferenciací. Jakýkoli farmakologický zásah do těchto kritických vývojových období může mít negativní dopad na vývoj mozku (Kaindl et al. 2006).

V nedávných studiích bylo zjištěno, že sloučeniny, které se používají jako sedativa, anestetika nebo antikonvulziva v medicíně, vyvolávají rozsáhlou apoptotickou neurodegeneraci v celém vývoji mozku, pokud se podávají hlodavcům během období růstu mozku. Takové sloučeniny zahrnují léčiva, která mění fyziologickou synaptickou aktivitu, tj. antagonisty NMDA receptorů (ketamin), agonisty receptorů GABA_A (barbituráty, benzodiazepiny) a blokátory sodíkových kanálů (fenytoin, kyselina valproová). Období růstu mozku se vyskytuje v různých časových obdobích v závislosti na druhu. U potkanů a myší se vyskytuje postnatálně, ale u lidí nastává od šestého měsíce březosti a probíhá ještě několik let po narození (Kaindl et al. 2006). Ukázalo se, že diazepam a klonazepam způsobují apoptotickou neurodegeneraci v rozvíjejícím se mozku potkanů, jak dokládají ve svém výzkumu Bittigau et al. (2002). Ve své studii prokázali, že aplikace diazepamu v dávce 5 – 30 mg/kg potkanům ve věku P7 způsobí rozsáhlou apoptotickou neurodegeneraci. Neurotoxické účinky byly rovněž prokázány po aplikaci klonazepamu v množství 0,5 – 4 mg/kg u potkanů ve věku P7. Rovněž také uvádějí, že prahové dávky pro vyvolání apoptotického poškození mozku byly 10 mg/kg pro diazepam a 0,5 mg/kg pro klonazepam. Tyto dávky způsobily sedaci (Bittigau et al. 2002). Testováním benzodiazepinu diazepamu v prvních postnatálních dnech života potkanů prokázali rovněž také Turski & Ikonomidou (2012), že farmakologická aktivace receptoru GABA_A narušuje buněčnou proliferaci a inhibuje neurogenezi u nezralého mozku potkanů (Turski & Ikonomidou 2012). Rovněž výzkum Stefovské et al. 2008 ukázal, že po aplikaci diazepamu a látky ze skupiny barbiturátů - fenobarbitalu potkaním mláďatům ve věku P6 – P10 bylo ovlivněno učení spolu s pamětí při následném testování ve věku 6 měsíců. Fenobarbital, který působí zvýšením vazby GABA na receptory GABA_A výrazně potlačuje buněčnou proliferaci a inhibuje neurogenezi, když je podáván mláďatům ve věku mezi P0 a P18. Diazepam vyvolal podobné, ale méně výrazné potlačení proliferace. Tyto účinky mají dlouhodobé histopatologické a behaviorální důsledky v dospělosti, to znamená, že mají za následek nižší neuronovou hustotu v oblastech hipokampu (například v oblasti zvané dentate gyrus) a korelují se sníženou pamětí a učením. Zjištění, že léky snižují počet nově narozených buněk v prakticky všech sledovaných oblastech mozku, naznačuje, že léčba těmito sloučeninami může také ovlivnit gliogenezi a angiogenezi (Stefovská et al. 2008).

Kaindl et al. (2006) rovněž prokázal, že dávky fenobarbitalu (20 - 100 mg/kg), diazepamu (5 - 30 mg/kg) a klonazepamu (0,5 - 4 mg/kg) způsobily rozsáhlou apoptotickou neurodegeneraci v mozku potkanů ve věku P7. Prahové dávky pro vyvolání apoptotického poškození mozku byly 40 mg/kg pro fenobarbital, 10 mg/kg pro diazepam a 0,5 mg/kg pro

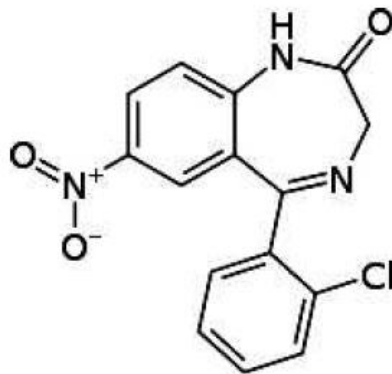
klonazepam. Rovněž aplikace jednorázové dávky diazepamu (5 mg/kg) ve věku P11 indukovala významné snížení mitotické aktivity v kůře mozečku hlodavců a přední hypofýze (Kaindl et al. 2006).

Neurotransmitery jsou tedy velmi důležité při vývoji mozku. Sloučeniny, které potlačují synaptickou aktivitu v mozku a jsou používány jako sedativa, anestetika nebo antikonvulziva v neonatálním období spouští rozsáhlou apoptotickou neurodegeneraci v celém vyvíjejícím se mozku, pokud jsou podávány hlodavcům během období růstu mozku. U potkanů a myši se vyskytuje postnatálně, u lidí nastává od šestého měsíce těhotenství a probíhá několik let po narození a shoduje se s obdobím neuroapoptózy. Časná postnatální léčba agonisty GABA jsou spojeny s poruchou učení a paměti. Agonisté GABA způsobují podstatnou neuroapoptózu ve vyvíjejícím se mozku potkanů, která zahrnuje kortikální a subkortikální mozkové oblasti, včetně hipokampu. V této studii Stefovská et al. (2008) uvádějí, že tyto sloučeniny také narušují neurogenezi, ale není možné oddělit vliv apoptózy a neurogeneze na učení a paměť. Podobně Kubová et al. (2018) uvádí, že GABA hraje důležitou roli při tvorbě neuronových obvodů během časného postnatálního vývoje. Dřívější studie ukázaly zvýšené riziko nežádoucích neurologických následků u zvířat vystavených benzodiazepinům, které zvyšují inhibici GABA prostřednictvím receptorů GABA_A. Zjistili, že podávání benzodiazepinového klonazepamu (CZP) během postnatálních dnů 7–11 mělo za následek trvalé změny chování (Kubová et al. 2018).

3.6.5 Klonazepam

Klonazepam Je benzodiazepin s antikonvulzivními a anxiolytickými účinky. Pro klinické použití je dostupný od roku 1973 (Iqbal et al. 2002). Klonazepam působí jako agonista receptoru GABA_A a serotoninu. Má velmi silné a dlouho trvající účinky a patří do skupiny BZD, které mají nízkou lipidovou rozpustnost. Vedlejší účinek v podobě vzniku anterográdní amnézie by měl být minimální, ve srovnání s jinými BZD, které mají vysokou lipidovou rozpustnost. Klonazepam má také relativně slabší vazebnou afinitu k receptorům GABA_A, než ostatní BZD (Griffin et al. 2013). Bylo prokázáno, že klonazepam je účinný při léčbě pacientů s částečnými i generalizovanými záchvaty. Klonazepam může být také užitečný při léčbě pacientů s myoklonickými záchvaty. Je považován za léčivou látku volitelnou u některých vzácných dětských epilep. syndromů. Účinný je také u status epilepticus. Několik studií ukázalo, že intravenózní užívání klonazepam u status epilepticus ukázalo účinnost u přibližně 80 – 90 % pacientů (Riss et al. 2008). U dospělých je klonazepam metabolizován primárně hydroxylací, ale tato metabolická cesta je zpravidla narušena u novorozenců. Poločas rozpadu je u dospělých 20 až 60 hodin. Přestože poločas rozpadu klonazepam u novorozenců není znám, poločasy jiných benzodiazepinových derivátů jsou u novorozenců dva až čtyřikrát delší než u dospělých. I když nejsou studie, které by jasně ukládaly zákaz používání tohoto léku v době těhotenství, měl by být klonazepam užíván během těhotenství, pouze pokud klinický přínos pro matku odůvodňuje možné riziko pro plod. Stejně jako u mnoha jiných benzodiazepinů se klonazepam vylučuje do mateřského mléka. Nebyly nalezeny žádné publikované studie o použití klonazepam během kojení (Iqbal et al. 2002). Aplikace klonazepam v časných stádiích postnatálního vývoje potkanů

ovlivňuje receptory NMDA a AMPA, a to jak krátce po ukončení aplikace, tak dlouhodobě (Kubová et al. 2018).

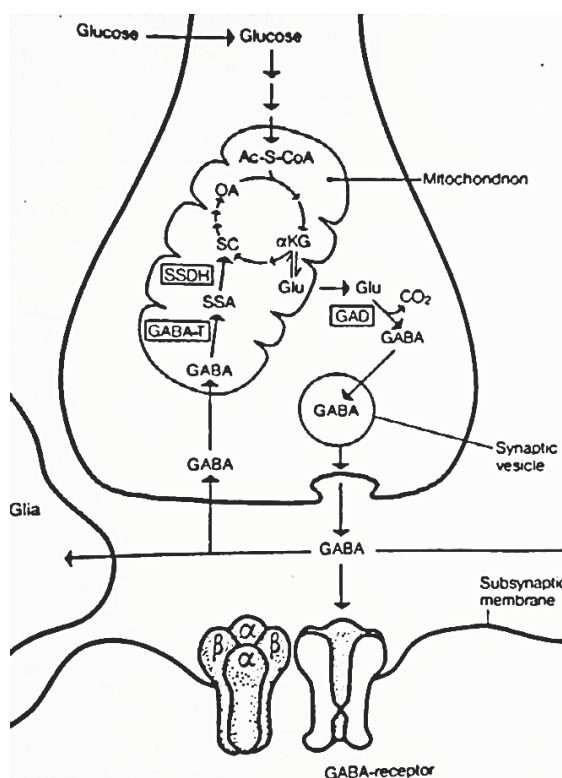


Obrázek 8: Chemická struktura klonazepamu (Griffin et al. 2013)

3.7 GABAergní neurotransmise

3.7.1 GABAergní systém

Kyselina γ – aminomáselná (GABA) je hlavním inhibičním neurotransmiterem v centrálním nervovém systému (CNS) obratlovců (Michels & Moss 2007). Odhaduje se, že přibližně jedna třetina všech synapsí v mozku se je GABAergních. Tyto GABAergní synapse jsou životně důležité pro funkci CNS. Jakákoli nežádoucí změna GABAergní synaptické funkce může vést k hyperexcitabilitě, která je doprovázena křečemi a může končit smrtí. GABA vzniká dekarboxylací kyseliny glutamové v subpopulaci CNS neuronů nazývaných GABAergní. GABA je uložena v synaptických vezikulách v nervových zakončeních GABAergních neuronů a je uvolňována exocytózou do synaptické štěrbině, když akční potenciál generovaný v těle nervových buněk dosáhne terminálů. Inaktivace uvolněné GABA nastává prostřednictvím aktivního buněčného transportu zpět do GABAergních nervových zakončení a gliových buněk, kde může být metabolizována transaminací. GABA uvolněná do synaptické štěrbině interaguje s receptory GABA, které jsou zakotvené v subsynaptické membráně (Haefely 1989). Rozeznáváme 3 typy receptorů: GABA_A, GABA_B a GABA_C. Inhibiční účinek GABA je zprostředkován buď receptory GABA_A, což jsou ionotropní receptory, které řídí prostupnost chloridového kanálu pro Cl⁻, nebo metabotropní receptory GABA_B, které mají spojitost s G proteinem (Michels & Moss 2007).



Obrázek 9: Tento schématický diagram zobrazuje GABAergní synapsi s GABAergním nervovým terminálem (nahore) obsahujícím mitochondrii a synaptický váček. Postsynaptický GABA - senzitivní neuron (dole), synaptickou štěrbinu mezi oběma terminály a gliovou buňku. Glutamát syntetizovaný v Krebsově cyklu je dekarboxylován prostřednictvím GAD (dekarboxylace kyseliny glutamové) na GABA. GABA - T = GABA transamináza, SSA = semialdehyd kyseliny jantarové, SC = kyselina jantarová (Haefely 1989).

3.7.2 GABAergní receptory

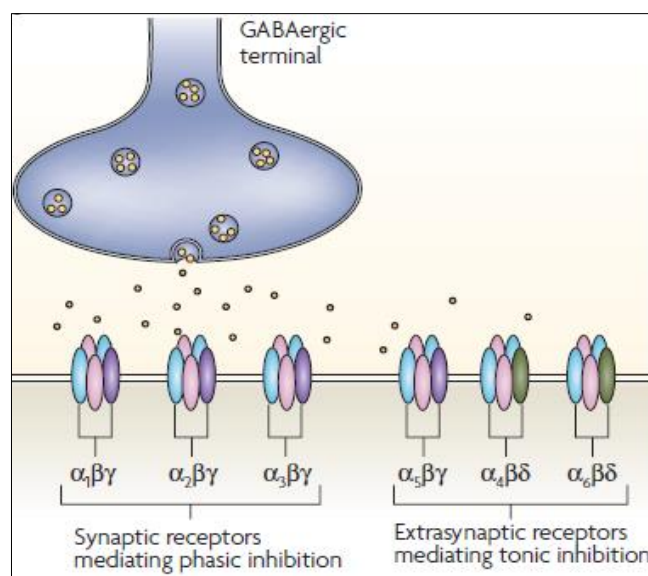
Existují 3 hlavní subtypy GABA receptorů. GABA_A receptory jsou ligandem aktivované iontové kanály, které jsou selektivně blokovány látkou zvanou bikukulin. Modulátory tohoto receptoru jsou naopak steroidy, benzodiazepiny a barbituráty (Riss et al. 2008). Klasifikace receptorů GABA_A / B, zavedená v roce 1981, definuje receptory GABA_A jako citlivé na antagonismus bikukulinu a necitlivé na baklofen, zatímco receptory GABA_B jsou necitlivé na antagonismus bikukulinu a jsou aktivovány baklofenem. Receptory GABA_A a GABA_B se liší nejen v jejich farmakologii, ale i v jejich funkčnosti. GABA_A receptory jsou ionotropní receptory a jsou to také ligandem řízené iontové kanály. Receptory GABA_B jsou spojeny se systémem druhého messengeru (druhého posla) a tak se podobají muskarinovým receptorům acetylcholinu, většině receptorů 5-HT a metabotropním glutamátovým receptorům. Receptory GABA_A a GABA_B mají jak presynaptické, tak postsynaptické umístění na neuronech. Oba subtypy jsou heterogenní (Johnston 1996). GABA_B receptor, který je vázán na G proteiny je přítomen v nižších hladinách v CNS, než je tomu u receptoru GABA_A a začíná působit později ve vývoji CNS (v postnatálním období života u hlodavců) (Herlenius & Lagercrantz 2004). Postsynaptické odezvy zprostředkované receptorem GABA_B (aktivace K⁺ a inhibice Ca²⁺ proudů) chybí u embryonálních a neonatálních hipokampálních a neokortikálních neuronů potkanů až do konce prvního postnatálního týdne života. V nápadném kontrastu je presynaptická inhibice zprostředkovaná receptory GABA_B již funkční při narození a poskytuje silnou inhibiční kontrolu aktivity neonatální sítě (Ben-Ari et al. 1997).

