VÝZKUMNÝ ZÁMĚR 2 - ČASNÉ ZMĚNY GLUTAMÁTERGNÍHO SYSTÉMU JAKO PŘÍČINNY VZNIKU FUNKČNÍCH ZMĚN CENTRÁLNÍHO NERVOVÉHO SYSTÉMU

1.1.1. Abstrakt

Onemocnění centrálního nervového systému (CNS) představují v mnoha aspektech výjimečnou skupinu. Tato výjimečnost odráží jejich početní převahu nad ostatními terapeutickými skupinami, nutnost dlouhodobé léčby spojené s rizikem relapsů i dynamických změn onemocnění, dlouhodobé ztráty produktivity i významné snížení kvality života pacienta a jeho okolí, což významngě zvyšuje náklady na léčbu i sociální péči. Tyto choroby jsou charakteristická vysokou heterogenitou, specifickým vývojovým profilem (často mají příčinu v dětství či adolescenci) a velkými rozdíly ve vulnerabilitě k jejich rozvoji.

Nový koncept zaměřený na studium příčin jejich vzniku, diagnostiku psychopatologií, vyhledávání nových terapeutických strategií, a vytváření klinicky relevantních animálních modelů, charakterizuje onemocnění CNS jako *onemocnění mozkových neuronálních sítí. Cílem záměru je* to studium komplexních neurobiologických procesů a změn v adaptabilitě na sekundární podněty na základě alterací na úrovni glutamátergního systému a jeho interakcemi s dalšími neurotransmiterovými systémy s využitím inovativních animálních modelů s vysokou prediktivní validitou.

Vedoucími pracovníky odborného týmu jsou:

- doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc.
- Prof. MUDr. Romana Šlamberová, PhD.
- RNDr. Karel Valeš, PhD.
- Doc. RNDr. Zdena Bendová, PhD.
- Ing. Martin Kuchař, PhD.
- MUDr. Tomáš Páleníček, PhD.

Garantem výzkumu je doc.PharmDr.Hana Kubová,DrSc**.**

Výzkumný program bude realizován po celou dobu projektu (**od 1. 1. 2018. do 31. 12. 2022**).

Hlavní řešitel: Fyziologický ústav Akademie věd v.v.i.

Partnerský subjekt: Národní ústav duševního zdraví, 3. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

1.1.2. Současný stav poznání

Onemocnění centrálního nervového systému (CNS) představují v mnoha aspektech výjimečnou skupinu. Tato výjimečnost odráží jejich početní převahu nad ostatními terapeutickými skupinami, nutnost dlouhodobé léčby spojené s rizikem relapsů i dynamických změn onemocnění, dlouhodobé ztráty produktivity i významné snížení kvality života pacienta a jeho okolí, což významně zvyšuje náklady na léčbu i sociální péči. Ve světě trpí chorobami CNS více než 1 bilion lidí. Přímé i nepřímé náklady na léčbu jsou v USA a Evropě odhadovány na více než 2 triliony USD a předpokládá se, že do roku 2030 se náklady ztrojnásobí. https://www.parexel.com/files/4314/4113/4032/Venturing_Into_a_New_Era_of_CNS_Drug_Development_to_Improve_Success). Riziko dramatického zvyšování výskytu onemocnění CNS přináší nejen tlak na vývoj účinnějších léčiv a možností včasné diagnózy, ale především nabízí ***hledání možných cest prevence vzniku těchto onemocnění***. Pro tuto cestu je třeba významně rozšířit naše znalosti o biologickém pozadí a molekulárních i celulárních příčinách jejich vzniku. Dalším nezbytným krokem je ***vytvoření nových klinicky relevantních animálních modelů a zlepšení experimentálního designu i testovacích schémat***.