GABA_B receptor se skládá s propojených G proteinů, sedmi transmembránových receptorů, které jsou selektivně aktivovány (R)-(-)-baklofenem a 3-aminopropylfosfinovou kyselinou, přičemž jsou blokovány Baklofenem (Riss et al. 2008). Receptory GABA_C mohou představovat relativně jednoduchou formu iontových kanálů s ligandem, které jsou tvořeny oligomerními podjednotkami, na rozdíl od heterooligomerních receptorů GABA_A. Jejich celková farmakologie se jeví jednodušší než u klasických receptorů GABA_A, zejména s ohledem na nedostatečnou modulaci neurosteroidy, benzodiazepiny (Johnston 1996) a barbituráty. Receptory GABA_C, jsou selektivně aktivovány určitými konformačně omezenými analogy GABA (Riss et al. 2008). Heterogenita receptorů GABA_A je výsledkem asociace pěti podjednotek v řadě kombinací za vzniku jednoduchého komplexu iontového kanálu s ligandem (Johnston 1996). Rychlé inhibiční účinky GABA jsou zprostředkovány aktivací receptorů GABA_A v mozku a receptorech GABA_C na sítnici, zatímco jeho pomalé, prodloužené účinky jsou zprostředkovány receptory GABA_B spojenými s metabotropním G-proteinem (Jacob et al. 2008).

3.7.3 GABA_A receptor

Receptory GABA_A jsou ligandem aktivované ionotropní receptory, propustné pro chlorid a hydrogenuhličitan (bikarbonát) (Braat & Kooy 2015). Obvykle se nacházejí na postsynaptických místech neuronů (Michels & Moss 2007). Funkčně se receptory skládají z pěti podjednotek (Braat & Kooy 2015). V závislosti na složení podjednotek vykazují tyto receptory odlišné farmakologické a fyziologické vlastnosti (Herlenius & Lagercrantz 2004).

Molekulární studie ukázaly, že GABA_A receptory jsou součástí většího systému (tzv. nadrodiny) ligandově řízených iontových kanálů. Do tohoto systému patří například nikotinové, acetylcholinové a glycinové receptory (Jacob et al. 2008). Strukturně jsou GABA_A receptory považovány za pentamerické heterooligomery (Jacob et al. 2012), které jsou složeny z řady homologních podjednotek, které sdílejí společnou strukturu. Jacob et al. (2008) ve své práci uvádějí 18 známých podjednotek GABA_A receptorů: α (1–6), β (1–3), γ (1–3), δ , ϵ (1–3), θ a π (Jacob et al. 2008). Dnes je však známo 19 těchto podjednotek: α 1–6, β 1–3, γ 1–3, δ , ϵ , θ , π a ρ 1–3. Tato náhodná sestava má za následek komplexní heterogenitu subtypů receptoru GABA_A (Braat & Kooy 2015). Tvrzení, že jsou receptorové podjednotky sestaveny z kombinací 19 polypeptidů (tj. α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , π , θ a ρ 1-3) potvrzuje také Riss et al. (2008). Rovněž dodávají, že počet a typy podjednotek se liší v závislosti na umístění receptoru v CNS (Riss et al. 2008). Například receptory GABA_A obsahující α 5 podjednotky jsou lokalizovány hlavně v soma, dendritech a axonech hipokampálních neuronů, zatímco α 2 podjednotky jsou koncentrovány v počátečním segmentu axonů. Podjednotky obsahující α 4, α 5, α 6 a δ jsou umístěny extrasynapticky, zatímco všechny ostatní podjednotky receptoru GABA_A, zejména γ 2 jsou přednostně exprimovány na synaptickém místě (Michels & Moss 2007).



Obrázek 10: GABA_A receptory s podjednotkami α (1–3), β a γ jsou primárně synapticky lokalizované, zatímco receptory s podjednotkami α 5 β γ jsou umístěny převážně na extrasynaptických místech. Oba tyto GABA_A receptory jsou citlivé na Benzodiazepiny. Naproti tomu receptory složené z α (4 nebo 6) β δ jsou necitlivé na benzodiazepiny a jsou lokalizovány na extrasynaptických místech (Jacob et al. 2008).

Díky vazbě benzodiazepinů, barbiturátů a ethanolu na specifická místa GABA_A receptoru dochází k modulaci otevírací vlastnosti chloridového kanálu. (Herlenius & Lagercrantz 2004). Strukturní diverzita GABA_A receptorů je dále zvýšena alternativním sestřihem některých receptorových mRNA (Jacob et al. 2008). Nejvýznamnější subtyp receptoru GABA_A v mozku obsahuje podjednotky α 1, β n a γ 2. Receptory GABA_A, které obsahují podjednotky α 1-3, β n a γ 2 jsou převážně synaptické, zatímco receptory obsahující α

4–6 a δ jsou převážně perisynapticky, nebo extrasynapticky umístěny. Synaptické receptory zprostředkují rychlou fázovou inhibici, zatímco extrasynaptické receptory způsobují přetrvávající tonickou inhibici (Braat & Kooy 2015).

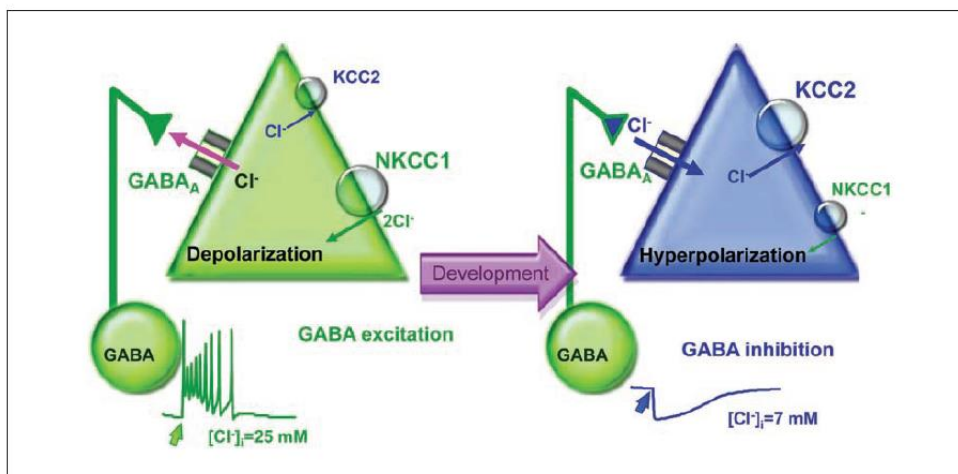
3.7.4 Funkce GABA_A receptoru

GABA_A receptor je spojen s transmembránovým iontovým kanálem (ve skutečnosti je to nedílná součást tohoto kanálu) selektivně propustný v jeho otevřené formě pro anionty, zejména chloridové ionty (Haefely 1989). Když se GABA naváže extracelulárně mezi podjednotku α a β (přibližně v místě benzodiazepinového receptoru), působí jako agonista, což indukuje konformační změny komplexu receptoru GABA_A a zvyšuje se propustnost pro Cl^- ionty (Michels & Moss 2007). Aktivace GABA_A receptoru, tj. tvorba reverzibilního komplexu receptoru s GABA a výsledná konformační změna v receptoru, vyvolává otevření kanálu, který je v uzavřené konformaci v nepřítomnosti GABA. V otevřené konformaci se ionty chloridů mohou pohybovat kanálem. Intenzita a směr (chloridového toku je určen elektrochemickým gradientem generovaným rovnovážným potenciálem a aktuálním membránovým potenciálem. Vtékání chloridu zvyšuje intraneuronální negativitu tím, že hyperpolarizuje neuron. (Haefely 1989). Přítok iontů Cl^- a HCO_3^- hyperpolarizuje buňku a tím zabrání šíření akčního potenciálu na membráně neuronu. Dochází tedy k obecnému inhibičnímu účinku v neuronální aktivitě. Díky zmíněné hyperpolarizaci a inhibici může docházet k sedativním a antikonvulzivním účinkům způsobeným benzodiazepiny, anestetiky, neurosteroidy a alkoholem, které působí na receptory GABA_A. Zatímco intravenózní anestetika (př. barbituráty) interagují s více receptory, benzodiazepiny působí primárně jako pozitivní alosterické modulátory pouze receptoru GABA_A. Pro udržení fyziologického hyperpolarizačního účinku GABA je nutné zachovat stabilní Cl^- gradient pumpami různých iontových transportérů. Příkladem může být neuron - specifický membránový protein v CNS. Draslíko - chloridový kotransportér typu 2 (KCC2) umožňuje regulaci Cl^- i K^+ v neuronech pro udržení elektrochemických gradientů pro hyperpolarizaci GABAergní inhibice. Směr toku Cl^- (dovnitř nebo ven) přes GABA_A receptor závisí na chloridovém gradientu přes plazmatickou membránu. V počátečním segmentu axonů (AIS = axon initial segments) a v rané fázi vývoje neuronů není KCC2 exprimován a vnitřní koncentrace Cl^- je vysoká. V této situaci může docházet k přechodu Cl^- směrem ven, což má za následek depolarizační odpověď prostřednictvím aktivace napětově řízených Ca^{2+} kanálů. Další kotransportér je NKCC1. GABA funguje hlavně jako excitační vysílač na nezralých neuronech a jako inhibiční vysílač během zrání (Michels & Moss 2007). GABA_A receptory jsou také cílenými receptory pro léčbu antikonvulzivními, anxiolytickými a sedativními hypnotiky (Jacob et al. 2008). Většina těchto sloučenin se váže na alosterická místa receptoru. Dobře známé alosterické modulátory zahrnují benzodiazepiny, které mají antikonvulzivní a anxiolytické účinky. Bylo zjištěno, že podjednotky $\alpha 1$ zprostředkovávají sedativní účinky, zatímco podjednotky $\alpha 2 / 3$ zprostředkovávají anxiolytické účinky (Braat & Kooy 2015). Deficity ve funkční expresi GABA_A receptorů jsou kritické pro epilepsii, úzkostné poruchy, kognitivní deficity, schizofrenii a depresi (Jacob et al. 2008).

3.7.5 Změny v průběhu vývoje

Jak již bylo zmíněno výše, GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem zralého CNS, což znamená, že hyperpolarizuje membránový potenciál a tlumí neuronální excitabilitu (Watanabe & Fukuda 2015). Působení GABA na GABA_A receptor vede k otevření chloridových kanálů a dochází k přesunu Cl⁻ do intracelulárního prostoru, nebo z něho ven. Směr toku Cl⁻ je určen elektrochemickým gradientem (Nuñez & McCarthy 2007). Funkční receptory GABA_A jsou exprimovány v neuronech již v embryonálních stádiích. Během vývoje dochází ke změně GABAergního působení z inhibičního na excitační. Přechodný excitační účinek GABA přes receptory GABA_A představuje obecný rys vyvíjejících se neuronů. Tyto změny pravděpodobně vyplývají z vývojových změn v systémech homeostázy Cl⁻ (Ben - Ari et al. 1997). V období časného vývoje je koncentrace Cl⁻ v nervových buňkách vysoká (Herlenius & Lagercrantz 2004). Aktivace receptorů GABA_A v prenatalním a neonatálním období vede k přesunu Cl⁻ do extracelulárního prostoru a depolarizaci membrány, která je dostatečná k otevření vápníkových kanálů citlivých na napětí. Do poloviny druhého postnatálního týdne u potkanů má aktivace receptoru GABA_A za následek přesun Cl⁻ do intracelulárního prostoru a hyperpolarizaci hipokampálních neuronů. Gradient intracelulární koncentrace chloridů ve vyvíjejících se neuronech je primárně řízen chloridovými kotransportéry NKCC1 (Na⁺, K⁺, 2Cl⁻) a KCC2 (K⁺, Cl⁻). V hipokampu novorozených potkanů jsou hladiny NKCC1, podporující vstup Cl⁻ do buňky vysoké, zatímco hladina KCC2 podporující výstup („vytlačování“) Cl⁻ z buňky je nízká. Postnatálním dnem P7 - P14 dochází ke změně. KCC2 je zvýšený a protein NKCC1 je podstatně snížen (Nuñez & McCarthy 2007). K expresi KCC2 dochází okolo doby porodu v mozkovém kmeni, 1 týden po narození v hipokampu a mezi 1 až 2 týdny v kůře mozku u potkanů (Herlenius & Lagercrantz 2004). Aktivace receptoru GABA_A v hipokampálních neuronech potkana se mění z indukce membránové depolarizace (excitace) na membránovou hyperpolarizaci (inhibici) během téže doby. Posun od depolarizace zprostředkované receptorem GABA_A k hyperpolarizaci je přirozeně se vyskytující vývojový jev. Již ve druhém postnatálním týdnu je působení GABA v hipokampu potkanů převážně inhibiční (Nuñez & McCarthy 2007). Také Watanabe & Fukuda (2015) uvádějí, že akumulace Cl⁻ zprostředkovaná NKCC1 vede ke zvýšení intracelulárních hladin Cl⁻ v neuronových prekurzorech a nezralých neuronech. To umožňuje depolarizující (excitační) působení GABA ve vyvíjejícím se mozku. KCC2 naopak snižuje hladiny Cl⁻ a umožňuje hyperpolarizační účinek GABA ve zralém mozku (Watanabe & Fukuda 2015). Vývoj GABAergního systému je úzce spojen s vývojem NMDA (receptor N - methyl - D - asparagové kyseliny) a AMPA (receptor α - amino - 3 - hydroxy - 5 - methyl - 4 - isoxazolepropionové kyseliny) receptoru. Přepínání v GABAergních účincích od depolarizace na hyperpolarizaci paraleluje s upregulacemi NMDA a AMPA receptorové exprese, ke kterým dochází během prvního postnatálního týdne (Kubová et al. 2018). Glutaminergní synapse zpočátku postrádají funkční AMPA receptory a NMDA kanály jsou blokovány Mg⁺ při klidových membránových potenciálech. GABA depolarizuje nezralé neurony, což může mít za následek tok Ca⁺ do buňky po odstranění Mg⁺, který blokuje NMDA kanály pro vstup dalších iontů. Receptory GABA_A tedy mají roli v nezralém mozku, kterou přebírají receptory AMPA ve zralém CNS. Zvýšení intracelulární koncentrace Ca⁺ aktivuje široké spektrum intracelulárních kaskád a podílí se na růstu a diferenciaci neuronů.

Kromě toho může excitace GABA a přítok Ca^{2+} působit jako spoušť pro plasticitu synaptických spojení a pro vytváření a modelování neuronových sítí (Ben-Ari et al. 1997; Herlenius & Lagercrantz 2004).



Obrázek 11: Posunutí účinku GABA je zčásti určeno sekvenčním vývojem dvou hlavních chloridových kotransportérů NKCC1 a KCC2. NKCC1, který je zodpovědný za import Cl^- je přítomen již v děloze. KCC2 zodpovědný za export Cl^- plně funguje až u zralých neuronů, NKCC1 je poté méně aktivní. Toto vede k vyšší akumulaci Cl^- v nezralých neuronech (Ben – Ari et al. 2012).

Během vývoje mozku působí GABA jako trofický faktor ovlivňující události, jako je proliferace, migrace, diferenciacce, zrání synapsí a buněčnou smrt (apoptózu). Je to zásadní transmitter pro mládě. Vyloučení vitamínu B6 z kojenecké výživy mělo za následek fatální záchvaty a následné úmrtí v důsledku nedostatku GABA (Herlenius & Lagercrantz 2004). V nezralém savčím mozku může být během období rychlého růstu mozku /období synaptogeneze neuronální apoptóza spouštěna přechodnou blokadou receptorů glutamátu N-methyl-D aspartátu (NMDA) nebo nadměrnou aktivací GABA_A receptorů. Apoptogenní látky zahrnují anestetika (například ketamin, oxid dusný, propofol apod.), antikonvulziva (benzodiazepiny, barbituráty) a také látky jako například ethanol. U lidí začíná růst mozku v šestém měsíci těhotenství a prodlužuje se až do třetího roku života jedince. Ethanol, který má jak antagonisty NMDA, tak agonisty GABA_A , je zvláště účinný při spouštění široce rozšířené apoptotické neurodegenerace během tohoto zranitelného období (Ikonomidou et al. 2001).

4 Metodika

Experimentální část diplomové práce byla provedena ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky (sídlo Krč) na oddělení vývojové epileptologie. Experiment byl schválen odbornou komisí Akademie věd České republiky a je v souladu se zákonem ČR o ochraně zvířat proti týrání (zákon č. 246/1992 Sb.) a v souladu s vyhláškou o ochraně pokusných zvířat (vyhláška č. 419/2012 Sb.).

4.1 Experimentální zvířata

Pro experiment mělo být použito 20 albinotických samců laboratorního potkana kmene Wistar. Před koncem experimentu bohužel 2 zvířata onemocněla, vykazovala nezvyklé projevy chování a musela být z celkového vyhodnocení vyřazena. Do věku P42 bylo tedy testováno všech 20 samců, poté pouze 18. Výsledná data pocházejí od 18 zvířat.

První postnatální den - P1 (datum narození značíme jako P0), byla zvířata pocházející z několika vrhů náhodně rozdělena do 2 vrhů tak, aby každý vrh obsahoval 10 samců a jednu dospělou samici, matku. Díky tomuto opatření je možné vyloučit přímý vliv jednoho vrhu na výsledek experimentu, neboť z každého vrhu bylo vybráno pouze omezené množství zvířat. Každý vrh byl umístěn ve standardní plastové kleci s mřížkou pro podávání krmiva, a napáječkou. Pro pokus byla použita pouze zvířata samčího pohlaví, neboť říje samic a výkyvy hormonální hadiny by mohly náš experiment značně ovlivnit. V každém vrhu bylo vždy 5 tzv. kontrolních zvířat (označena jako C) a 5 zvířat, kterým byla v období od 7 do 11 dne věku podávána dávka Benzodiazepinu – klonazepamu (označena jako CZP). Během experimentu, po dosažení věku 28 dní (P28), byli potkani odstaveni a separováni od matky. Současně s odstavem bylo provedeno rozdělení zvířat do 4 klecí. Každá klec obsahovala po zbytek testování 5 potkaních samců. Mimo testování byla zvířata umístěna v místnosti speciálně pro toto určené. S ohledem na biorytmy zvířat zde byl udržovaný střídavý režim tmy a světla (měnící se v 6.00 a 18.00). Ke změnám tedy docházelo po 12 hodinách. V místnosti byla udržována konstantní teplota $22 \pm 1^\circ\text{C}$ a stálá vlhkost 50 - 60 %. Zvířata měla nepřetržitý přístup k vodě a peletovanému krmivu, které svým složením odpovídalo stáří zvířat. Do věku P28 bylo potkanům podáváno peletované krmivo s normovanými živinami pro mladá zvířata, od P28 dostávali krmivo pro dospělé. Takto nedocházelo k přílišnému tučnění zvířat.

4.2 Aplikace klonazepamu

Potkani označení jako CZP6 – CZP10 byli zváženi a v období od P7 do P11 jim byla podávána intraperitoneálně dávka klonazepamu. CZP byl suspendován ve fyziologickém roztoku chloridu sodného doplněném o Tween 80 (1 mg / 5 ml fyziologického roztoku a jedna kapka Tween 80). Takovýto roztok CZP byl podáván potkanům po dobu pěti po sobě jdoucích dní v množství 1mg / kg / den. Kontrolním zvířatům byla podána dávka fyziologického roztoku ve stejném množství. Dávka klonazepamu nebyla stanovena náhodně,

nýbrž na základě předchozí studie zaměřené na antikonvulzivní účinky CZP ve vývoji mláďat (Mikulecká et al. 2014a; Kubová et al. 2018).



Obrázek 12: Ukázka vážení potkanů a označení jednotlivých zvířat (Bc. Štěpánka Čejková, 2018)

Aby bylo možné oddělit od sebe jednotlivá zvířata, značil se permanentním popisovačem jejich ocas. Příklad takového označení je možné vidět na obrázku č.1. (zvíře má číslo 7). Každá slabší značka značí jednotku, sinější potom číslici 5.

4.3 Postup testování

K testování byl použit open field test (OF), neboli test otevřeného pole. Tento test je široce používaným nástrojem pro testování behaviorálních účinků léků a úzkostného chování. Lze ho využít pro řadu živočichů (různé druhy bezobratlých, ptáků a savců). Hojně je OF aréna využívána zejména pro testování hlodavců. Open field můžeme definovat jako ohraničenou, shora otevřenou oblast, kam je zvíře umístěno a kde je sledováno a měřeno jeho chování, nejčastěji aktivita. Nejčastěji používaná OF aréna má tvar čtverce (černá čtvercová plastová krabice), ale rozměry i barva se mohou pro jednotlivé experimenty značně lišit. Vzhledem k jeho širokému využití existuje v podobě OF široká variabilita (Choleris et al. 2001).

V tomto experimentu byla použita OF aréna tvaru čtverce černé barvy. Velikost byla zvolena na základě stáří pokusných zvířat. Ve věku potkanů P21 – P31 byla použita OF aréna o rozměrech 50 x 50 cm a výšce zdí 40 cm. Ve věku P35 – P45 byla použita OF aréna o velikosti 80 x 80 cm a výšce zdí 40 cm.

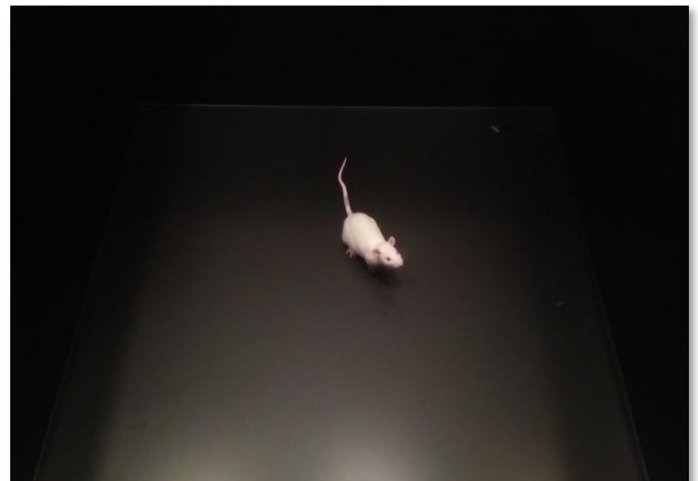
Behaviorální testování bylo zahájeno ve věku 21 dní (P21) s opakováním ve 4 po sobě jdoucích dnech, a to ve věku P21 – P24, P28 – P31, P35 – P38 a P42 – P45. Tato vývojová období byla stanovena záměrně, neboť korespondují s ranně školním věkem až adolescencí u člověka. Potkani byli přineseni do experimentální místnosti 30 minut před samotným zahájením pokusu, aby došlo k dostatečné adaptaci na testovací místnost. Experiment probíhal vždy ve stejném časovém období, v rozmezí 9.00 – 15.00h za přítomného osvětlení 35 - 45 lx a

konstantní teploty 22 ± 2 °C. V místnosti panoval po celou dobu testování absolutní klid. Zvířata byla vždy po jednom vkládána do levého rohu open fieldu a jejich chování bylo pozorováno opticky a snímáno kamerou po dobu 15 minut. Po uplynutí pozorovací doby byl potkan navrácen zpět k sourozencům a open field byl vyčištěn a umyt dezinfekcí (Ajatin 10 % roztok), aby došlo ke smytí pachových stop. Další zvíře se tedy nemohlo orientovat podle pohybové trajektorie zvířete předchozího. Zaznamenané chování bylo následně analyzováno programem Noldus EthoVision XT 13 ® (Noldus Information Technology). EthoVision je tzv. „video tracking software“, který nahrává a následně analyzuje chování, pohyb a aktivitu pozorovaných zvířat.

Potkani byli také váženi ve věku P8, P11, P12, P13, P14, P15, P18, P19, P21, P28, P35 a P42. Hmotnostní přírůstky byly porovnávány mezi C a CZP zvířaty. Výsledky jsou uvedeny v další části této diplomové práce.



Obrázek 13: Testovací místnost s malým OF (Bc. Štěpánka Čejková, 2018)



Obrázek 14: Potkan ve věku P35 umístěný ve velkém OF (Bc. Štěpánka Čejková, 2018)

4.4 Sledované ukazatele

Během experimentu byly sledovány celkem 3 měřitelné ukazatele, které byly následně vyhodnoceny příslušným programem. Zvířata byla také během pokusu sledována a jejich chování bylo zaznamenáváno do poznámek. Jednalo se například o skutečnost, že potkani s aplikovaným CZP se v určité době testování snažili vyskakovat z testovacího pole OF, panáčkovali apod.

Zde jsou uvedeny všechny parametry, které byly sledovány:

Celková vzdálenost v OF ("distance moved")

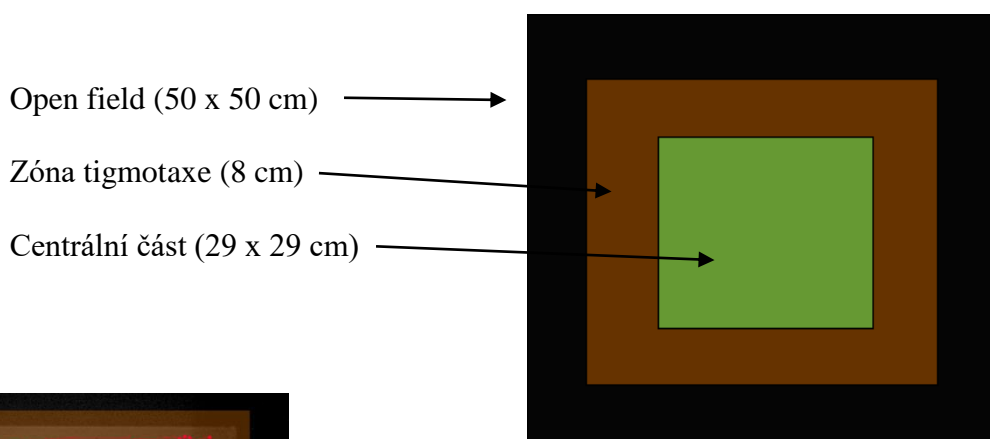
Tento ukazatel představuje vzdálenost, kterou potkan celkově v open fieldu (OF) uběhl během 15 minut. Hodnocen byl pohyb podél stěn OF, nebo v jeho centru. Vzdálenost je udána v centimetrech. Pomocí celkové vzdálenosti byla hodnocena habituace.

Doba setrvání potkana v centru OF ("center duration")

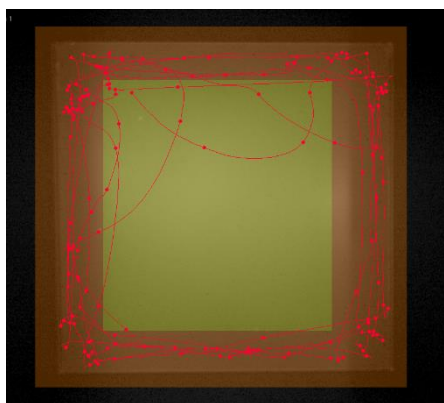
Ukazatel představuje celkovou dobu setrvání potkana v centru OF během 15 minut. Doba je uváděna v sekundách. Centrum OF znamená oblast 29 x 29 cm ve středu OF arény. Tento ukazatel slouží ke zhodnocení anxiety.

Doba latence k 1. vstupu do centra OF ("center latency")

Tento ukazatel představuje časový úsek, který trvá od umístění zvířete do OF do doby, než zvíře vstoupí do centra OF. Ukazatel je uváděn v sekundách. Ukazatel slouží ke zhodnocení anxiety.



Obrázek 15: Rozložení jednotlivých oblastí OF arény. (Toto barevné rozlišení je pouze pro vyhodnocení příslušným programem. Ve skutečnosti zóny takto viditelné nejsou.) (RNDr. Nina Mikulecká, Ph.D.)



Obrázek 16: Příklad pohybové trajektorie z Open field testu (Bc. Štěpánka Čejková)

Jak již bylo uvedeno, pokus trval vždy 15 minut. Sledované veličiny byly vyhodnoceny za celých 15 minut pohybu potkana v OF, dále bylo těchto 15 minut rozděleno po 5 minutách na tři stejné úseky, které byly vyhodnocovány za účelem zjištění tzv. intrasession habituace (habituace v rámci jednoho sezení). Dále byla zjišťována intersession habituace (habituace mezi jednotlivými sezeními). První typ habituace zjistíme porovnáním naměřených hodnot mezi 5 minutovými intervaly, zatímco druhý typ habituace zjistíme porovnáním naměřených hodnot například mezi prvním a čtvrtým dnem.

V tomto experimentu jsme zvolili jako ukazatel paměti (habituace) explorační aktivitu. Pokud si je potkan schopný zapamatovat, že byl poli OF již několikrát vystaven, dojde u něho ke snížení explorační aktivity, tedy k habituaci. Teorie habituace ve spojitosti s novým prostředím je

následující. Pokud umístíme zvíře do nového prostředí, začne po určité době explarovat, následně se úroveň této explarace sníží. Tato redukce explarace, neboli lokomoční aktivity je nazývána habituací (Bolivar, 2009). Habituace je přirozený proces, který pomáhá organismům selektivně reagovat na biologicky významné podněty a ignorovat ty méně relevantní. Habituace je také považována za jednu z nejjednodušších forem učení (Harris 1943) a nachází se napříč různými kmeny zvířecí říše. Při habituaci vůči novému prostředí se uplatňují tzv. kognitivní mapy. Kdykoli organismus zkoumá nové prostředí, vytváří si vnitřní představu tohoto prostředí v hipokampu. Čím se tato kognitivní mapa stává kompletnější, tím nižší je úroveň explarace. Říkáme, že je organismus habituovaný na prostředí. Úroveň habituace může být určována na základě různých ukazatelů. U hlodavců je to například nejčastěji měřená uběhnutá vzdálenost. (Bolivar, 2009).