Onemocnění CNS jsou charakteristická vysokou heterogenitou, specifickým vývojovým profilem (často mají příčinu v dětství či adolescenci) a velkými rozdíly ve vulnerabilitě k jejich rozvoji. Nový koncept zaměřený na studium příčin jejich vzniku, diagnostiku psychopatologií, vyhledávání nových terapeutických strategií, a vytváření klinicky relevantních animálních modelů, charakterizuje onemocnění CNS jako *onemocnění mozkových neuronálních sítí*. Změny jednotlivých funkčních či strukturálních sítí mohou vést k zásadní změně interakcí mezi jednotlivými neuronálními okruhy a následně k dysfunkci tzv. *domén mozkových funkcí* (přehledně Anderzhanova et al, 2017). Systém RDoC (Research Domins Criteria) byl zaveden experty NIMH a zařazen mezi výzkumné priority (http://www.nimh.nih.gov/research-pririties/rdoc/index). V současnosti systém RDoC vychází z ***5 behaviorálních domén***, které tvoří základní klasifikační matrix (1) *positive valence* (responsiveness to reward, reward learning, approach motivation), (2) *negative valence* (loss, threat, fear, anxiety), (3) *arousal* and *regulation* (arousal, sleep, circadian rhythms, wakefulness), (4) *system for social processes* (perception, social communication) and (5) *cognitive systems*. Tyto domény mohou být využity k měření jednotlivých parametrů chování i k vytvoření komplexního obrazu změn na behaviorální úrovni. Novým prvkem, který tento přístup přináší, je, že změny na všech úrovních, od molekulární až po systémovou, mohou být přiřazeny k definované behaviorální doméně (přehledně Anderzhanova et al, 2017).

Analýza klíčových biologických mechanismů, podmiňujících danou změnu, pak může probíhat na všech úrovních od genové, přes molekulární, buněčnou, úroveň neuronálních sítí až po úroveň funkční. Nový systém může být využit pro kategorizaci psychopatologií a v preklinické oblasti umožňuje překonat řadu problémů, spojených s modelováním příznaků konkrétních onemocnění CNS. Mezi hlavní výhody RDoC systému v oblasti preklinických studií patří jeho *orientace na symptomy*, protože základní symptomy mohou být přítomné ve více doménách a umožní lepší a kompexnější charakterizaci daného modelu či důsledků poškození nebo manipulace. Navíc tento systém nestaví hranici mezi „normálním“ a „nenormálním“ chováním. Naopak hlavní nevýhodou tohoto systému je, že nebere na zřetel vývojové aspekty a dynamické změny onemocnění CNS. Tento nedostatek však může být částečně kompenzován při plánování projektu, který lze o příslušný parametr rozšířit a sledovat vývoj behaviorálních či jiných funkčních změn v závislosti na čase či věku. Otevírá se tak cesta k vytvoření jednotných hodnotících kriterií, která umožní srovnání napříč

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

různými modely. Takto vytvořené schéma by bylo výhodné především pro srovnávací studie v oblasti vývojových poruch. Jejich potenciál zůstává však zatím nevyužitý.

Hlavním předpokladem pro vznik neuropsychatrických onemocnění je vzájemná interakce mezi působením vnějšího prostředí a genetických faktorů. I když k remodelaci neuronálních okruhů a následnému rozvoji dysfunkcí může docházet v kterémkoli období života, význam působení vnějšího prostředí je patrný především v průběhu časného vývoje (přehledně Rice and Barone, 2000). Enviromentální faktory se významně podílejí na regulaci genové exprese a proteomické aktivity (Gottlieb, 1998) a jejich působení v průběhu tzv. *kritických vývojových period* (přehledně Knudsen, 2004) vede k trvalé remodelaci neuronálních sítí. Alterace neuronálních okruhů se pak stávají podkladem pro změny řady behaviorálních parametrů, excitability mozku či změny citlivosti k dalšímu působení faktorů vnějšího prostředí v následujícím období. *Kritické vývojové periody jsou definovány jako etapy klíčové pro vývoj určité mozkové funkce*. Jsou charakterizovány zvýšenou citlivostí ke specifickým vnějším faktorům a v jejich průběhu dochází ke zvýšením synaptické plasticity v příslušných neuronálních okruzích. Působení těchto specifických vnějších faktorů je pak nezbytné pro normální formování dané funkce, například normální mateřské chování je nezbytné pro vytvoření základu sociálního chování (přehledně Knudsen, 2004; Meredith, 2015).

Součástí formování neuronálních okruhů je i cílená eliminace nadbytečných axonů a synapsí. Tento proces se významně podílí na tvorbě konečné cytoarchitektonické struktury dané sítě (Horn, 2004). Jestliže se v průběhu kritických vývojových období jedinci nedostávají podněty, nezbytné pro formování dané funkce nebo naopak dojde k působení rušivých vnějších faktorů, dochází k irreversibilním odchylkám ve struktuře neuronální sítě. V průběhu krického období je tedy zásadní vliv konkrétní zkušenosti, jejíž efekt je *nevratný*. Atypická zkušenost či působení nepříznivých faktorů vedou ke změnám, které mohou být podkladem tzv. *neurovývojových poruch*. ***Z klinického hlediska je významná otázka, zda je možné kritické priody reinstalovat a znovu otevřít, a tento proces využít pro odstranění existující dysfunkce*** či jestli existuje ***možnost terapeutického zásahu, vedoucího k prevenci či minimalizaci rizika vzniku těchto dysfunkcí***.