4.5 Statistická analýza

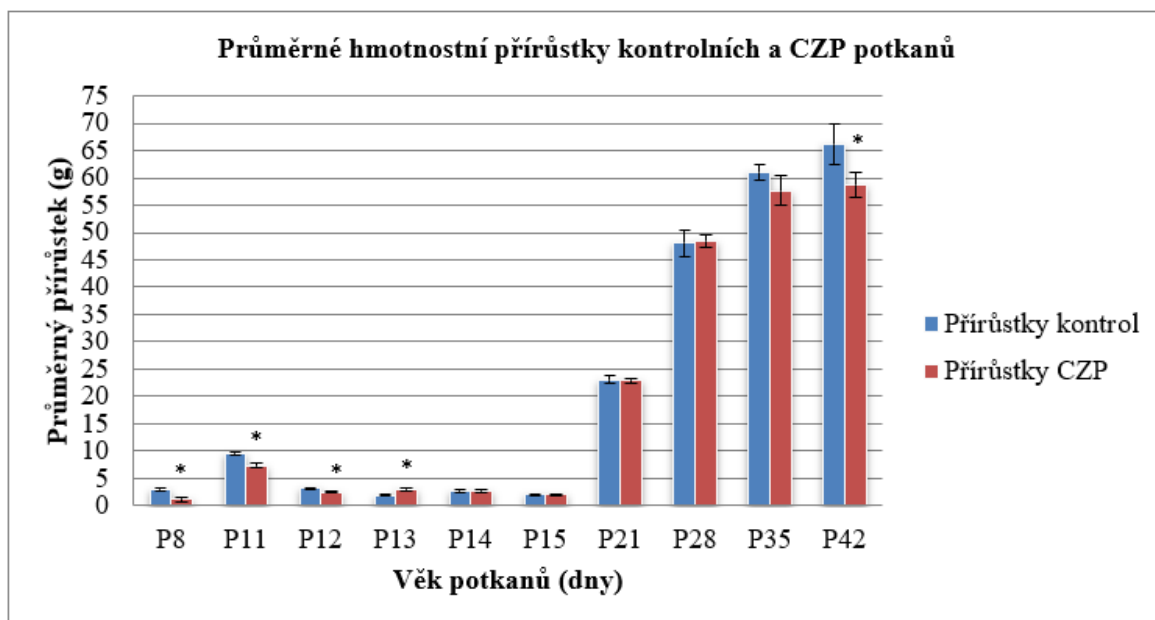
Videozáznamy získané během experimentu byly následně převedeny programem EthoVision XT 13 ® do číselných dat, která již bylo možné matematicky zpracovat a podrobit je analýze. K utřídění těchto číselných záznamů byl použit program MS Office Excel 2007 ® a k provedení statistického šetření byl použit program SigmaPlot, verze 10 ®. Jak již bylo uvedeno výše, analyzována byla vzdálenost, kterou potkan uběhl v testovacím poli, doba, kterou potkan strávil v centru OF a doba latence. Také byla sledována hmotnost pokanů a její změny během experimentu.

Všechna data jsou uváděna jako průměr a směrodatná odchylka. Data získaná za celých 15 minut pozorování byla analyzována prostřednictvím One – Way Repeated - Measures ANOVA, tj. jednofaktorová ANOVA pro opakovaná měření s jedním faktorem (léčba). K prozkoumání signifikantních rozdílů, které vyplívají z testu ANOVA bylo použito testu post – hoc Holm – Sidak method (porovnání jednotlivých věkových skupin mezi sebou). Jednotlivé intervaly byly analyzovány prostřednictvím Two – Way Repeated – Measures ANOVA, tj. dvoufaktorová ANOVA pro opakovaná měření se dvěma faktory (léčba x čas). K prozkoumání signifikantních rozdílů, které vyplívají z dvoufaktorové ANOVY bylo použito vícestupňového porovnávacího testu: Student – Newman - Keuls Method. Hmotnost pokanů byla statisticky testována pomocí dvouvýběrového t – testu pro nezávislá pozorování. Hladina významnosti (α) byla zvolena úměrně biologickým pokusům, a to 5 % ($p < 0,05$).

5 Výsledky

Během našeho experimentu byla provedena čtyři testování. První dvě testování probíhala v malém OF, druhá dvě testování probíhala ve velkém OF. Velikost OF byla v souladu se stářím laboratorních zvířat. První etapa testování potkanů byla provedena ve věku P21 – P24. Druhá etapa testování probíhala od P28 – P31. Třetí etapa testování probíhala od P35 – P38. Poslední (čtvrtá) etapa testování probíhala ve věku P42 – P45. Potkani byli během experimentu v jednotlivých dnech váženi. Hmotnostní přírůstky potkanů byly porovnávány mezi C a CZP zvířaty.

5.1 Vliv BZP na hmotnostní přírůstky zvířat

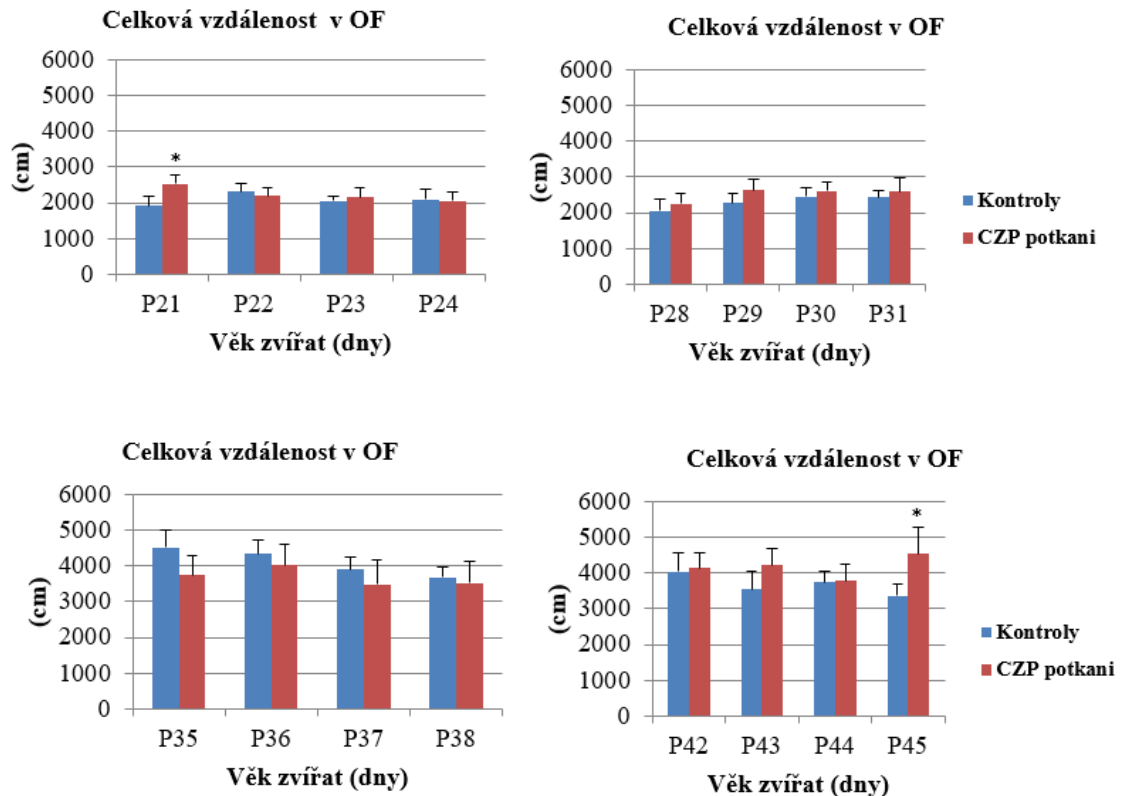


Obrázek 17: Hmotnostní přírůstky u kontrolních a CZP potkanů na dnech P8 – P42. Symbol * znamená signifikantní rozdíl v hmotnostním přírůstku mezi kontrolními a CZP potkany

Statistika prokázala signifikantní rozdíly v přírůstcích mezi C a CZP potkany na dnech P8 ($p < 0,001$), P11 ($p < 0,001$), P12 ($p = 0,004$), P13 ($p = 0,003$). Další statistický rozdíl je v přírůstcích na P42 mezi C a CZP zvířaty ($p = 0,009$). Kontrolní zvířata přibírala na váze více v době od P7 – P11 (doba aplikace CZP), než zvířata s aplikovaným léčivem. Poté se hmotnostní přírůstky téměř vyrovnali. Další tendence k vyšším hmotnostním přírůstkům kontrolních zvířat můžeme pozorovat od věku P28 (období odstavu). Statistické šetření prokázalo ovšem signifikantní rozdíl pouze v přírůstku z P35 na P42 mezi C a CZP zvířaty.

5.2 Celková vzdálenost („distance moved“)

5.2.1 Habituační intersession



Obrázek 18: Celková vzdálenost hodnocená za celých 15 minut u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování. První etapa (P21 – P24), druhá etapa (P28 – P31), třetí etapa (P35 – P38), čtvrtá etapa (P42 – P45). Symbol * znamená signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi C a CZP potkany.

Provedená statistika ukázala celkově velmi signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami zvířat ($p < 0,001$). Po provedení vícenásobného porovnávání mezi jednotlivými věkovými skupinami zvířat (dvojic mezi sebou) byl prokázán signifikantní rozdíl mezi kontrolními a CZP zvířaty pouze ve věku P21 ($p = 0,006$) a P45 ($P = 0,018$), tedy na začátku a na konci testování. CZP zvířata uběhla v obou případech větší vzdálenost.

Během první etapy testování vykazovali CZP potkani ve věku P21 větší lokomoční aktivitu v prostředí OF ve srovnání s kontrolními potkany. Uplatňuje se zde hyperaktivita CZP potkanů a anxiolytický účinek klonazepamu. CZP zvířata nemají z neznámého prostředí takový strach. Rozdíl ve vzdálenosti, kterou uběhla zvířata ve věku P21 a P24 nebyl statisticky průkazný ani u jedné skupiny zvířat. K habituaci intersession tedy podle statistiky nedošlo, je zde ovšem určitá tendence ke snižování lokomoční aktivity, zejména u CZP zvířat.

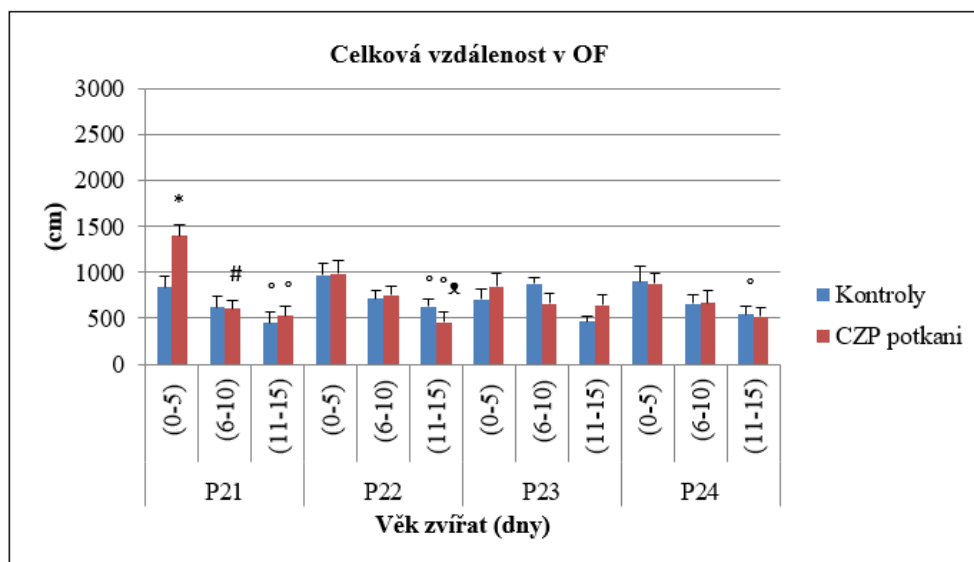
Druhé testování bylo provedeno ve věku P28 – P31. U obou skupin zvířat je patrná tendence ke zvyšování uběhnuté vzdálenosti, rovněž CZP zvířata projevila vyšší lokomoční aktivitu než zvířata kontrolní. V porovnání s první etapou testování je uběhnutá vzdálenost v OF vyšší u obou skupin zvířat. Statisticky jsou ovšem tyto rozdíly neprůkazné.

Třetí testování bylo provedeno ve věku P35 – P38 ve velkém OF. Ve srovnání s prvními dvěma etapami testování uběhly obě skupiny větší vzdálenost (40 m). Dochází k vrcholu aktivity mezi 35 – 36. dnem vývoje, poté aktivita klesá. U kontrolních zvířat se projevila vyšší úroveň lokomoce. Je patrná tendence k intersession habituaci. U kontrolních zvířat k této tendenci dochází od P35 – P38. CZP potkani také vykazují schopnost habituace, nicméně ve věku P36 dochází k přechodnému zvýšení lokomoční aktivity. Statistika ovšem tyto rozdíly neprokázala jako významné.

Čtvrté a poslední testování provedené ve věku P42 – P45 ukazuje nižší uběhnutou vzdálenost u kontrolních zvířat, naopak vyšší úroveň pohybu je pozorována u CZP zvířat. Tendence k projevení intersession habituace je u C zvířat naznačena, výjimku tvoří věk P44, kdy došlo k přechodnému zvýšení lokomoce. U CZP je tato tendence také, výjimkou je věk P45. Statistické šetření ukázalo signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti ve věku P45 mezi C a CZP potkany, kdy CZP potkani uběhli větší vzdálenost.

Intersession habituace (habituace mezi jednotlivými sezeními) je pozorovatelná více v prostředí velkého OF u kontrolních zvířat, kde byla zvířata testována ve věku P35 – P45. V malém OF je tendence k této habituaci během první etapy testování. V období po odstavu se úroveň pohybu naopak zvyšuje. U zvířat, kterým byl aplikován klonazepam se tendence k habituaci vyskytovala podobně v porovnání s kontrolními zvířaty. Statistika ovšem neprokázala signifikantní rozdíly. Anxiolytický efekt klonazepamu v podobě větší uběhnuté vzdálenosti u CZP zvířat byl statisticky prokázán pouze ve věku P21 a P45.

5.2.2 Habituace intrasession



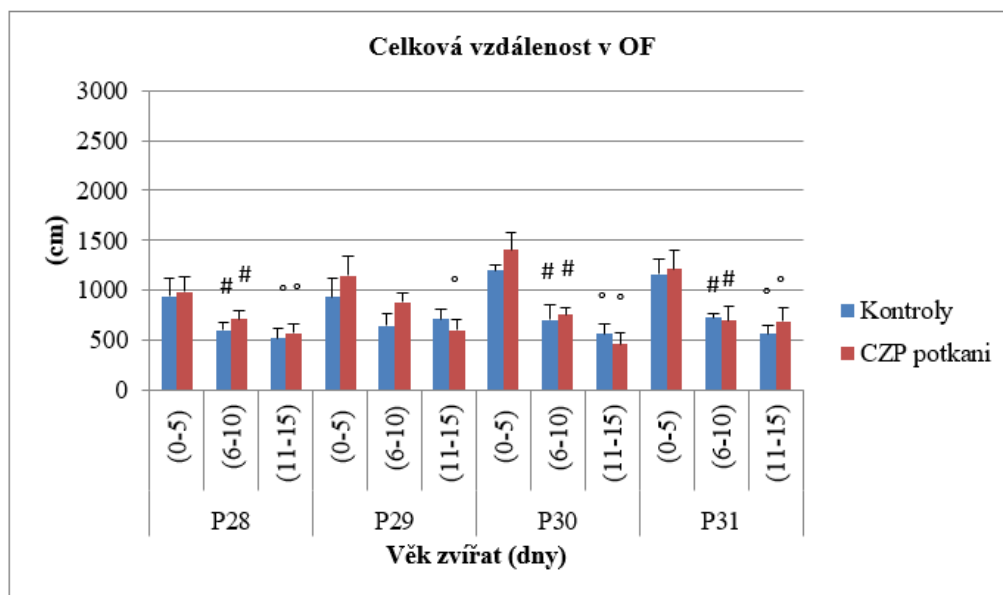
Obrázek 19: Celková vzdálenost hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování.

Symbol * znamená signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi C a CZP potkany v jednotlivých intervalech

Symbol # znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 6 – 10 v rámci jednotlivého dne

Symbol ° znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne

Symbol ♣ znamená rozdíl mezi intervaly 6 – 10 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne



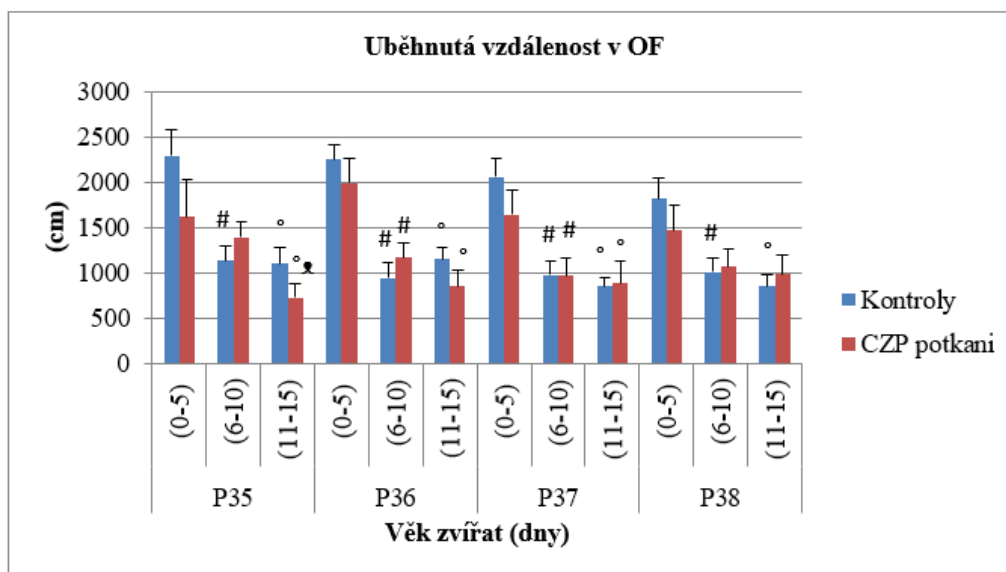
Obrázek 20: Celková vzdálenost hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování.

Symbol * znamená signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi C a CZP potkany v jednotlivých intervalech

Symbol # znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 6 – 10 v rámci jednotlivého dne

Symbol ° znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne

Symbol ♣ znamená rozdíl mezi intervaly 6 – 10 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne



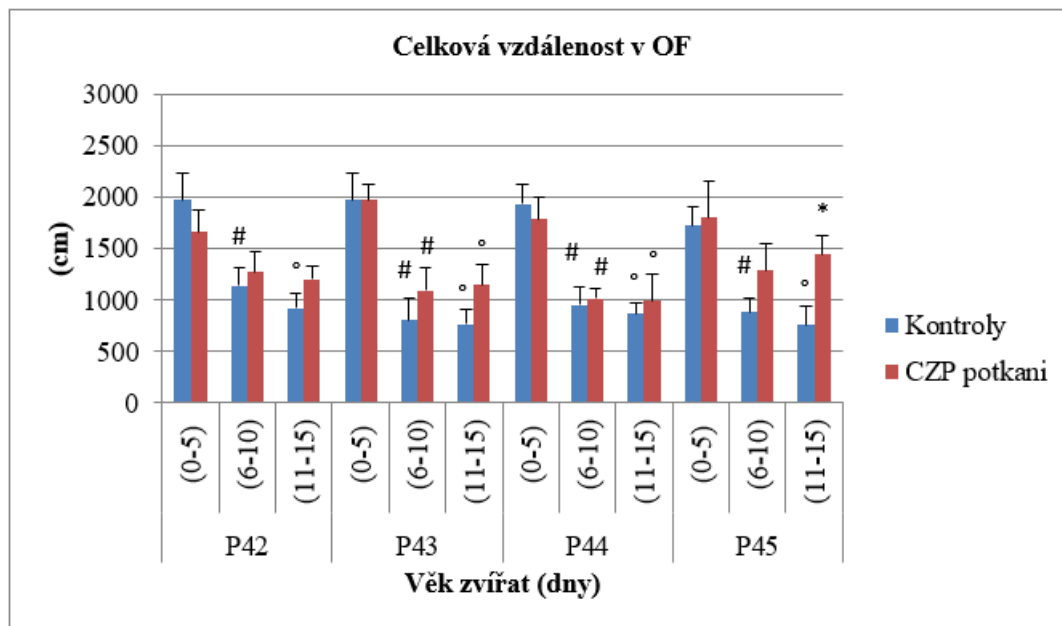
Obrázek 21: Celková vzdálenost hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování.

Symbol * znamená signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi C a CZP potkany v jednotlivých intervalech

Symbol # znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 6 – 10 v rámci jednotlivého dne

Symbol ° znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne

Symbol ♣ znamená rozdíl mezi intervaly 6 – 10 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne



Obrázek 22: Celková vzdálenost hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování.

Symbol * znamená signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi C a CZP potkany v jednotlivých intervalech

Symbol # znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 6 – 10 v rámci jednotlivého dne

Symbol ° znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne

Symbol ∙ znamená rozdíl mezi intervaly 6 – 10 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne

Pokud porovnáme uběhnutou vzdálenost v rámci jednotlivých časových intervalů za jedno sezení (session), získáme rozdíl v intrasession habituaci.

Hodnocení jednotlivých intervalů v rámci 15 minut ukazuje tendenci intrasession habituace u C i CZP potkanů. Signifikantní rozdíl můžeme vidět ve věku P21 mezi prvním a třetím intervalem u C ($p < 0,003$) i CZP zvířat ($p < 0,001$). U CZP potkanů byl prokázán také signifikantní rozdíl mezi prvním a druhým intervalem ($p < 0,001$). Po prvním vystavení aréne OF obě skupiny zvířat vykazují intrasession habituaci, která se projevuje snižováním uběhnuté vzdálenosti napříč jednotlivými intervaly. Ve věku P21 byl také prokázán statisticky signifikantní rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi C a CZP zvířaty v intervalu 0 – 5 minut ($p < 0,002$). CZP potkani mají tendenci k hyperaktivitě a jejich uběhnutá vzdálenost je větší než u C zvířat. Ve věku P22 prokázalo statistické šetření rovněž signifikantní rozdíl mezi uběhnutou vzdáleností mezi prvním a posledním intervalem jak u C ($p < 0,031$), tak i CZP zvířat ($p < 0,003$). U CZP zvířat byl také prokázán statisticky významný rozdíl mezi druhým a posledním intervalem ($p < 0,049$). Ve věku P23 nebyl prokázán statisticky signifikantní rozdíl mezi uběhnutou vzdáleností ani u jedné skupiny zvířat. Tendence k intrasession habituaci je možné pozorovat u obou skupin, nicméně u C zvířat došlo ve druhém intervalu k přechodně zvýšené aktivitě. Ve věku P24 byl statisticky průkazný rozdíl ve snižující se aktivitě prokázán pouze mezi prvním a třetím intervalem C potkanů ($p < 0,029$). Tendence k intersession habituaci ovšem pozorujeme u obou skupin zvířat. Větší uběhnutou vzdálenost vykazují CZP zvířata v téměř celé první etapě testování.

Druhá etapa testování neukázala signifikantní rozdíl mezi C a CZP potkany, ale je zde průkazný rozdíl mezi prvním a druhým a mezi prvním a třetím intervalem ve věku zvířat P28,

P30, P31 u obou zkoumaných skupin zvířat ($p < 0,05$). Můžeme tedy říci, že u obou skupin zvířat dochází k intrasession habituaci. Ve věku P29 dochází k signifikantnímu rozdílu pouze u CZP zvířat mezi prvním a třetím intervalem ($p < 0,018$). Tendenci ke snižování aktivity v tomto intervalu pozorujeme ale také u CZP zvířat. Větší uběhnutou vzdálenost vykazují CZP zvířata v téměř celé druhé etapě testování.

Ve třetí etapě testování se během prvního intervalu ukazuje naopak vyšší aktivita u C zvířat. Zvířata byla ve věku P35 poprvé vystavena velkému prostředí OF. Statistika neukázala signifikantní rozdíl mezi C a CZP potkany v žádném z intervalů. Signifikantní rozdíl je ovšem mezi prvním a druhým intervalem u C zvířat ($p < 0,001$). Dále mezi prvním a třetím intervalem u C ($p < 0,001$) a CZP zvířat ($p < 0,021$). A také mezi druhým a třetím intervalem u CZP zvířat ve věku P35 ($p < 0,042$). Ve věku P36 byl prokázán významný rozdíl mezi prvním a druhým a prvním a třetím intervalem u obou skupin zvířat ($p < 0,05$). Ve věku P38 byl prokázán signifikantní rozdíl pouze u C zvířat, a to mezi prvním a druhým ($p < 0,001$) a prvním a třetím intervalem ($p < 0,001$).

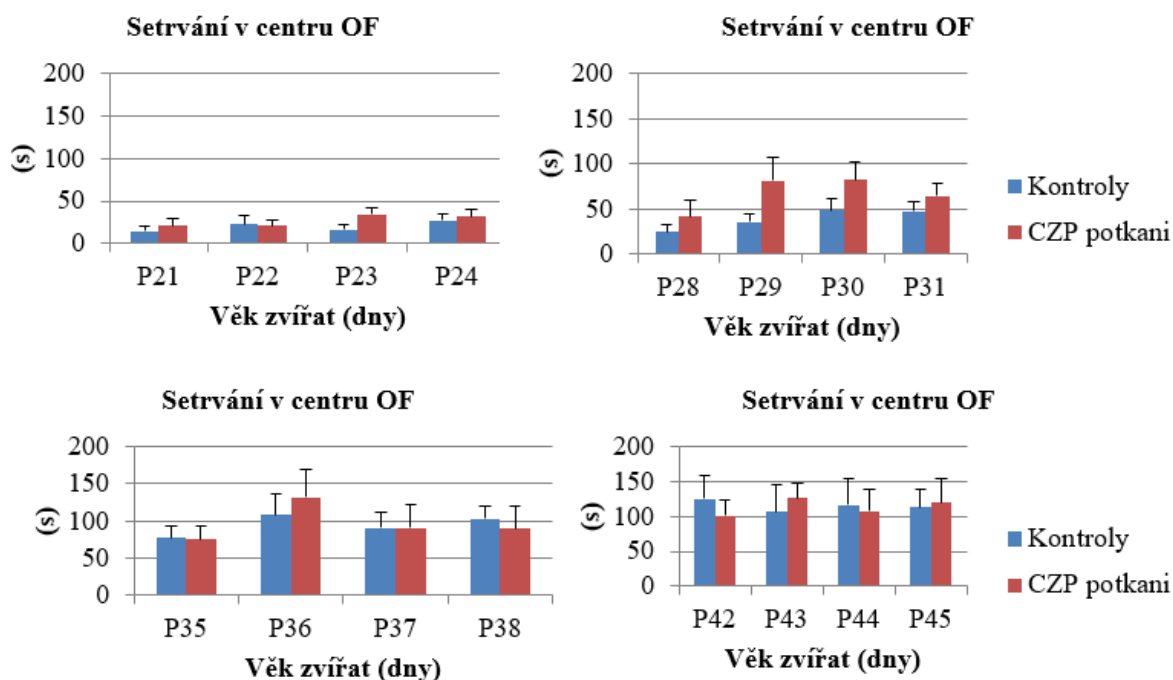
Poslední etapa testování ukázala signifikantní rozdíl ve věku P42 u C zvířat mezi prvním a druhým ($p < 0,001$) a prvním a třetím intervalem ($p < 0,001$). Ačkoli tento rozdíl nebyl statisticky průkazný u CZP potkanů, jistá tendence ke snižování uběhnuté vzdálenosti je patrná také. Ve věku P43 a P44 vyšel statisticky průkazný rozdíl u obou skupin zvířat mezi prvním a třetím intervalem a také mezi prvním a druhým intervalem ($p < 0,05$). Byla tedy prokázána intrasession habituace u obou skupin zvířat. V posledním dni testování (P45) byl prokázán signifikantní rozdíl mezi prvním a třetím ($p < 0,001$) a prvním a druhým intervalem ($p < 0,001$) pouze u C zvířat. Dále byl ve věku P45 v posledním intervalu (11 – 15 minut) prokázán statisticky významný rozdíl mezi uběhnutou vzdáleností mezi C a CZP potkany ($p < 0,031$), kdy CZP potkani uběhly daleko větší vzdálenost.

Schopnost intrasession habituace neprokázala, že by docházelo ke zhoršenému učení u zvířat, kterým byl podán klonazepam.

5.3 Doba strávená v centru OF

Doba, kterou zvíře strávilo v centrální oblasti OF arény byla vyhodnocena v souvislosti s určením anxiolytického efektu CZP.

5.3.1 Hodnocení mezi jednotlivými sezeními



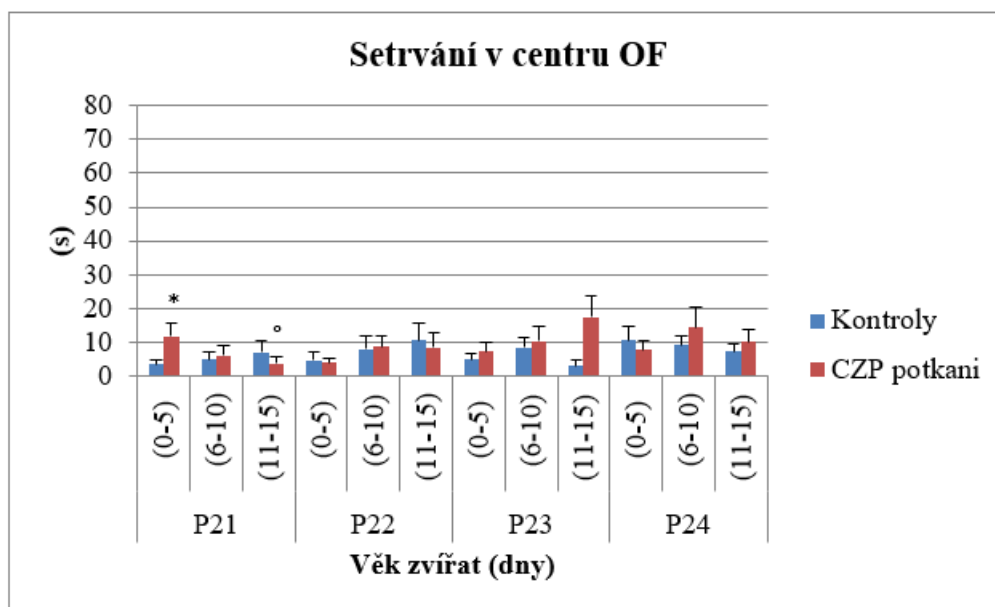
Obrázek 23: Doba strávená v centru hodnocená za celkových 15 minut u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování. První etapa (P21 – P24), druhá etapa (P28 – P31), třetí etapa (P35 – P38), čtvrtá etapa (P42 – P45). Nebyly prokázány žádné statisticky průkazné rozdíly.

Provedená statistika ukázala celkově velmi signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami zvířat ($p < 0,001$). Po provedení vícenásobného porovnávání mezi jednotlivými věkovými skupinami zvířat (dvojic mezi sebou) ovšem neprokázala signifikantní rozdíl mezi kontrolními a CZP zvířaty v žádném z provedených testování.

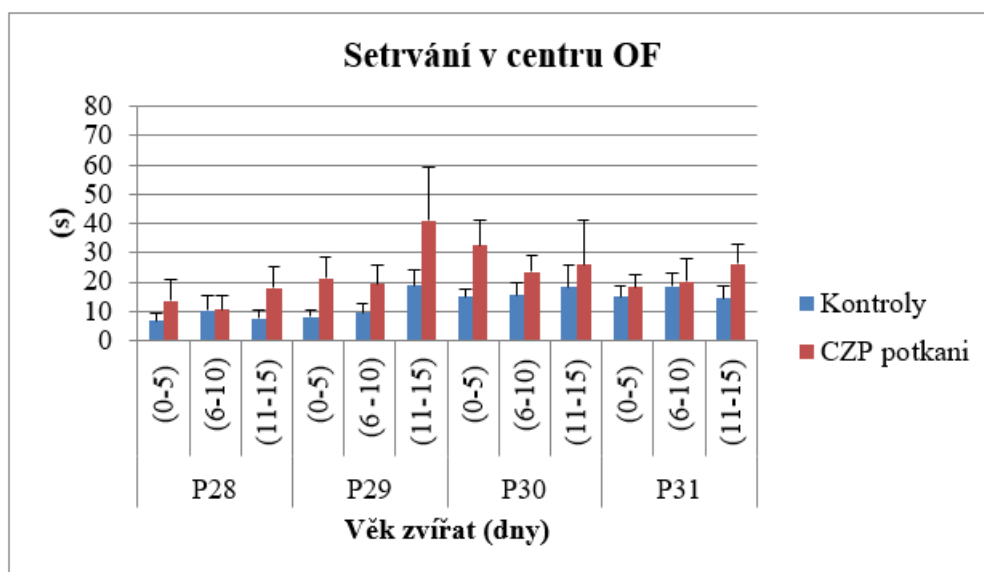
Během první etapy testování nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl, ale je zde tendence CZP zvířat k delšímu setrvání v centrální oblasti OF ve věku P21, P23 a P24. Během druhé etapy testování rovněž nebyl prokázán statisticky průkazný rozdíl mezi C a CZP potkany. Je zde tendence ke zvyšování času setrvání v centrální části OF v porovnání s první etapou testování u obou skupin zvířat. CZP potkani stejně jako v první etapě testování vykazují statisticky neprůkazný delší čas strávený v centrální oblasti OF. Během třetí etapy testování, tentokrát již ve velkém OF, je tu opět tendence k delšímu setrvání obou skupin zvířat v centru OF v porovnání s první a druhou etapou testování. Opět nedošlo k signifikantnímu rozdílu mezi C a CZP zvířaty. Čtvrtá etapa rovněž neprokázala signifikantní rozdíly mezi C a CZP potkany. Je zde tendence k nejdelšímu setrvání v centru OF v porovnání s předchozími etapami testování mezi oběma skupinami zvířat.

Zpočátku se uplatňoval anxiolytický efekt benzodiazepinů, poté si i kontrolní zvířata osvojila, že vstup do centrální oblasti nepředstavuje hrozbu, a začali v centru setrávat delší dobu. Jedná se o určitou tendenci k habituaci.

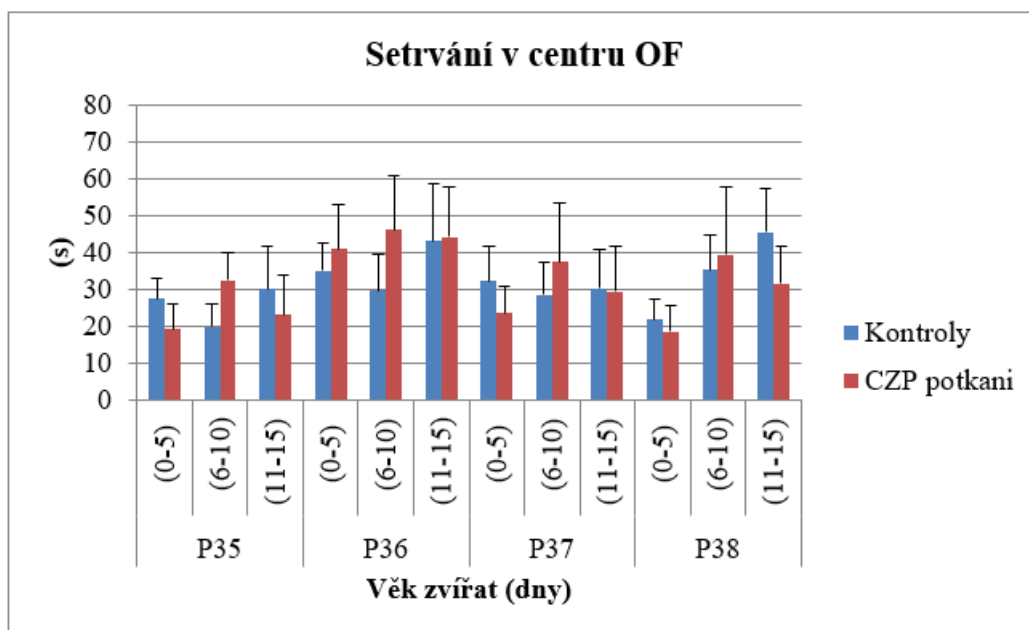
5.3.2 Hodnocení v rámci sezení



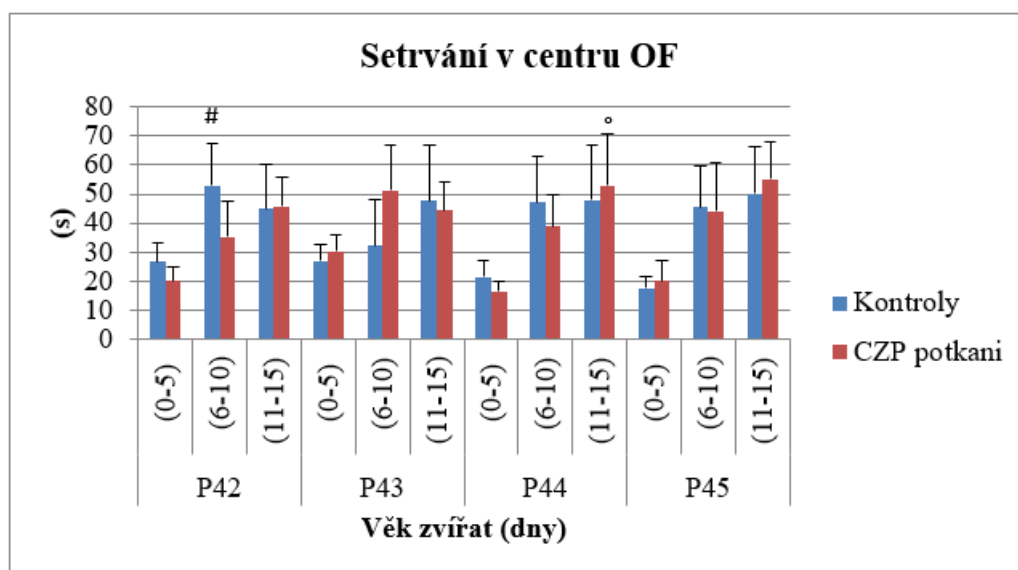
Obrázek 24: Délka setrvání potkanů v centru OF arény hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování (viz. výše). Symbol * znamená signifikantní rozdíl v setrvání zvířete v centru mezi C a CZP potkany v jednotlivých intervalech. Symbol ° znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne



Obrázek 25: Délka setrvání potkanů v centru OF arény hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování (viz. výše). Nebyly prokázány žádné statisticky průkazné rozdíly.



Obrázek 26: Délka setrvání potkanů v centru OF arény hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování (viz. výše). Nebyly prokázány žádné statisticky průkazné rozdíly.



Obrázek 27: Délka setrvání potkanů v centru OF arény hodnocena v 5 minutových intervalech u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování (viz. výše). Symbol # znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 6 – 10 v rámci jednotlivého dne. Symbol ° znamená rozdíl mezi intervaly 0 – 5 a 11 – 15 v rámci jednotlivého dne.

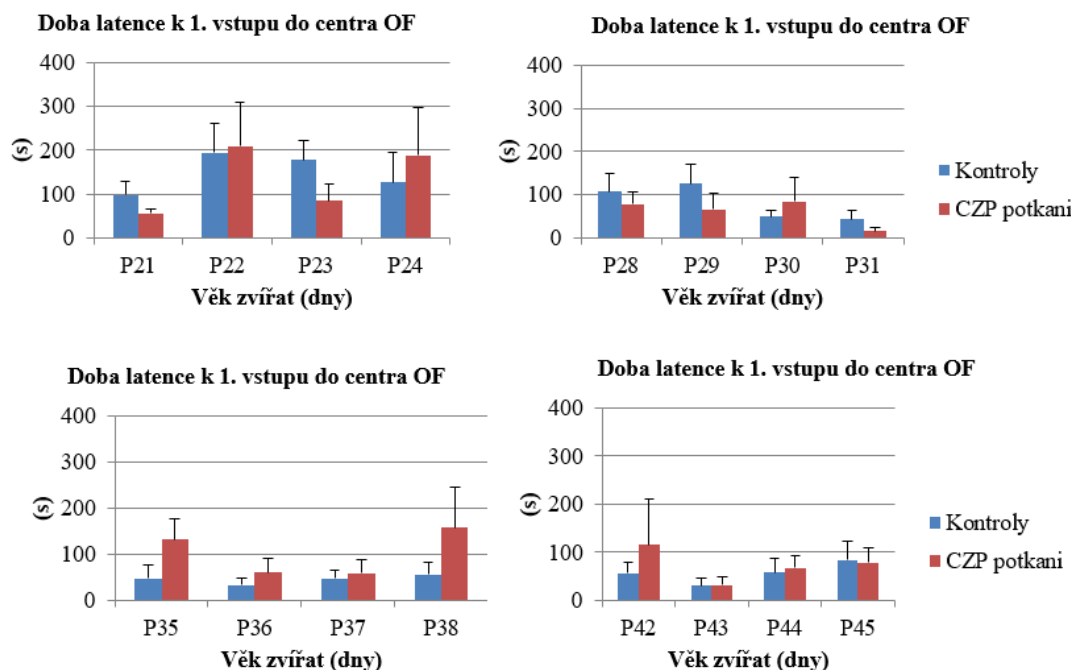
Během první etapy v rámci porovnávání délky setrvané v centru mezi jednotlivými intervaly prokázala statistika signifikantní rozdíl mezi C a CZP zvířaty ve věku P21, kdy CZP zvířata setrvala v centru arény OF daleko delší dobu, než zvířata kontrolní. Další statisticky průkazný rozdíl můžeme pozorovat u CZP zvířat ve věku P21, kdy statistika prokázala rozdíl v délce setrvání CZP zvířat v centru mezi prvním a třetím intervalem. Další průkazné rozdíly

statistika neukázala. Tendenci delšího setrvání C i CZP zvířat v centru OF arény můžeme pozorovat od věku P21. Během druhé etapy testování neprokázala statistika žádné signifikantní rozdíly. Nicméně je zde tendence CZP zvířat setrávat delší dobu v centru OF arény v rámci všech intervalů. Ve věku P29 a P30 je rovněž tendence C zvířat postupně od prvního ke třetímu intervalu setrávat v centru delší čas. U CZP potkanů je toto patrné ve věku P28 a P29. Další dny je délka pobytu v centru různá. Nejdelší dobu setrvaly C i CZP zvířata v centru během třetího intervalu ve věku P29 (C zvířata 20 s, CZP potkani 40 s). Třetí etapa, která již probíhala ve velkém OF také neprokázala statisticky signifikantní rozdíly. Je zde určitá tendence k setrvání obou skupin zvířat delší dobu v centru OF arény v porovnání s první a druhou etapou testování. C zvířata si začínají zvykat, že v centru OF arény nehrozí nebezpečí a setrávají v ní delší dobu. V rámci čtvrté a poslední etapy testování prokázala statistika signifikantní rozdíl u C zvířat ve věku P42 mezi prvním a druhým intervalem, kdy C zvířata setrvaly během druhého intervalu v centru delší dobu, než tomu bylo u intervalu prvního. Dále byl prokázán statisticky průkazný rozdíl ve věku P44 u CZP zvířat mezi prvním a třetím intervalem, kdy CZP potkani setrvali ve třetím intervalu daleko větší čas v centru OF, než v intervalu prvním. Opět je zde určitá tendence k delšímu setrvání obou skupin zvířat v centru arény. Od P42 – P45 můžeme vidět (až na pár odchylek) postupný zvyšující se čas strávený v centru u obou skupin zvířat v rámci jednotlivých intervalů. Statisticky je ovšem rozdíl neprůkazný.