Základním požadavkem pro efektvní hledání takových cest je znalost molekulárních a biochemických mechanismů, podmiňujících remodelaci systému, a možnost identifikovat souvislost mezi změnami na molekulární úrovni a funkční dysfunkcí. Irreversibilní remodelace neuronální sítě se však ve funkčních testech nemusí výrazněji projevit a strukturální alterace může být na základě výsledků behaviorálních analýz výrazně podhodnocena. Důvodem je především komplikovanost řízení behaviorálních funkcí, na kterém se obvykle podílí několik vzájemně propojených neuronálních okruhů, z nichž ty hierarchicky výše postavené si plasticitu zachovávají obvykle déle (Jones et al, 1984; Trachtenberg et al, 2000). Významnou roli hraje i aktivace *kompenzačních mechanismů,* která může částečně zlepšit behaviorální projevy i přes irreveribilní změny neuronálních sítí, které nesprávně zpracovávají vstupní informace. Rozpoznání alespoň některých principů kompenzačních mechanismů může vést k jejich využití v klinickém výzkumu a následně i v klinické praxi. Klíčové je i sledování dynamiky možných behaviorálních alterací, protože některé odchylky mohou být detekovatelné jen po přechodnou dobu nebo až s delším odstupem od krického období. Pro minimalizaci nesprávné interpretace výsledků behaviorálních experimentů, zaměřených na projevy neurovývojových poruch, je nutné ***provádět širší analýzu jednotlivých komponent chování a to opakovaně v různých odstupech od inzultu,*** jehož důsledky sledujeme. Nezbytné je i ***vytvoření komplexního funkčního obrazu***, k jehož vytvoření budou využita data získaná ze všech pěti domén mozkových funkcí. K tomu je nezbytné

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

sjednotit funkční analýzu a hodnocení výsledků, což umožní srovnání výsledků z jednotlivých modelů vývojových poruch.

Základním biologickým podkladem, odpovědným za formování neuronálních okruhů, jsou změny na molekulární, biochemické a celulární úrovni. Mezi významné faktory, ovlivňující utváření a maturaci neuronálních sítí patří neurotransmiterové systémy, které kromě přenosu signálu mohou mít i funkci trofickou. Zásadní úlohu při formování finálních neuronálních okruhů a přechodu nezralé fomy plasticity, typické pro nezralý mozek, na plasticitu dospělou, hrají systémy *glutamátergní* a *systém kyseliny γ-aminomáselné (GABA);* (Le Magueresse and Monyer, 2013). Tři hlavní ionotropní receptory, glutamátergní NMDA a AMPA receptory a GABAergní $GABA_A$ receptor, se v průběhu časného vývoje spolupodílejí na řízení neuronální aktivity, která je základem pro tvorbu synapsí a formování neuronálních sítí. Neuronální aktivita je nezbytná pro vznik správného funkčního zapojení neuronů („who fire together, wire together" Constantine-Paton, 1990) a koordinuje jej.

Studie provedené Ben Arim a jeho spolupracovníky (přehledně Ben-Ari et al, 1997; Ben Ari, 2014) prokázaly vývojový profil součinnosti těchto tří systémů. Těsná spolupráce těchto tří systémů jasně naznačuje, že vnitřní či vnější zásah do kteréhokoli z nich povede v průběhu kritického období k alteraci či remodelaci neuronálních okruhů s většími či menšími funkčními následky. Kromě jejich úlohy ve vývoji neuronálních okruhů a s tím spojené zásadní role v průběhu kritických vývojových period, se oba systémy podílejí i na dospělé plasticitě. Představují tak ***významný terapeutický cíl pro léčení onemocnění CNS s potenciálem pro možnou prevenci jejich vzniku či progrese***.

GABAergní i glutamátergní systém jsou charakteristické tím, že se vyvíjejí ještě poměrně dlouho po narození (přehledně Herlenius a Lagercrantz, 2004) a jejich vývojový profil je závislý na dané oblasti mozku. Glutamát spolu s aspartátem jsou dominující excitační aminokyseliny, které působí asi na polovině všech synapsí. V průběhu vývoje procházejí značnými změnami, které zahrnují přechodné zvýšení hladin v průběhu kritických období vývoje mozkové kůry a hipokampu v časně postnatálním období. Tato přechodná nadprodukce je spojena se zvýšením synaptogeneze. Glutamát působí prostřednictvím několika tytů receptorů (ionotropních i metabotropních), z nichž každý vykazuje specifický vývojový profil, distribuci a částečně i farmakologickou citlivost. Přehnaná aktivace NMDA i non-NMDA receptorů je spojována s patofyziologií některých neurodegenerativních onemocnění, časná blokáda NMDA receptorů vede ke zvýšené apoptóze.

GABA (kyselina γ-aminomáselná) je hlavním inhibičním neurotransmiterem v dospělém CNS. Paradoxně v časném vývoji působí excitačně. Tento rozdíl není daný rozdílnými vlastnostmi nezralých a dospělých $GABA_A$ receptorů, ale vývojovým posunem v chloridové homeostáze. Vysoká koncentrace Cl^- iontů v nezralých neuronech vede k tomu, že při aktivaci $GABA_A$ receptorů, vedoucí k otevření chloridového kanálu, Cl^- ionty z buňky unikají a neuron se depolarizuje. S postupným dozráváním se intracelulární koncentrace Cl^- iontů snižuje, což vede k hyperpolarizaci a inhibičnímu působení GABA. Podobně jako glutamát i GABA působí prostřednictvím více typů receptorů. Zatímco $GABA_A$ receptory jsou ionotropní, $GABA_B$ receptory patři mezi metabotropní receptory a jsou funkční později, než skupina $GABA_A$ receptorů. Blokáda excitační funkce GABA vede k narušení vývoje senzorické kůry, naopak augmentace inhibiční funkce GABA může vést ke zvýšení apoptózy.

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Oba tyto neurotransmiterové systémy hrají významnou úlohu v neurofyziologii základních mozkových procesů (formování paměti, zprostředkování pohybu, cirkadiánní a neuroendokrinní regulace a dalších) a byla prokázána i jejich role ve vzniku chorob CNS (Le Magueresse a Monyer, 2013; Danysz et al, 1995) včetně neurovývojových onemocnění. Látky ovlivňující tyto systémy jsou využívány v terapii neuropsychatrických onemocnění. Zejména látky zvyšující inhibici prostřednictvím interakce s GABAergním systémem jsou pro své sedativní, antikonvulzivní a anxiolytické účinky široce využívané v léčbě chorob CNS. Podobně široké spektrum účinku bylo prokázáno i u antagonistů glutamátu. Látky této skupiny působí výrazně neuroprotektivně i antikonvulsivně, jejich širší využití je však limitováno vážnými vedlejšími účinky.

Vznik neurovývojových poruch je podmíněn řadou faktorů, ke kterým patří přítomnost genových mutací na úrovni klíčových složek GABAergní i glutamátergní neurotransmise. S použitím genetické analýzy byla detekována řada mutací na různých úrovních těchto systémů, podmiňujících vznik neuropsychatrického onemocnění nebo syndromu. Kromě jasně definovaných genetických příčin však dochází k rozvoji těchto neurovývojových poruch i z důvodů působení enviromentálních faktorů, chronického stresu, poruch imunitních funkcí, narušení cirkadiánní aktivity nebo, vystavování působení různých látek včetně některých léčiv či drog. Riziko vzniku pak závisí na období vývoje, během něhož daný vnějších vliv působí, trvání jeho působení, okolním prostředí, přidružených komorbiditách a řadě dalších faktorů. Hledání molekulárních či celulárních změn, podmiňujících remodelaci neuronálních sítí a následné behaviorální změny v těchto exogenně vyvolaných poruchách je v klinice mimořádně obtížné. Důvodem je především obrovská heterogenita souborů. Jednou z možností, jak stanovit rizika vzniku funkčního poškození, vyvolaného působením exogenních faktorů, a zároveň identifikovat přítomnost aberací na molekulární a celulární úrovni, je použití relevantních animálních modelů.