Pokud budeme hodnotit dobu, kterou potkan stráví v centru OF, můžeme si všimnout značně vyššího setrvání v centru u CZP potkanů. Zvláště je toto patrné první den testování (zejména prvních 5 minut od vystavení novému prostředí). Projevuje se tedy anxiolytický efekt benzodiazepinů.

5.4 Doba latence k prvnímu vstupu do centra OF

Doba latence byla hodnocena pouze mezi jednotlivými sezeními, nikoli v rámci jednotlivých intervalů, neboť se jedná o čas potřebný k prvnímu vstupu zvířete do centra OF arény.



Obrázek 28: Doba latence k prvnímu vstupu do centrální části OF arény hodnocená za celkových 15 minut u C a CZP zvířat v jednotlivých etapách testování. První etapa (P21 – P24), druhá etapa (P28 – P31), třetí etapa (P35 – P38), čtvrtá etapa (P42 – P45). Statistika neprokázala žádné rozdíly.

Rozdíly ve středních hodnotách mezi skupinami C a CZP zvířaty nejsou dostatečně velké, aby vyloučily možnost, že rozdíl je způsoben náhodnou variabilitou odběru vzorků. V rámci testování doby latence tedy není žádný statisticky významný rozdíl mezi skupinami C a CZP zvířat, ani mezi dobou latence mezi prvním a čtvrtým sezením.

V první etapě testování je pouze určitá tendence CZP zvířat vstupovat do centra OF dříve (nižší doba potřebná ke vstupu), než je tomu u zvířat kontrolních. Toto můžeme pozorovat ve věku P21 (první den testování) a ve věku P23. Ve druhé etapě testování je opět první den testování (P28) tendence dřívějšího prvního vstupu do centra OF arény u CZP zvířat. Stejně je to i ve dnech P29 a P31. Dřívější první vstup CZP do centra OF arény ukazuje na anxiolytický účinek BZD. Statistika ovšem neprokázala signifikantní rozdíly. V rámci třetí a čtvrté etapy testování rovněž není žádný statisticky průkazný rozdíl mezi C a CZP zvířaty. Podle grafického znázornění je tu ovšem jistá tendence k odlišnosti mezi prvními vstupy do centra. Od P35 – P38 můžeme u C zvířat pozorovat nižší čas potřebný k prvnímu vstupu do centra OF arény. Ve čtvrté etapě testování je tato tendence s výjimkou dne P45 také. V rámci opakovaného vkládání zvířat do stejného prostředí si zvířata na prostředí zvykla, centrální část OF arény již nepředstavuje hrozbu.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo ověřit hypotézu, že farmakologické zvýšení GABAergní inhibice v průběhu perinatálního období ovlivní vývoj habituace jako neasociativní formy učení a paměti a vývoj emocionálního chování u mláďat laboratorního potkana.

Ke zvýšení GABAergní inhibice bylo použito látky ze skupiny benzodiazepinů (BZD), klonazepamu (CZP). Tato látka byla podávána mláďatům laboratorního potkana kmene Wistar opakovaně v raném postnatálním období ve věku P7 – P11 v množství 1 mg/ kg/ den i.p., tedy v období intenzivního růstu mozku, které je kritické pro tvorbu neuronálních spojení, synaptických kontaktů (Ošťádalová & Babický 2012). Farmakologická manipulace s neurotransmisí stejně jako mozková traumata či silný stres může v tomto období ovlivnit další vývoj mozkových funkcí ať pozitivně, nebo negativně (Andersen 2003).

Na základě srovnávacích studií sledujících vývoj mozku, odpovídá vývojově novorozený potkan 6 měsíčnímu lidskému plodu. Mozek potkana ve věku P1 – P10 je srovnatelný s mozkem plodu člověka ve třetím trimestru těhotenství a potkani ve věku P12 jsou vývojově srovnatelní s novorozeneckým či kojeneckým obdobím u člověka (Dobbing & Sands 1979; Clancy et al. 2007). Díky tomuto vývojovému srovnání lze předpokládat, že úroveň vývoje mozku ve věku P7 – P11, tedy v období podávání CZP odpovídá úrovni zralosti perinatálnímu vývoji lidského mozku. Testování benzodiazepinů v tomto vývojovém období má své opodstatnění, protože jsou tyto léky často předepisovány těhotným ženám (Iqbal et al. 2002), dětem a kojencům i přes své možné nežádoucí účinky (Bittigau et al. 2002). Provádění klinických studií tohoto charakteru je nepřijatelné a retrospektivní analýzy neposkytují dostatek informací o možných rizicích léčby (Iqbal et al. 2002). Jedinou možností pro získání informací o možných rizicích BZD pro vývoj plodu a pro stanovení mechanismů odpovědných za případně vyvolané poškození představují animální studie. Interpretace výsledků a jejich přenos na člověka je však velmi komplikovaný (Kubová, pers. comm). Studie, které byly provedeny v posledních několika desetiletích poskytly podstatné informace o vývoji mozku. I když existují rozdíly v míře růstu mozku napříč třídou savců, je možné srovnávat vývoj mozku mezi druhy (Kaindl et al. 2006).

Benzodiazepiny jsou používány v celé řadě indikací. Působí anxiolyticky, antikonvulzivně, svalově relaxačně a sedativně. Jsou proto vhodnými látkami k léčbě epilepsie (Kaindl et al. 2006), léčbě záchvatových poruch apod. (Riss et al. 2008). BZD se používají napříč všemi věkovými skupinami a také u novorozenců (Kubová et al. 2018). Působí zvýšení inhibice prostřednictvím alosterické modulace propustnosti chloridového kanálu GABA_A receptoru kyseliny γ – aminomáselné (GABA) (Mohler 2007; Jacob et al. 2012; Griffin et al. 2013). V dospělém mozku představuje GABA hlavní inhibiční neurotransmitter centrálního nervového systému obratlovců (Michels & Moss 2007). Interakce benzodiazepinů s GABA_A receptorem zvýší průnik chloridových iontů do buňky a vyvolá hyperpolarizaci neuronální membrány, což vede k inhibici (Griffin et al. 2013). GABAergní systém je ve vyvíjejícím se mozku podstatně odlišný v porovnání s mozkem dospělého jedince. Během časného vývoje působí GABA jako neurotransmitter excitační. Přechodný excitační účinek GABA přes receptory GABA_A představuje obecný rys vyvíjejících se

neuronů (Ben - Ari et al. 1997). V důsledku zvýšené koncentrace chloridových iontů v nezralých neuronech dojde po otevření chloridového kanálu k opačnému pohybu chloridových iontů a depolarizaci. V průběhu dalšího vývoje přejímá excitační funkci GABA postupně glutamát a GABA se stává inhibičním neuromediátorem v naprosté většině zdravých dospělých neuronů (Owens et al. 1996). Časně podání BZD má za následek selektivní změnu exprese podjednotky a modifikuje vlastnosti receptorů GABA_A (Raol et al. 2005). Pokud dojde k zásahu do těchto mechanismů v citlivých stádiích vývoje (například podáním BZD), může dojít k přechodným, nebo trvalým změnám v utváření neuronálních sítí a synaptických spojení (Kubová, pers. comm.).

V rámci studie provedené v této práci bylo zjištěno, že podávání CZP vede ke snížení hmotnostních přírůstků v období podávání CZP (P7 – P11). Ve věku P13 došlo k většímu hmotnostnímu přírůstku u CZP zvířat a do věku P28 (odstav) nedošlo k jeho snižování. Snižování přírůstku se dále projevuje ve věku P42 a P45 (viz obr. 17). Hmotnostní přírůstek potkanů byl do této studie zařazen jako doplňková veličina a nebyl předmětem testování. Tyto výsledky jsou v souladu s předcházejícími studiemi, které prokazují určitou míru růstové retardace u zvířat, kterým byl podáván benzodiazepin. Snižování hmotnostních přírůstků po podání léčiv ze skupiny BZD popisují například Stefovská et al. (2008) a Kubová et al. (2018). Výsledky předcházející studie, provedené se stejným modelem (Mikulecká et al. 2014a) ukázaly shodný průběh růstových křivek po podání CZP jaký byl pozorován v naší studii.

V rámci této diplomové práce jsme se zaměřili na ovlivnění vývoje kognitivních schopností potkanů, mezi které patří učení a paměť. Dále byl sledován vývoj emocionálního chování, zejména úzkost (anxieta), a lokomoční aktivita. Pro testování paměti byla zvolena habituace, jako nejjednodušší forma učení. Provedená studie v rámci této diplomové práce neukázala zhoršenou schopnost intersession habituace u potkanů, kterým byl aplikován klonazepam při hodnocení v rámci celkových 15 minut. Během jednotlivých testování nedošlo k významnému snížení uběhnuté vzdálenosti ovšem ani u kontrolních zvířat. Kontrolní zvířata sice vykazovala tendenci intersession habituace při porovnání uběhnuté vzdálenosti mezi prvním a posledním dnem každé etapy testování, ale statisticky nebyl prokázán rozdíl. Během druhé etapy testování (P28 – P31) můžeme pozorovat určitou tendenci ke zvýšení lokomoční aktivity u obou skupin zvířat. Toto je způsobeno nejspíše přirozeně zvýšenou explorační aktivitou v období kolem odstavu (Ba & Seri 1995; Lynn & Brown 2009). U CZP zvířat byl prokázán významný rozdíl v uběhnuté vzdálenosti v porovnání s kontrolními sourozenci v rámci prvního testování ve věku P21 a posledního testování ve věku P45. Toto může indikovat hyperaktivitu, nebo excitabilitu, která může být vyvolána novostí, nebo sníženou úzkostí (Mikulecká, pers. comm.). Intrasession habituace, která byla porovnáвана v rámci jednotlivých časových intervalů v rámci jednoho testování probíhala v menší míře u CZP zvířat. Zatímco kontrolní zvířata habitovala v rámci každého sezení, CZP zvířata vykazovala statisticky průkazné snížení lokomoce pouze v rámci některých dní. Tento výsledek je v rozporu s výsledky předcházejících studií prokazujících změny v habituaci po podávání BZD v časných postnatálních stádiích vývoje. Testy však byly provedeny na dospělých zvířatech na rozdíl od našich experimentů, sledujících vývoj tohoto parametru (Mikulecká et al. 2014a). V předcházející studii neprokázala poruchu intrasession

habituační, ale habituační intersession u CZP zvířat, což naznačuje zhoršenému učení u zvířat, kterým byl rovněž v postnatálních dnech P7 – P11 aplikován klonazepam. Výzkum Stefovské et al. (2008) ukázal, že po aplikaci diazepamem potkaním mláďatům ve věku P6 – P10 bylo ovlivněno učení spolu s pamětí při následném testování ve věku 6 měsíců. Také se tedy jednalo o dospělá zvířata.

Zvýšení lokomoční aktivity v OF může být interpretováno jako snížení anxiety v souvislosti s anxiolytickým efektem BZD (Hlišák et al. 2009), které přetrvává delší dobu po vysazení látky. Zvýšená aktivita také může reflektovat hyperaktivitu, takže pro konečnou interpretaci výsledků, získaných v rámci této diplomové práce je nezbytné provést další specifické behaviorální testy zaměřené nejen na anxiety, ale i na schopnost soustředění (Kubová, pers. comm.). Čas strávený v centru OF arény (tzv. nebezpečné oblasti) a doba latence k prvnímu vstupu do centra arény jsou ukazatele, které ukazují na anxiolytický efekt klonazepamem a BZD obecně. Dřívější provedené studie prokázaly zvýšení vstupů a delší setrvání v centru OF arény u zvířat, kterým byl aplikován BZD těsně před provedením testu (Hlišák et al. 2009). Naše studie sledovala dlouhodobé důsledky po vysazení CZP a testy byly prováděny v době, kdy již není látka v těle přítomná. V naší studii nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi C a CZP potkany, ale z výsledků, které jsou interpretovány prostřednictvím grafického znázornění je u CZP zvířat patrná jasná tendence k prodloužení doby strávené v centru OF arény a zkrácení času potřebného pro první vstup do centrální oblasti. Tyto výsledky mohou být s opatrností interpretovány jako dlouhodobé snížení úzkosti, vyvolané novým prostředím, ale tato možnost musí být dále ověřena. Tendence k prodloužení doby, strávené v centrální oblasti a zároveň zkrácení latence ke vstupu do této oblasti se objevilo i u kontrolních zvířat během třetí a čtvrté etapy testování. Je to další známka habituace na dané prostředí a také toho, se zvířata přestávají bát centrální oblast navštěvovat a tato již pro ně nepředstavuje adekvátní hrozbu.

Námi provedená studie neprokázala významně zhoršené učení u CZP zvířat, pokud jim byla ve věku P7 – P11 aplikována intraperitoneálně dávka CZP v množství 1 mg/ kg/ den. Je zde pouze náznak zhoršené habituace intrasession a určitá celková tendence ke zhoršenému fenoménu habituace zejména ve věku P45, kdy CZP zvířata vykazují daleko větší lokomoční aktivitu než zvířata, kterým byl aplikován pouze fyziologický roztok. Může docházet k fenoménu tzv. dishabituace, kdy opět nastává návrat vnímání na podnět, vůči kterému již nastala habituace (Mikulecká, pers. comm.). Pokud bychom aplikovali větší dávku CZP, je možné, že by se zhoršené učení projevilo. Statisticky by toto bylo nejspíše průkazné rovněž při použití většího počtu zvířat. Zhoršené učení by také mohlo být patrnější, pokud by byla zvířata testována v období dospělosti, podobně jako ve studii provedené Mikulecká et al. 2014a. Ani anxiolytický efekt časného podávání CZP nebyl statisticky průkazný, nicméně docházelo k určité tendenci CZP zvířat k rychlejšímu prozkoumávání cizího prostředí OF arény, delšímu setrvání v jejím centru a nižšímu času potřebnému k prvnímu vstupu do této oblasti ve srovnání s kontrolami.

Přestože jsou benzodiazepiny široce předepisované psychotropní látky pro jejich hypnotický, sedativní, anxiolytický, myorelaxační a antikonvulzivní efekt (Heinonen, 1977), je nutné brát zřetel na jejich možné nežádoucí účinky na vyvíjející se mozek. Benzodiazepiny

způsobují apoptotickou neurodegeneraci v rozvíjejícím se mozku potkanů, jak dokládají ve svém výzkumu Bittigau et al. 2002 a Kaindl et al. 2006. Rovněž také Turski & Ikonomidou (2012) dokládají, že farmakologická aktivace receptoru GABA_A narušuje buněčnou proliferaci a inhibuje neurogenezi u nezralého mozku potkanů. I přesto, že tato diplomová práce neprokázala zhoršení učení při časném podání CZP laboratorním potkanům, mělo by být používání BZD obecně v pediatrii důkladně zvažováno. Lékaři by měli užívat benzodiazepiny, které mají dlouhodobé záznamy o bezpečnosti a měly by předepisovat benzodiazepiny jako monoterapii při nejnižší účinné dávce za co nejkratší dobu (Iqbal et al. 2002).

7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývala vlivem antiepileptického léčiva klonazepamu na habituaci, jednu z nejjednodušších forem učení. Současně s fenoménem habituace bylo cílem zjistit, jestli dojde k ovlivnění dalších parametrů emocionálního chování, konkrétně anxiety (úzkosti). Testování bylo provedeno na laboratorních potkanech kmene Wistar prostřednictvím široce používaného behaviorálního testu otevřeného pole.

Výsledky provedené studie můžeme shrnout do následujících bodů:

- Studie neprokázala signifikantní rozdíl ve schopnosti habituace mezi zvířaty, kterým byl podán klonazepam a těmi, kterým byl podán stejnou cestou pouze fyziologický roztok. Ke zhoršenému učení u CZP zvířat tedy nedošlo.
- Anxiolytický vliv klonazepamu pozorovaný v rámci vstupů zvířat do centrální oblasti OF a v rámci doby latence k prvnímu vstupu do centrální oblasti OF arény nebyl statistikou průkazný, nicméně zde byla určitá tendence CZP zvířat k dřívějším vstupům a delšímu setrvání v této oblasti, což ukazuje na anxiolytický efekt tohoto léčiva.

Studie zaměřené na ovlivnění vývoje nervového systému prostřednictvím benzodiazepinů jsou i v současné době stále aktuální, protože tyto látky patří stále mezi hojně využívané v pediatrické praxi.

8 Literatura

- Andersen SL. 2003. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **27**:3-18.
- Arakawa H. 2005. Interaction between isolation rearing and social development on exploratory behavior in male rats. *Behavioural Processes* **70**:223-234.
- Ba A, Seri BV. 1995. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **19**:413-425.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. 1993. Timetables of Neurogenesis in the Human Brain Based on Experimentally Determined Patterns in the Rat. *NeuroToxicology* **14**:83-144.
- Ben-Ari Y, Khazipov R, Leinekugel X, Caillard O, Gaiarsa JL. 1997. GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'ménage à trois'. *TINS* **20**:523-529.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E. 2012. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *The neuroscientist* **18**:467-486.
- Bittigau P, et al. 2002. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *PNAS* **99**:15089-15094.
- Bolivar VJ. 2009. Intrasession and Intersession Habituation in Mice: From Inbred Strain Variability to Linkage Analysis. *Neurobiology of Learning and Memory* **92**:206-214.
- Braat S, Kooy RF. 2015. The GABA_A Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron Perspective* **86**:1119-1130.
- Bronstein PM, Neiman H, Wolkoff DF, Levine JM. 1974. The development of habituation in the rat. *Animal Learning & Behavior* **2**:92-96.
- Campos AC, Fogaça MV, Aguiar DC, Guimarães FS. 2013. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista brasileira de psiquiatria* **2**:101-111.
- Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJS. 2007. Extrapolating Brain Development From Experimental Species To Humans. *Neurotoxicology* **28**:931-937.
- Counotte DS, Smit AB, Pattij T, Spijker S. 2011. Development of the motivational system during adolescence, and its sensitivity to disruption by nicotine. *Developmental Cognitive Neuroscience* **1**:430-443.
- Dehorter N, Vinay L, Hammond C, Ben – Ari Y. 2012. Timing of developmental sequences in different brain structures: physiological and pathological implications. *European Journal of Neuroscience* **35**:1846-1856.
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development* **3**:79-83.

- Feigley DA, Parsons PJ, Hamilton LW, Spear NE. 1972. Development of habituation to novel environments in the rat. *Journal of comparative and physiological psychology* **79**:443-452.
- Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD. 2013. Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *The Ochsner journal* **13**:214-223.
- Haefely WE. 1989. Pharmacology of the benzodiazepine receptor. *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences* **238**:294-301.
- Hammels C, et al. 2015. Defeat stress in rodents: From behavior to molecules. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **59**:111-140.
- Harris JD. 1943. Habitatory response decrement in the intact organism. *Psychological Bulletin* **40**:385-422.
- Herlenius E, Lagercrantz H. 2004. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology* **190**:8-21.
- Hlišák Z, Hynie S, Krejčí I, Klenerová V. 2009. Novel and simple behavioral paradigm for assessing anxiety in rats: effect of diazepam. *Neuroendocrinology Letters* **30**:25-31.
- Chapillon P, Rouillet P. 1997. Habituation and memorization of spatial objects' configurations in mice from weaning to adulthood. *Behavioural Processes* **39**:249-256.
- Chen JC, Turiak G, Galler J, Volicer L. 1997. Postnatal changes of brain monoamine levels in prenatally malnourished and control rats. *International Journal of Developmental Neuroscience* **15**:257-263.
- Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. 2001. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **25**:235-260.
- Ikonomidou Ch, Bittigau P, Koch Ch, Genz K, Hoerster F, Felderhoff – Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW. 2001. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochemical Pharmacology* **62**:401-405.
- Iqbal MM, Sobhan T, Ryals T. 2002. Effects of commonly used benzodiazepines on the fetus, the neonate, and the nursing infant. *Psychiatric services* **53**:39-49.
- Jacob TC, Michels G, Silayeva L, Haydon J, Succol F, Moss SJ. 2012. Benzodiazepine treatment induces subtype-specific changes in GABA(A) receptor trafficking and decreases synaptic inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **109**:18595-18600.
- Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. 2008. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature reviews. Neuroscience* **9**:331-343.
- Johnston GAR. 1996. GABA_A receptor pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics* **69**:173-198.

- Jolles JW, Boogert NJ, van den Bos R. 2015. Sex differences in risk-taking and associative learning in rats. *Royal Society open science* **2**:1-10.
- Kaindl AM, Asimiadou S, Manthey D, Hagen MV, Turski L, Ikonomidou C. 2006. Antiepileptic drugs and the developing brain. *Cellular and molecular life sciences* **63**:399-413.
- Kubová H, Bendová Z, Moravcová S, Pačesová D, Rocha LL, Mareš P. 2018. Neonatal Clonazepam Administration Induces Long-Lasting Changes in Glutamate Receptors. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **11**:1-12.
- Kubová H, Mareš P. 1989. Time course of the anticonvulsant action of clonazepam in the developing rats. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* **298**:15-24.
- Lader M. 2011. Benzodiazepines revisited – will we ever learn? *Addiction* **106**:2086-2109.
- Leussis MP, Bolivar VJ. 2006. Habituation in rodents: A review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **30**:1045-1064.
- Lynn DA, Brown GR. 2009. The Ontogeny of Exploratory Behavior in Male and Female Adolescent Rats (*Rattus norvegicus*). *Developmental Psychobiology* **51**:513-520.
- Makowska IJ, Weary DM. 2013. Assessing the emotions of laboratory rats. *Applied Animal Behaviour Science* **148**:1-12.
- Mazer C, Muneyyirci J, Taheny K, Raio N, Borella A, Whitaker-Azmitia P. 1997. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: a possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. *Brain Research* **760**:68-73.
- McCutcheon JE, Marinelli M. 2009. Age matters. *European Journal of Neuroscience* **29**:997-1014.
- Michels G, Moss SJ. 2007. GABA_A Receptors: Properties and Trafficking. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **42**:3-14.
- Mikulecká A, Mareš P, Kubová H. 2011. Rebound increase in seizure susceptibility but not isolation-induced calls after single administration of clonazepam and Ro 19-8022 in infant rats. *Epilepsy & Behavior* **20**:12-19.
- Mikulecká A, Šubrt M, Stuchlík A, Kubová H. 2014a. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. I. Cognitive-like behavior. *Frontiers Behavioral Neuroscience* **8**:1-9.
- Mikulecká A, Šubrt M, Pařízková M, Mareš P, Kubová H. 2014b. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. II. Social behavior. *Frontiers Behavioral Neuroscience* **8**:1-11.
- Mohler H. 2007. Molecular regulation of cognitive functions and developmental plasticity: impact of GABA_A receptors. *Journal of Neurochemistry* **102**:1-12.

- Moretti A, Carfagna N, Trunzo F. 1987. Effect of aging on monamines and their metabolites in the rat brain. *Neurochemical Research* **12**:1035-1039.
- Norman TR, Ellen SR, Burrows GD. 1997. Benzodiazepines in anxiety disorders: managing therapeutics and dependence. *The medical journal of Australia* **167**: 490-495.
- Nuñez JL, McCarthy MM. 2007. Evidence for an Extended Duration of GABA-Mediated Excitation in the Developing Male Versus Female Hippocampus. *Developmental Neurobiology* **67**:1879-1890.
- Ohl F, Arndt SS, van der Staay FJ. 2008. Pathological anxiety in animals. *The Veterinary Journal* **175**:18-26.
- Ošťádalová I, Babický A. 2012. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. *Physiological research* **61**:1-7.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MBE, Kriegstein AR. 1996. Excitatory GABA Responses in Embryonic and Neonatal Cortical Slices Demonstrated by Gramicidin Perforated-Patch Recordings and Calcium Imaging. *The Journal of Neuroscience* **16**:6414 – 6423.
- Palmer AM, Robichaud PJ, Reiter CT. 1994. The release and uptake of excitatory amino acids in rat brain: effect of aging and oxidative stress. *Neurobiology of aging* **15**:103-111.
- Pilz PKD, Arnold SW, Rischawy AT, Flappert CF. 2014. Longterm – habituation of the startle response in mice is stimulus modality, but not context specific. *Frontiers in Integrative Neuroscience* **7**:1-10.
- Platel A, Porsolt RD. 1982. Habituation of Exploratory Activity in Mice: A screening Test for Memory Enhancing Drugs. *Psychopharmacology* **78**:346-352.
- Price MT, Olney JW, Haft R. 1981. Age-related changes in glutamate concentration and synaptosomal glutamate uptake in adult rat striatum. *Life sciences*. **28**:1365-1370.
- Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety – like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* **463**:3-33.
- Quinn R. 2005. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition* **21**:775-777.
- Raol YH, Zhang G, Budreck EC, Brooks-Kayal AR. 2005. Long-term effects of diazepam and phenobarbital treatment during development on GABA receptors, transporters and glutamic acid decarboxylase. *Neuroscience* **132**:399-407.
- Rice D, Barone S. 2000. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives* **108**:511-533.
- Riss J, Cloyd J, Gates J, Collins S. 2008. Benzodiazepines in epilepsy: pharmacology and pharmacokinetics. *Acta neurologica Scandinavica* **118**:69-86.

- Rosenberg A, Stern N. 1966. Changes in sphingosine and fatty acid components of the gangliosides. *Journal of Lipid Research* **7**:122-131.
- Seibenhener ML, Wooten MC. 2015. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments* **96**:1 – 6.
- Sengupta P. 2013. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine* **4**:624-630.
- Schmid S, Wilson DA, Rankin CH. 2015. Habituation mechanisms and their importance for cognitive function. *Frontiers in integrative neuroscience* **8**:1-2.
- Spear LP. 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **24**:417-463.
- Squire L, Berg D, Bloom F, Du Lac S, Ghosh A, Spitzer N. 2008. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, Oxford.
- Stefovska VG, Uckermann O, Czuczwar M, Smitka M, Czuczwar P, Kis J, Kaindl AM, Turski L, Turski WA, Ikonomidou Ch. 2008. Sedative and Anticonvulsant Drugs Suppress Postnatal Neurogenesis. *American Neurological Association* **64**:434-445.
- Stemmelin J, Lazarus C, Cassel S, Kelche C, Cassel JC. 2000. Immunohistochemical and neurochemical correlates of learning deficits in aged rats. *Neuroscience* **96**:275-289.
- Turski ChA, Ikonomidou Ch. 2012. Neuropathological sequelae of developmental exposure to antiepileptic and anesthetic drugs. *Frontiers in neurology* **3**:1-8.
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I. 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning & Memory* **7**:333-340.
- Vinay L, Ben-Mabrouk F, Brocard F, Clarac F, Jean-Xavier C, Pearlstein E, Pflieger JF. 2005. Perinatal Development of the Motor Systems Involved in Postural Control. *Neural Plasticity* **12**:131-139.
- Walsh RN, Cummins RA. 1976. The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychological Bulletin* **83**:482-504.
- Watanabe M, Fukuda A. 2015. Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **9**:1-14.
- Wheeler DD. 1980. Aging of membrane transport mechanisms in the central nervous system-high affinity glutamic acid transport in rat cortical synaptosomes. *Experimental gerontology* **15**:269-284.
- Zimmermann A, Stauffacher M, Langhans W, Würbel H. 2001. Enrichment-dependent differences in novelty exploration in rats can be explained by habituation. *Behavioural Brain Research* **121**:11-20.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

- 5 – HT (5 – hydroxytryptamin) - serotonin
AED – antiepileptika
AIS (axon initial segment) - počáteční segment axonu
AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
BIS - behaviorální inhibiční systém
BZ1 - benzodiazepinový receptor obsahující izoformu $\alpha 1$
BZ2 - benzodiazepinový receptor obsahující izoformu $\alpha 2$
BZP - benzodiazepin
Ca²⁺ - intracelulární signalizační molekula
Cl⁻ - chlorid
CNS - centrální nervová soustava
CZP - klonazepam
D2 - dopaminový receptor D2
DA - dopamin
DMD - dlouhodobě působící metabolit diazepamu
EPM (elevated plus maze) - test vyvýšeného křížového bludiště
EZM (elevated zero maze) - test vyvýšeného kruhového bludiště
Emx2, Lhx2 - geny podílející se na postnatálním vývoji hipokampu
GABA - kyselina gama - aminomáselná
GABA_A - receptor typu A kyseliny gama - aminomáselné
GABA_B - receptor typu B kyseliny gama - aminomáselné
GABA_C - receptor typu C kyseliny gama - aminomáselné
HCO₃ - Hydrogenuhličitan
i.p. - intraperitoneální podání
K⁺ - draslíkový iont
KCC2 - draslíko - chloridový kotransportér typu 2
LTH (long term habituation) - dlouhodobá habituace
mIPSCs - miniaturní inhibiční postsynaptický proud
mRNA (messenger RNA) – mediátorová RNA
NGF – neuronální růstový faktor
NKCC1 - sodíko – draslíko – chloridový kotransportér typu 1
NMDA - N-methyl-D-aspartátový receptor
OF (open field test) - test otevřeného pole
P - označuje postnatální den
Pers. comm. – osobní sdělení
STH (Short term habituation) - krátkodobá habituace