Předkládaný projekt je zaměřen na identifikaci změn v glutamátergním a GABAergním systému v modelech vývojového poškození u laboratorních hlodavců. Vzhledem k vývojovému charakteru projektu se zaměříme především na úroveň, NMDA, AMPA a $GABA_A$, „*ménage à trois*" regulace vývoje neuronálních sítí, jejichž normální struktura je základem normálního vývoje řady behaviorálních funkcí a jejich fungování v dospělosti. ***Naším hlavním předpokladem je, že negativní faktory různého charakteru, vyvolané ve stejném období vývoje mozku*** (1.-2. týden věku potkana - což odpovídá perinatálnímu či časně postnatálnímu období vývoje člověka), ***ovlivní jeden nebo více receptorů těchto skupin a případně další parametry některého z těchto transmiterových systémů. Tím se naruší nejen jejich vzájemné fungování koordinující tvorbu sítí ale i vývoj všech těchto systémů.*** Změny na úrovni sítí se nemusejí projevit ve stejných funkčních testech či shodnými poruchami chování. Předpokládáme však, že dysunkce se projeví ve stejných funkčních doménách. Role těchto receptorů v rozvoji mozkové dysfunkce bude studována i s použitím ***cílené farmakologické manipulace***, tedy podáváním specifických ligandů těchto receptorů v přesně specifikovaných stadiích vývoje.

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

S využitím nejnovějších přístupů k analýze chování a jeho dysfunkcí přinese projekt nové poznatky o molekulárních příčinách neurovývojových poruch. Tyto poznatky mohou být následně využity k vyhledávání nových terapeutických strategií, vyhledávání léčiv pro léčbu či prevenci neurovývojových onemocnění a hledání relevantních biomarkerů pro stanovení jejich účinnosti v preklinickém výzkumu.

1.1.3. Vazba na stávající výzkum žadatele a partnerů projektu

Klíčovou roli v realizaci výzkumného záměru č. 2 bude hrát Fyziologický ústav, v. v. i. Akademie věd České Republiky, který je špičkovým vědecko-výzkumným pracovištěm v oblasti normální i patologické fyziologie, zaměřený především na studium mechanismů vzniku závažných onemocnění člověka jako např. epilepsie, Alzheimerova choroba. Fyziologický ústav má hluboké zkušenosti v oblasti řízení projektů jak národních tak i mezinárodních o čemž svědčí řada úspěšných grantových projektů, včetně 7 grantů EU. Celková suma účelových prostředků získaných cestou grantů (tedy na základě soutěže) je ročně cca **150 000** tis. Kč.

Fyziologický ústav AV ČR je v současnosti příjemcem podpory GAČR pro výzkumné centrum:

1) *Projekt excelence v oblasti neurověd:* spolupráce s Národním ústavem duševního zdraví, 2. lékařskou fakultou UK v Praze, Ústavem experimentální medicíny AV ČR, realizace 2012-2018.
2) Fyziologický ústav AV ČR se podílí jako spolupříjemce na výzkumu podpořeného z centra kompetence TAČR:
3) *Centrum vývoje originálních léčiv:* spolupráce s Ústav organické chemie a biochemie AVČR, Univerzita Palackého Olomouc, Ústav experimentální medicíny AVČR, Vysoká škola chemicko-technologická Praha, APIXENEX s.r.o., BioTest s.r.o., QUINTA-ANALYTICA s.r.o., IOCB TTO s.r.o., realizace: 2012-2015.

Fyziologický ústav AV ČR je a byl rovněž příjemcem a partnerem v projektech z evropských strukturálních fondů OPPK (NeuroImage, Biomedels.Mikroskopický systém, BrainVierw) OPVK (Centrum Biomedicínského Výzkumu) a je partnerem projektu OPVaVPI BIOCEV.

Další v nedávné minulosti realizované mezinárodní projekty s odbornou relevancí k navrženému prtojektu, které je vhodné v souvislosti s projektem BrainView zmínit jsou PHOTOLYSIS - Specific Targeted Research Project - Development of flash photolysis for deep uncaging in vivo and high throughput characterisation of neurotransmitter gated ion channels in drug discovery v rámci 6. rámcového programu, Kontakt-II, AMVIS-LK Kvantitativní měření vaskulatury stereologií a 3D analýzou obrazu pro hodnocení vlivu protonového záření či proudu těžkých iontů železa na krevní zásobení tkání oka a mozku, 2009-2012, 2013-2015, TAČR, Alfa 2. výzva, Metody pro automatizované hodnocení životnosti buněk s využitím pokročilých mikroskopických zobrazovacích technik. 2012-2014

Fyziologický ústav AV ČR v.v.i. zaujímá v oblasti studia chorob CNS na národní úrovni výraznou pozici, výsledky jsou plně srovnatelné se zahraničními vědecko-výzkumnými centry. Mezi nejvýznamnější projekty podporovaná z tuzemských grantových zdrojů lze blíže zmínitt zapojení do Centa Neurověd a Centra Neuropsychiatrických Studií, v současné době je hlavním řešitelem Centra GAČR Projekt excelence v oblasti neurověd zaměřený právě na neurodegenearci, současně je zapojen do Centra Excelence TAČR CVOL:

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Centrum vývoje originálních léčiv, kde řeší problematiku neuroprotektivních látek. Počítá se s využitím přístrojů centru v rámci těchto velkých projektů a řady standardních či juniorských grantů a mezinárodních spoluprací. Dále na domácí scéně spolupracujeme s řadou ústavů AV, vysokými školami (Univerzita Karlova, České vysoké učení technické, vysoká škola chemicko-technologická), ale i s klinickými pracovišti Fakultní nemocnice v Motole, Psychiatrické centrum Praha, IKEM atd. V rámci mezinárodních spoluprací je potřeba zmínit především prestižní spolupráce s Center for Regenerative Therapies v Drážďanech (prof. Kempermann), Central Institute of Menthal Health (prof. Bartsch), Univerzity of Curich (prof. Knuesel), CNRS, Université de Provence (dr. Save), National Institutes of Health, Bethesda (prof. Stojilkovic), University of Eastern Finland (prof. Pitkanen).

Milníky výzkumného záměru 2

1) **Milník 1:** 12/2018: Neurochemická studie, behaviorální studie, hodnocení obsahu kynureninového metabolitu a neurosteroidů v mozku; experimenty zaměřené na behaviorální a cirkadiánní změny u lab. zvířat, a základní biochemické a molekulární markery v mozku
2) **Milník 2:** 06/2020**:** testování inhibitorů kynureninové dráhy při zvrácení behaviorálních deficitů, změnách hladiny cytokinů a normalizaci poškozeného metabolismu kynureninové dráhy u animálních modelů; dokončení experimentů testujících závažnost různé intenzity a spektrálního složení LAN působící na behaviorální, molekulární a biochemické markery.
3) **Milník 3:** 12/2020 Dokončení neurochemické studie role neurosteroidů během vývoje CNS; vyhodnocení role glutamátu v rozvoji závislosti a perinatálním stresu; meta nalýzy a korelace výsledků; podání mezinárodní grantové přihlášky
4) **Milník 4:** 06/2021**:** Testování a farmakologická charakterizace analogů takrinu a neuroaktivních steroidů v použitých animálních modelech; podání mezinárodní grantové přihlášky
5) **Milník 5:** 12/2022: Šetření dlouhodobých změn v adaptabilitě zvířat chovaných v podmínkách LAN na znepokojivé změny ve vnějším prostředí a imunitní postižení; dokončení experimentů; navázání spolupráce s aplikační sférou a podání mezinárodní grantové přihlášky

Očekávané výstupy výzkumného záměru 2

1) 8 publikací v časopisech s IF
2) prezentace výsledků na mezinárodních vědeckých konferencích
3) aplikované výstupy formou testování potenciálních terapeutických látek, které zmírňují průběh nemoci (inhibitory kynureninové dráhy a další vyvinuté v záměru č. 1)
4) následné navázání spolupráce se subjekty aplikační sféry a podání mezinárodních grantových projektů *pochopení biologického pozadí efektu LAN na vývoj CNS, který zvýší veřejné povědomí o nebezpečných podmínkách v typech prostředí s trvalým osvětlením, jako jsou nemocniční jednotky intenzivní péče nebo doma, v naší moderní společnosti s aktivním nočním životem.*

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Výsledky a výstupy aktivity	Cílová hodnota realizace projektu
Indikátor 2 02 11 Odborné publikace (vybrané typy dokumentů) vytvořené podpořenými subjekty	**8**
Indikátor 2 02 16 Odborné publikace (vybrané typy dokumentů) se zahraničním spoluautorstvím vytvořené podpořenými subjekty	**3**
Jiný výsledek, který se nepromítá do indikátorů: možnými dílčími výstupy realizace aktivity jsou výsledky, které jsou definovány dle Definice druhů výsledků výzkumu, experimentálního vývoje pro databázi RIV. Užitný vzor – analýza neurotransmiterů	**1**

EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY