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

Výzkumný cíl 1: Změny glutamátergní transmise vyvolané změnami prostředí v perinatálním období a jejich role ve vzniku neurovývojových poruch

Aktivita 1. Identifikace změn glutamátergní a GABA-ergní transmise v důsledku trvalého působení světla v perinatálním období

Cílem aktivity je identifikace funkčních změn CNS a jejich souvislost se alterací glutamátergní a GABA-ergické neurotransmise v pozdějším věku. Konkrétním cílem je identifikace behaviorálních změn, změn v adaptabilitě na sekundární podnět a změny na úrovni GABAergního a glutamátergního systému v důsledku působení trvalého světla s krátkou vlnovou délkou v perinatálním období.

Hlavním předpokladem pro vznik neuropsychatrických onemocnění je vzájemná interakce mezi působením vnějšího prostředí a genetickými faktory, která může vést k patologické remodelaci neuronálních okruhů. Častá exposice světlu s vlnovou délkou v oblasti modrého spektra dlouho do noci je v posledních letech dávána do přímé souvislosti se vznikem mnoha tzv. civilizačních onemocnění, poruch spánku a kognitivních funkcí. Měření fMRI lidského mozku například ukázalo, že spánek při pouhých 10 luxech světla má neblahý vliv na mozkové funkce spojené s kognicí, a negativně ovlivňuje kvalitu spánku (Kang et al., 2016; Obayashi et al., 2014, Cho et al., 2013, 2016). Experimenty na animálních modelech zase demonstrovaly, že třítýdenní exposice dospělých zvířat 5 luxům bílého světla v noci indukuje nejen metabolický syndrom těchto zvířat, a také depresívní symptomy a poruchy učení (Dauchy et al., 2010, 2015). Je tedy vysoce pravděpodobné, že nepřetržité světlo v časné ontogenezi, kterému jsou vystaveny mnohé děti díky elektronickým zařízením, významně ovlivňuje formování neuronálních okruhů a může indukovat trvalé změny mozkových funkcí.

Informace o světle pro neobrazové vidění je do mozku vedena glutamátergním retinohypotalamickým traktem (RHT), který začíná na gangliových buňkách sítnice, obsahujících melanopsin, specifický pigment nejcitlivější k vlnovým délkám světla v modrém spektru. Hlavní část RHT vede k cirkadiánnímu pacemakeru v suprachiasmatickém jádře hypotalamu (SCN), kolaterály však získává také laterální hypotalamus, laterální habenula, mediální amygdala a spánková ventrolaterální preoptická oblast. Oblasti regulující náladu a kognici jako jsou ventrální tegmentální oblast, raphe nuclei a hipokampus jsou ovlivněny světlem prostřednictvím SCN nebo mediální amygdaly či habenuly (LeGates et al., 2014). Světlo tedy přímo ovlivňuje řadu struktur, zejména limbického systému.

V SCN se glutamát z RHT váže na AMPA a NMDA receptory a jejich aktivita, kromě indukce fázových posunů působením na molekulární mechanismus cirkadiánního systému, mění také intercelulární synchronizaci neuronálních klastrů a tím stabilitu celého cirkadiánního pacemakeru. Hlavním regulačním neurotransmiterem v tomto procesu je GABA. Pokusy na animálních modelech ukázaly, že exposice dlouhé fotoperiodě výrazně zvyšuje hladinu GABAergní excitace v SCN a toto je považováno za princip změny vrátkování citlivosti cirkadiánního pacemakeru ke světlu v souvislosti se změnou fotoperiody (Farajnia et al., 2014). Nedávná studie naznačila, že světlo potlačuje expresi podjednotky $GABA_A$ receptoru γ2 v SCN a mění tak funkci synapticky uloženého receptoru (Walton et al., 2017). Komplexnější studie ukázala, že u zvířat

chovaných ve stálém světle je výrazně zvýšená hladina glutamátu v celém objemu mozku a tento nález byl vztažen ke změnám chování naměřených v behaviorálních testech (Kumaravel et al., 2012). Lze tedy předpokládat, že tonická exposice světlu v kritické periodě vývoje může posouvat rovnováhu mezi excitační a inhibiční neurotransmisí, jejímž důsledkem jsou změny ve formování neuronální sítě.

Naše experimenty se opírají o poměrně dobře prostudovanou ontogenezi neobrazového vidění u laboratorních hlodavců. Světlocitlivé gangliové buňky (ipRGC -z angl. intrinsic photoresponsive retinal ganglion cells) se u laboratornícsh zvířat vyvíjí již prenatálně a aktivují se poměrně nízkou intenzitou světla vnímanou již přes zavřená víčka (Schmidt et al., 2008; Matějů et al., 2009). Glutamátové receptory jsou v recipientních strukturách také přítomné již prenatálně (Bendová et al., 2009).

V plánovaných experimentech budeme sledovat změny v behaviorálních funkcích, kognitivních funkcích, a změny v glutamátergní neurotransmisi u zvířat, která byla chovaná od narození v podmínkách stálého světla. Budeme sledovat vliv intenzity i spektrálního složení světla působícího v noci a vytvářet takové podmínky, které co nejlépe simulují světelné prostředí typické pro vývoj člověka. Zaměříme se zejména na:

1) kognitivní schopnosti a jejich vývoj
2) emotivní chování a motivaci
3) změny ve strukturách a poměru GABAerních a glutamátergních receptorů a jejich signalizačních kaskád
4) změny v adaptačních vlastnostech cirkadiánního systému/reaktivita na synchronizační stimuly (světelné pulsy) a desynchronizační stimuly (indukovaný jet-lag) v dospělosti
5) změny v adaptaci na stres z pohledu HPA osy.

Literatura:

1) Avgustin B, et al. 2005. Croat Med J. 46(2):268–274.
2) Baverel G, et al. 1990. Biochem J. 268:437–442.
3) Bay-Richter C, et al. 2015. Brain Behav Immun. 43:110–117.
4) Bendová Z, et al. 2009. Neuroscience. 159(2):599-609.
5) Cho, C. H. et al. 2016. Chronobiology international 33, 117–123.
6) Cho, J. R., et al. 2013. Sleep Med. 14, 1422–1425.
7) Dauchy, R. T. et al. 2010. Comp Med. 60, 348–356.
8) Dauchy, R. T. et al. 2015. J Am Assoc Lab Anim Sci 54, 40–50.
9) Farajnia S, et al. 2014. Proc Natl Acad Sci U S A ; 111: 9627–9632.
10) Kang SG, et al. 2016. Sci Rep. Nov 9;6:36731.
11) Kumaravel P, et al 2014. Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis 2012;2:251-7
12) LeGates TA, et al.. 2014 Jul;15(7):443-54.
13) Matejů K, et al. 2009. Eur J Neurosci.29(3):490-501.
14) Obayashi, K., et al. 2014. Chronobiology international 31, 976–982.
15) Schmidt TM, et al. 2008. J Neurophysiol. 100(1):371-84.
16) Walton JC, et al. 2017;4(2). pii: ENEURO.0352-16.2017.

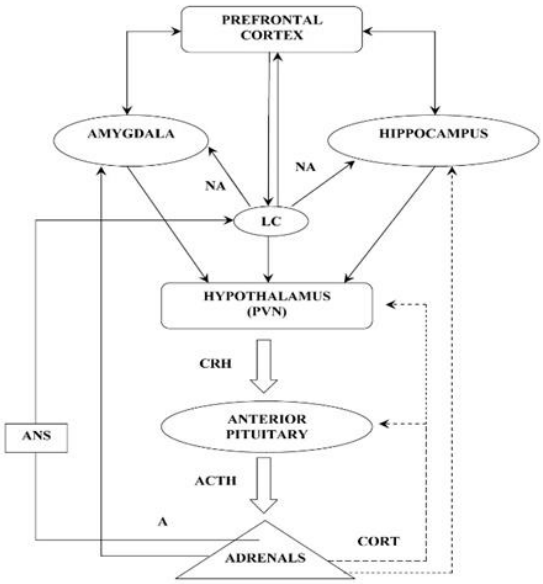
Zapojené instituce:

- Fyziologický ústav AV: doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc., prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.
- Národní ústav duševního zdraví: doc. RNDr. Zdenka Bendová, PhD.

Aktivita 2 – Účinek perinatálního stresu na glutamátergní systém

Perinatální stres je poměrně častá událost v životě, která má hluboký vliv na vztah mezi matkou a dítětem a může kriticky ovlivnit zrání mozkových struktur potomků. Důsledky perinatálního stresu se projevují abnormálním sociálním chováním, emoční nestabilitou a jiným psychopatologickým chováním v pozdějším životě, to vše odráží narušený vývoj a fungování neuroendokrinních obvodů. Zejména je v důsledku nepříznivé zkušenosti z raného života zhoršena responzivita klíčové stresové dráhy, hypotalamo-hypofýzo-adrenální osy (HPA).

Předpokládáme, že perinatální stres může dlouhodobě poškodit hipokampální neurogenezi a vyústit do přetrvávajících změn hipokampální morfologie a funkcí souvisejících s hipokampem.



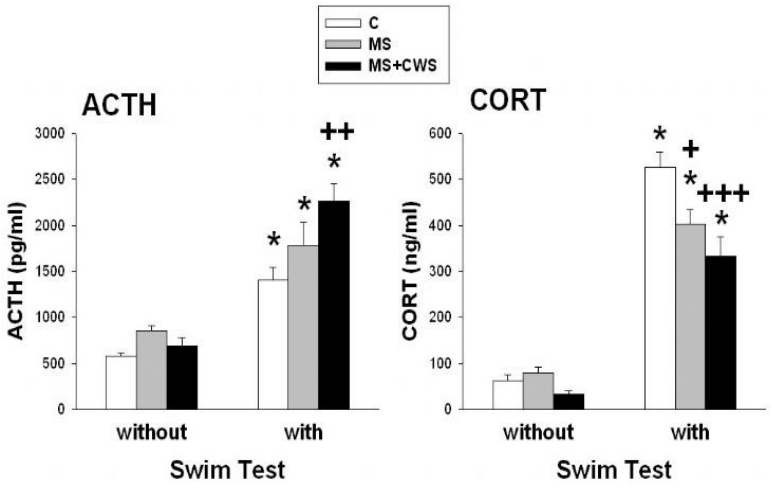
Obrázek 1: Osa HPA a její spojení s limbických systémem. Plné čáry znamenají stimulační efekt, šrafované inhibiční efekt. CRH = kortikotropin uvolňující hormon, ACTH = adrenokortikotropní hormon, CORT = kortikosteron, LC = locus coeruleus, NA = noradrenalin, A = adrenalin, ANS = autonomní nervový systém.

Osa HPA je úzce spojena také s limbickým systémem (viz Obrázek 1). Spoj s amygdalou souvisí se zvýšenou úzkostí způsobenou stresem a spoj s hipokampem souvisí se sníženou schopností učení a pamětí a tzv. Long-Term Potentiation (LTP) (dlouhodobá potenciace) [7]. Hipokampus a prefrontální kůra jsou navíc převážně (ne však výhradně) inhibiční vůči sekreci HPA osy, zatímco amygdala se podílí na aktivaci sekrece glukokortikoidů [2,4]. Amygdala, která se účastní kontroly emočních a autonomních odpovědí na stres, obsahuje nervová zakončení, buňky a receptory uvolňující hormon kortikotropin (CRH). Barros et al. [1] demonstroval, že prenatální stres postihuje specifická jádra v amygdale, což má za následek více anxiogenní chování ve vyvýšeném křížovém bludišti (Elevated Plus Maze - EPM). Sekreční buňky v paraventrikulárním jádru hypotalamu (PVN) přijímají nervové vstupy z mnoha oblastí mozku, včetně hipokampu a parahipokampálních oblastí [6]. Herman et al. [Herman, 2005 #7898] oznámil, že hipokampektomie u potkanů vyvolává výrazné zvýšení exprese CRH mRNA v PVN, což vyústí v hyperaktivitu HPA osy. Tyto výsledky napovídají, že hipokampus reguluje HPA osu inhibičním způsobem, a podporují tak náhled, že dochází k dysregulaci HPA osy. Naopak spojení HPA regulačních oblastí limbického systému s poruchami nálady nasvědčuje tomu, že funkční alterace v hipokampu, prefrontální kůře a amygdale mohou zodpovídat za

hyper- nebo hyposekreci glukokortikoidů, pozorovanou v těchto afektivních stavech [2]. Konečně hipokampus, amygdala a prefrontální kůra vyjadřují jak GR, tak MR, a dělají z nich pravděpodobné cíle působení glukokortikoidů [2].

Také klinická vyšetření potvrzují zjištění, že HPA osa je úzce spojena s limbickým systémem, který může způsobit změny emocí, poznání a osobnosti, ve kterých glutamát hraje důležitou roli. U dětí je perinatální stres spojen s kognitivními, behaviorálními, fyzickými a emočními problémy a stejně tak s autismem a poruchou pozornosti s hyperaktivitou (ADHD) (k posouzení viz [3]). U dospělých je perinatální stres spojen s depresí a schizofrenií [3]. Dopady perinatálního stresu jsou zaznamenány také u zvířat jako snížená sociální hra a utlumené sociální chování, neorientované lokomoční chování (tj. chůze), úzkost a pokles kognitivních funkcí a zaměřený průzkum (k posouzení viz [3]).

Naše předběžné údaje jsou uvedeny ve schématech.

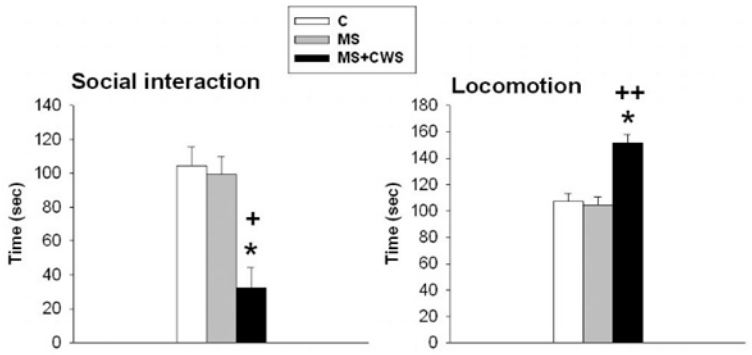


Obrázek 2: Efekt prenatálního stresu na stresovou reakci u dospělých potkaních samců. C = kontroly, MS = separace matky, CWS = stres ze studené vody (u matek)

* p<0,001 vs. zvířata bez testu plavání

\+ p<0,05; ++ p<0,01 +++ p<0,001 vs kontroly s testem plavání

Naše předběžné údaje ukazují, že kombinace stresů MS a CSW vyvolaly větší nárůst ACTH, ale menší nárůst CORT po testu plavání, než tomu bylo u kontrolních zvířat nebo těch vystavených pouze stresu vyvolaném MS.



Obrázek 3: Efekt prenatálního stresu na sociální chování u dospělých potkaních samců. C = kontroly, MS = separace matky, CWS = stres ze studené vody (u matek)

* p<0,001 vs kontroly

\+ p<0,01; ++ p<0,001 vs. zvířata s mateřskou separací

Naše předběžné údaje ukazují, že potomci matek stresovaných během březosti stresem MS plus CWS, ne však pouze MS, projevovali sníženou sociální interakci a zvýšený pohyb.

Použijeme následující metody. Na základě recenze Pacáka a Palkoviče [5] stresor může být chápán jako stimul, který narušuje homeostázu. Mateřská separace, která patří k sociálním stresorům, je jedním ze známých stresorů, který způsobuje hluboké neurochemické a behaviorální změny u mláďat, které se projeví v dospělosti [5]. Fyzické stresory pak mohou být vyvolány chladem, horkem, intenzivním zářením, hlukem, vibrací atd. Stres z bolesti může být také navozen mnoha různými chemickými a fyzikálními činidly [5]. Na základě výše uvedeného a našich předchozích zkušeností bude jeden ze sociálních stresů (mateřská separace = MS) a jeden z typu fyzických stresů (plavání v chladné vodě = CWS) použit v současném projektu.

Pro testování našich hypotéz budou provedeny následující zkoušky:

1) Behaviorální testy poznávání: Na základě našich předchozích výsledků budou zkoušeny poznávací schopnosti (učení a paměť) ve čtyřech typech testů: (a) habituace jako test neasociativního učení, (b) test rozpoznání objektu (ORT) jako test krátkodobé (pracovní) rozpoznávací paměti, (c) test lokalizace objektu (OLT) jako test krátkodobé (pracovní) prostorové paměti, (d) Morrisovo vodní bludiště (MWM) jako test poznávání místa a dlouhodobé prostorové paměti, která závisí na hipokampu.
2) Analýzy neurotransmiterů: Budou analyzovány hladiny glutamátu a GABA v tkáni hipokampu.
3) Analýzy růstového faktoru: Plánujeme analýzu těchto neurotrofinů v hipokampu, společně s pro-apoptotickými Bmax a anti-apoptotickými Bcl-2 proteiny, jejichž produkce je pod kontrolou BDNF, s cílem zjistit apoptotické versus neurogenetické změny v našich experimentálních podmínkách.
4) Neurotoxické účinky: Plánujeme změřit produkty ROS a RNS, jak je popsáno v části Metody.
5) Neuronové aktivity glutamátergních neuronů: Stanovíme expresi c-Fos proteinů za účelem zkoumání aktivity hipokampálních glutamátergních neuronů.
6) Epigenom: Zamýšlíme provést analýzu metylování DNA celého genomu k prozkoumání specifických změn v epigenomu potkanů vystavených stresu MA.

Neurogeneze: Kognitivní poruchy závislé na hipokampu u subjektů užívajících MA lze přičíst alteracím vyvolaným MA ve strukturální a funkční plasticitě hipokampálních neuronů. Předpokládáme, že získáme podobné výsledky účinků MA na poznávání adolescentů, které budou odpovídat neurogenezi v jejich hipokampu.

Literatura:

1) Barros, Rodriguez, Martijena, et al.: Synapse 60: 609-618; 2006.
2) Herman, Ostrander, Mueller, et al.: Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 29: 1201-1213; 2005.
3) Charil, Laplante, Vaillancourt, et al.: Brain Res. Rev. 65: 56-79; 2010.
4) Jacobson and Sapolsky: Endocr. Rev. 12: 118-134; 1991.
5) Pacák and Palkovits: Endocr. Rev. 22: 502-548; 2001.
6) Sapolsky and Meaney: Brain Res. 396: 64-76; 1986.
7) Weinstock: Neurosci. Biobehav. Rev. 32: 1073-1086; 2008.

Aktivita 3 – Dlouhodobé důsledky farmakologické modulace GABAergní neurotransmise v časných stadiích postnatálního vývoje a její vliv na glutamátergní systém v průběhu dalšího vývoje

S použitím látek, specificky ovlivňujících GABAergní transmisi v definovaných stadiích postnatálního vývoje zjistit:

1) Identifikace behaviorálních alterací se zaměřením na kognitivní funkce, poruchy soustředění a poruchy autistického spektra a změn excitability mozku v důsledku blokády excitační funkce GABA v perinatálním období
2) Identifikace alterací na úrovni GABAergního a glutamátergního systému v důsledku blokády excitační funkce GABA v perinatálním období
3) Identifikace změn ve struktuře NMDA a AMPA receptorů, vyvolaných blokádou excitační funkce GABA v perinatálním období.
4) Identifikace molekulárních, celulárních a strukturálních mechanismů behaviorálních změn, vyvolaných augmentací GABAergní inhibice na úrovni v perinatálním období.
5) Identifikace změn ve struktuře NMDA a AMPA receptorů, vyvolaných augmentací GABAergní inhibice v perinatálním období.

I když je GABA majoritním inhibičním neuromediátorem v dospělém savčím mozku, v časných stadiích postnatálního se významně uplatňuje i její funkce trofická a excitační. Excitační efekt GABA není dán specifickými vlastnostmi $GABA_A$ receptorů na nezralých neuronech, ale rozdílnou homeostázou chloridových iontů v nezralém nervovém systému (Ben Ari, 2002). V průběhu vývoje je GABAergní transmise aktivováva jako první a hraje vedoucí roli v postupné aktivaci glutamátergní excitace, která je zpočátku založena čistě na NMDA receptorech a postrádá AMPA složku. V dospělých neuronech brání GABAergní inhibice aktivaci NMDA receptorů, zatímco v nezralých neuronech, v nichž GABA vyvolává depolarizaci místo hyperpolarizace, je působení $GABA_A$ a NMDA receptorů synergistické. Zapojení AMPA receptorů se objevuje až později (Ben Ari et al, 1997). Je tedy zřejmé, že harmonizace tohoto procesu je klíčovým faktorem ve vývoji mozku a utváření neuronálních sítí, a její narušení může vést k trvalým změnám mozkových funkcí.

Farmakologické studie provedené *in vitro* prokazují, že GABA působí v perinatálním období duálně (Khalilov et al, 1999). Již časně postnatálně (postnatální den (P) 7) působí u mláďat potkanů (*in vivo*) agonisté $GABA_A$ receptorů stejně jako u dospělých - sedativně, antikonvulsivně či hypnoticky (Kubová et al, 1993), zároveň bylo však u stejně starých zvířat prokázáno, že blokáda excitačního působení GABA brání v některých modelech vzniku epileptiformní aktivity (Nardou et al, 2009).

Naše předcházející studie ukazují, že krátodobé farmakologické zvýšení GABAergní inhibice u mláďat potkanů (P7-P11) prostřednictvím alosterické modulace $GABA_A$ receptorů benzodiazepiny v klinicky relevantních dávkách vede ke vzniku autistického spektra poruch chování. Exponovaní jedinci vykazují kromě lehkého poškození kognitivních funkcí zejména výrazné poruchy sociálního chování a poruchy soustředění (Mikulecká et al, 2014a,b). Naše přeběžné výsledky prokazují u těchto zvířat rovněž trvale zvýšenou hipokampální excitabilitu, což naznačuje možnost vzniku dlouhodobé dysbalance mezi excitací a inhibicí. Není ale známo, jestli jsou funkční změny způsobené změnami na úrovni neurotransmiterů nebo na úrovni celulární či reorganizací neuronálních sítí. Výsledky z jiných pracovišt prokazují, že časná blokáda excitační funkce GABA vede k senzorimotorickému deficitu (Wang and Kriegstein, 2010). Další funkční důsledky této blokády, ani změny na úrovni $GABA_A$/NMDA/AMPA receptorů nebyly dosud popsány.

Farmakologické ovlivnění látkami se známým mechanismem účiku představuje nejpřímnějším způsob modulace jednotlivých složek $GABA_A$/NMDA/AMPA systému ve zvoleném vývojovém období. Zároveň přináší možnost další analýzy mechanismů, odpovědných za vznik neurovývojových poruch, vyvolaných změnami prostředí či vnějšími faktory, které budou studovány v Aktivitě 1.

S pomocí baterie behaviorálních testů, testů na excitabilitu a testů na stabilitu cirkadiánního systému, jako příkladu funkčnosti homeostatických funkcí mozku, budeme studovat vliv krátkodobé farmakologické blokády excitačního působení GABA s pomocí bumetanidu a zvýšení GABAergní inhihice pomocí agonistů $GABA_A$ receptorů v průběhu kritických vývojových period na vybrané mozkové funkce. Zaměříme se zejména na kognitivní schopnosti a jejich vývoj, emotivní chování, motivaci a schopnost soustředění, excitabilitu vybraných mozkových struktur a cirkadialni rytmicitu na behaviorální a molekulární úrovni.

Literatura:

1) Ben-Ari Y. 2002. Nat. Rev. Neurosci. 2002;3: 728-739
2) Ben-Ari Y et al. 1997.Trends Neurosci. 20:523-529.
3) Khalilov et al. 1999. Dev Neurosci. 21:310-319.
4) Kubová, H., et al. 1993. J. Pharm. Pharmacol. 45: 807-810,
5) Nardou R, et al. 2009. J Neurophysiol. 101:2878-2888.
6) Mikulecká A, et al. 2014. Front Behav Neurosci. 8: 101. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00101. eCollection.
7) Mikulecká A, et al. 2014. Front Behav Neurosci. 8:169. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00169. eCollection.
8) Wang DD,and Kriegstein AR. 2011. Cereb Cortex. 21:574-587

Zapojené instituce:

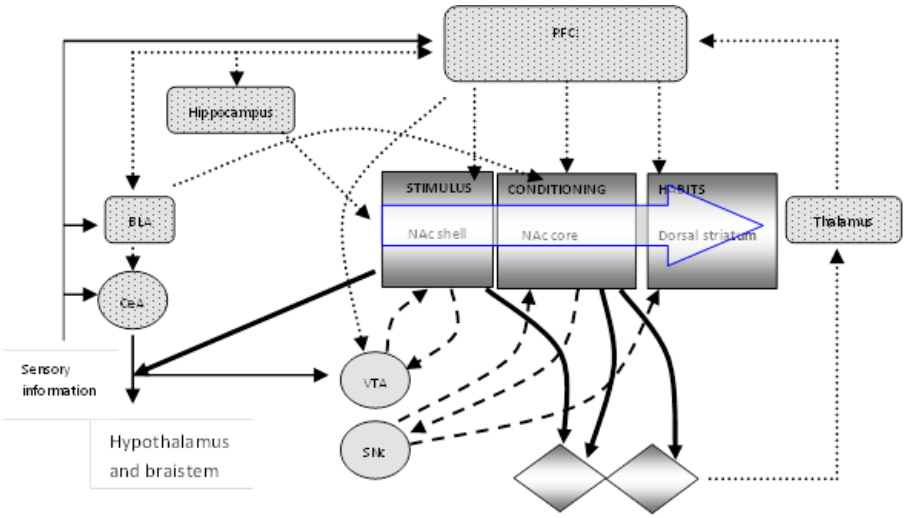
- Fyziologický ústav AV - doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc.
- Národní ústav duševního zdraví - RNDr. Karel Valeš, PhD.

Aktivita 4 – Role glutamátergní neurotransmise v rozvoji závislosti

Závislost dnes stále představuje akutní problém. Drogová závislost se nevyvine při prvním okusení drogy a nerozvíjí se u každého jednotlivce, který drogy užívá. V tomto procesu hraje roli několik faktorů, jako jsou faktory prostředí, stres a také genetické dispozice. Charakteristiky lidí užívajících drogy: (1) impulzivnost, (2) kompulzivita, (3) hledání nového, (4) hledání vzrušujících zážitků a (5) nesprávné rozhodování. Zdá se, že hledání nového bez impulzivnosti nevede k drogové závislosti [4]. Silná impulzivnost zvyšuje kompulzivní chování navzdory všem negativním důsledkům, které plynou z užívání drog. To pak může vést k drogové závislosti. Glutamát je důležitý neurotransmiter v „systému odměny“ a vývoji dogové závislosti (viz Obrázek 1).

V rámci aktivity budeme zkoumat:

1) Účinek MA na glutamátergní systém v „obvodu odměny“. Předpokládáme, že časná expozice metamfetaminu (MA) může dlouhodobě narušit hipokampální neurogenezi a způsobit přetrvávající změny hipokampální morfologie a vývoje funkcí souvisejících s hipokampem, a přivodit přetrvávající změny hipokampální morfologie a funkcí souvisejících s hipokampem.
2) Epigenetické faktory, které upravují vliv MA na glutamátergní systém v obvodu odměn. Předpokládáme, že adekvátní mateřská péče spolu se zlepšenými podmínkami prostředí během maturace bude nejenom pozitivně modulovat neurogenezi, ale také částečně odstraní nepříznivý funkční výsledek zvířat vystavených během raného vývoje MA. circuit



Obrázek 1: Mezolimbický (kortiko-striatální) systém odměny {převzato z (Everitt 2005)}. PFC = prefrontální kortex; BLA = balaterální jádro amygdaly; CeA = hlavní jádro amygdaly; NAc = nucleus accumbens; VTA = ventrální tegmentální oblast; SNc = substantia nigra pars compacta; VGP = ventrální globus pallidus; DGP = dorzální globus pallidus. Čáry a vzorce = neuromediátorové systémy: glutamátergní = tečkované čáry a pole; dopaminergní = „zaškrtnuté“ čáry a stínová pole; GABAergic = přerušované čáry a bílá pole.

Metamfetamin (MA) je jednou z nejrozšířenějších drog v České republice a na celém světě. Humánní studie prokázaly, že MA má přetrvávající dopady na poznávání v dětství a dospívání. Děti vystavené působení MA vykazují poškození prostorové paměti spojené s hipokampem a mají menší hipokampus. Animální studie zkoumající účinky expozice MA během vývoje mozku odpovídají klinickým studiím. Studie z naší a jiných laboratoří prokázaly, že prenatální nebo neonatální expozice MA vážně narušuje chování dospělých potkanů a jejich citlivost vůči drogám [12]. Určitá část hipokampálního vývoje u potkanů probíhá během prvních tří týdnů po narození [1] a tato část vývoje představuje nejkritičtější období, pokud jde o nepříznivé účinky expozice MA na funkce související s hipokampem.

Několik předchozích studií, včetně naší, již prokázalo, že u potkanů vystavených MA během tohoto kritického období se v dospělosti projevuje poškozené prostorové učení [6,17]. Mnohem méně se ví o možném kognitivním poškození a změnách v chování u adolescentů vystavených MA během raného postnatálního vývoje. Adolescence je období přechodu mezi dětstvím a dospělostí, které probíhá u lidí stejně jako u hlodavců, kdy probíhající vývoj struktury a funkce nervových systémů podílejících se na emocích a poznávání, především prefrontální kůry a související dráhy, činí dobu adolescence v rúzné míře zranitelnější vůči působení drog.

Tato postupná transformace od nezralosti ke zralosti a nezávislosti je vývojová fáze společná všem různým druhům savců, v níž se adolescenti někdy dramaticky odlišují od mladších či starších jedinců svého druhu ve způsobech, jak reagují a interagují na stimuly ve svém prostředí [11]. Podle některých náhledů humánní adolescenti zažívají více stresujících a negativních životních zkušeností než děti a dospělí (k posouzení viz [16]). Samotný vývojový přechod od nezralosti směrem ke zralosti může být stresující, zejména když kapacita dospívajících vyrovnávat se s různými výzvami prostředí a společnosti je přetížena velikostí a rychlostí neurálních, behaviorálních a hormonálních změn spojených s dospíváním. Adolescence je také obdobím vývoje, v němž vznikají četné neuroplasticity v celém centrálním nervovém systému (CNS) [18]. Nedávno Siegel et al. [10] prokázali kognitivní poškození, ne však poruchu nálady, u dospívajících myší vystavených MA během 2. a 3. týdne po narození. Mechanismy zodpovědné za takové nepříznivé efekty bude třeba dále zkoumat.

Účinek MA na glutamátergní systém v „obvodu odměny“

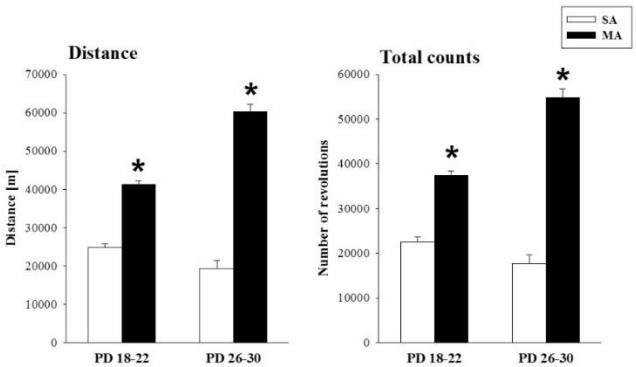
Předpokládáme, že raná expozice MA může dlouhodobě poškodit hipokampální neurogenezi a vyústit do přetrvávajících změn hipokampální morfologie a funkcí souvisejících s hipokampem.

Přestože přesná úloha tohoto procesu nám dosud uniká, víme, že hipokampální neurogeneze je u dospělých důležitá pro učení a paměť, přitom ji postihují chorobné podmínky spojené s kognitivní poruchou, depresí a úzkostí. Hipokampální neurogeneze je pozitivně modulována širokým spektrem stimulů, jako je fyzická aktivita, obohacené prostředí nebo antidepresivní léky. Na druhé straně může být neurogeneze potlačena stresem nebo toxikomanií (k posouzení 9). Studie účinků MA na hipokampální neurogenezi přinášejí poněkud sporná data, nicméně většina těchto studií prokázala spíše potlačující účinky podávání MA na buněčnou proliferaci (k posouzení 8). Chybí jakékoli studie zkoumající dlouhodobé účinky rané expozice MA a její možnou souvislost s kognitivní poruchou. Jak je uvedeno výše, neurogeneze v dospělosti za různých podmínek vzrůstá a taková pozitivní modulace může být spojena se zlepšováním poznávání i nálady.

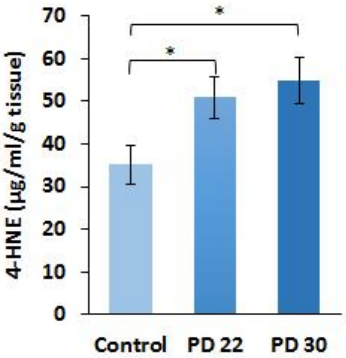
Epigenetické faktory, které upravují vliv MA na glutamátergní systém v obvodu odměny

Předpokládáme, že adekvátní mateřská péče spolu se zlepšenými podmínkami prostředí během maturace budou nejen pozitivně modulovat neurogenezi, ale také částečně odstraní nepříznivý funkční výsledek zvířat vystavených MA během raného vývoje. Existuje několik epigenetických faktorů, které mohou ovlivnit dlouhodobé změny vyvolané ranou expozicí MA. Nejdůležitější z nich jsou postnatální náhradní rodičovská péče, výživa a prostředí 2,3,15. Naše předchozí studie již ukázaly, že závislost matky během březosti a/nebo období laktace poškozují mateřské chování, které má záporné účinky na vývoj mláděte 13,14. Tento poškozující účinek prenatání expozice MA lze částečně potlačit náhradní péčí kontrolní samice s mláďaty, což ukazuje pozitivní účinek dobré postnatální náhradní péče 6,7. Na druhé straně mateřská separace vyvolávající sociální stres a fyzický stres matky zhoršují kognitivní poškození a reakci na stresory u exponovaného potomstva 5. Již jsme prokázali, že sociální faktory jako je špatná nebo dobrá mateřská péče, nebo stres matky nepřímo ovlivňující mláďata, mají významný vliv na vývoj potkanů vystavených účinku MA během vývoje.

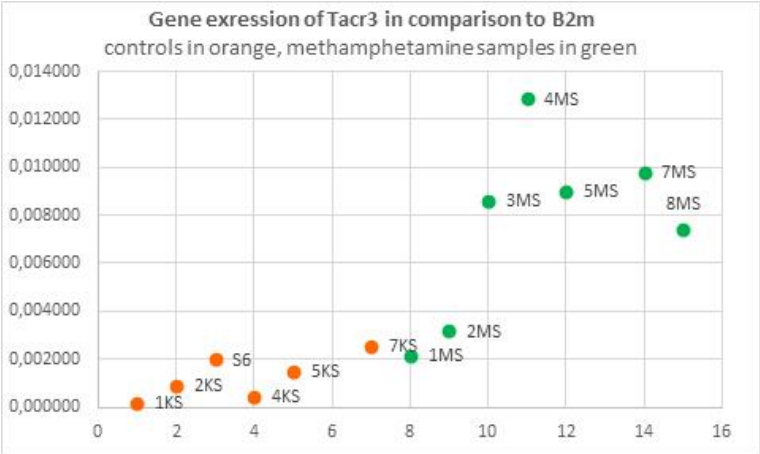
Naše předběžné údaje jsou uvedeny v následujících schématech:



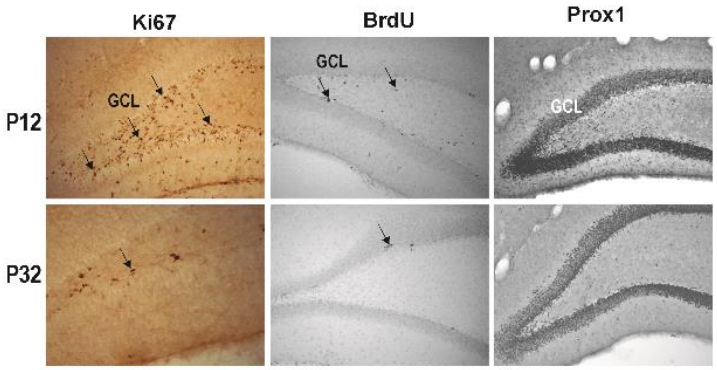
Obrázek 2: Máme údaje prokazující, že expozice MA matky (PD 1-12) má vliv na běhání na kole potkaních mláďat PD 18-22 a PD 26-30. Hodnoty jsou souhrnem vzdálenosti a celkové počty pro období 5 dnů; střed.hod. ± SEM. * p<0,05 vs. kontroly fyziolog. roztokem.



Obrázek 3: Naše předběžné výsledky analyzující 4-hydroxynonenal (4-HNE), který je hlavním aldehydem vzniklým během peroxidace lipidů ω-6 polynenasycených mastných kyselin, ukazují, že expozice MA matky (PD 1-12) zvyšuje hodnotu 4-HNE u 22- a 30-denních zvířat vzhledem ke kontrolám fyziol. roztokem. Tyto výsledky napovídají zvýšenou oxidační stresovou reakci vyvolanou podáním MA. Střed. hod. ± SEM. * p<0,05 vs. kontroly fyziolog. roztokem.



Obrázek 4: Provedli jsme RNA microarray včetně analýz exprese 29489 genů u 6 vzorků: 3 od potkanů vystavených metamfetaminu (MS) a 3 od kontrolních potkanů (KS). Nebyl zjištěn žádný významný rozdíl genové exprese, ale byla zaznamenána up-regulace genu Tac3. Když jsme testovali změny genové exprese reakcí PCR ve skutečném čase s použitím zkoušky TaqMan® Gene Expression Assays pro tento gen, zjistili jsme, že exprese genu Tacr3 výrazně vzrosla u MS v porovnání s genovou expresí u KS a ve srovnání s expresí referenčního genu B2m. Tacr3 (Tachykinin receptor 3) je receptor pro tachykininy, které excitují neurony, vyvolávají behaviorální reakce, jsou silnými vázodilatátory a vyvolávají (přímo či nepřímo) kontrakce mnoha hladkých svalů.



Obrázek 5: Obrázek znázorňuje vývojové rozdíly v buněčné proliferaci v gyru dentatus mezi potkany starými dvanáct (řada nahoře) a třicet dva (řada dole) dnů. Všechny tři markery buněčné proliferace (zleva – Ki67, BrdU a Prox1) vykazují vyšší expresi u nedospělých než u adolescentních, dosud neléčených a normálně se vyvíjejících zvířat.

Pro testování našich hypotéz budou provedeny následující zkoušky:

1) Behaviorální testy poznávání: Na základě našich předchozích výsledků budou zkoušeny poznávací schopnosti (učení a paměť) ve čtyřech typech testů: (a) habituace jako test neasociativního učení, (b) test rozpoznání objektu (ORT) jako test krátkodobé (pracovní) rozpoznávací paměti, (c) test lokalizace objektu (OLT) jako test krátkodobé (pracovní) prostorové paměti, (d) Morrisovo vodní bludiště (MWM) jako test poznávání místa a dlouhodobé prostorové paměti, která závisí na hipokampu.
2) Analýzy neurotransmiterů: Budou analyzovány hladiny glutamátu a GABA v tkáni hipokampu.
3) Analýzy růstového faktoru: Plánujeme analýzu těchto neurotrofinů v hipokampu, společně s pro-apoptotickými Bmax a anti-apoptotickými Bcl-2 proteiny, jejichž produkce je pod kontrolou BDNF, s cílem zjistit apoptotické versus neurogenetické změny v našich experimentálních podmínkách.
4) Neurotoxické účinky: Plánujeme změřit produkty ROS a RNS, jak je popsáno v části Metody.
5) Neuronové aktivity glutamátergních neuronů: Stanovíme expresi c-Fos proteinů za účelem zkoumání aktivity hipokampálních glutamátergních neuronů.
6) Epigenom: Zamýšlíme provést analýzu metylování DNA celého genomu k prozkoumání specifických změn v epigenomu potkanů vystavených stresu MA.
7) Neurogeneze: Kognitivní poruchy závislé na hipokampu u subjektů užívajících MA lze přičíst alteracím vyvolaným MA ve strukturální a funkční plasticitě hipokampálních neuronů. Předpokládáme podobné výsledky dopadů MA na poznávání adolescentů, jak odpovídá neurogenezi v jejich hipokampu.

Zapojené instituce:

3. Lékařská fakulta UK: prof. MUDr. Romana Šlamberová, PhD.

Literatura:

1) Clancy, Finlay, Darlington, et al.: Neurotoxicology 28: 931-937; 2007.

2) de Souza, Fernandes and do Carmo: Nutr. Rev. 69: 132-144; 2011.

3) Dhanushkodi and Shetty: Neurosci. Biobehav. Rev. 32: 657-674; 2008.

4) Everitt and Robbins: Nat. Neurosci. 8: 1481-1489; 2005.

5) Holubová, Štofková, Jurčovičová, et al.: Physiol. Res. 65: S557-S566; 2016.

6) Hrubá, Schutová, Pometlová, et al.: Behav. Brain Res. 208: 63-71; 2010.

7) Hrubá, Schutová, Šlamberová, et al.: Dev. Psychobiol. 51: 73-83; 2009.

8) Cho and Kim: Arch. Pharm. Res. 33: 1475-1488; 2010.

9) Opendak and Gould: Trends Cogn. Sci. 19: 151-161; 2015.

10) Siegel, Park and Raber: Behav Brain Res 219: 159-164; 2011.

11) Spear: Neurosci. Biobehav. Rev. 24: 417-463; 2000.

12) Šlamberová: Physiol Res. 61 S123-135; 2012.

13) Šlamberová, Charousová and Pometlová: Reprod. Toxicol. 20: 103-110; 2005.

14) Šlamberová, Pometlová and Charousová: Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 30: 82-88; 2006.

15) van Praag: Trends Neurosci. 32: 283-290; 2009.

16) Varlinskaya and Spear: Alcohol 44: 99-110; 2010.

17) Williams, Blankenmeyer, Schaefer, et al.: Brain Res. Dev. Brain Res. 147: 163-175; 2003.

18) Yang, Swann and Dafny: Brain Res. Bull. 71: 301-310; 2006.

Aktivita 5 – Efekt dlouhodobé tonické excitace světlem v noci (LAN) v raném postnatálním vývoji na zrání cirkadiánních hodin, neurochemie mozku a zranitelnost vůči narušení denního rytmu druhotnými událostmi v pozdějším životě

V navrhovaných experimentech budeme sledovat změny v behaviorálních funkcích, kognitivních funkcích, metabolické funkce mozku a poruchy cirkadiánního systému a jeho reaktivity na světelné stimuly v dospělosti u zvířat, která byla chovaná od narození v podmínkách stálého světla, které působí tonicky excitačně na vyvíjející se CNS. Budeme sledovat vliv intenzity i spektrálního složení světla působícího v noci a vytvářet takové podmínky, které co nejlépe simulují světelné prostředí typické pro vývoj člověka v moderní společnosti.

Dílčí kroky aktivity:

1) prozkoumat, jak neonatální odchov za stálého světla (LL) ovlivňuje vývoj glutamátergní/GABAergické sítě v cirkadiánním rytmu a mozku a jak ovlivňuje chování v dospělosti

2) prozkoumat dopad měnícího se poměru intenzity světla a světelného spektra LAN na vyvíjející se molekularní, biochemické a behaviorální abnormality spojené s circadiánními hodinami. Tento přístup bude testovat myšlenku, že LAN v intenzitě a spekru podobném přirozeně se vyskytující během západu slunce vyvolá méně škodlivý efekt na vývoj biologických hodin a mozku.

3) prozkoumat zranitelnost zvířat chovaných v nočním osvětlení vůči externím událostem, které mohou vyvolat dlouhodobou změnu v homeostáze mozku. Konkrétně bude testována citlivost vůči LPS.

4) prozkoumat citlivost na světelný entrainment a desynchronizační efekt světla na zvířata chovaná za působení LAN v dospělosti

Hlavním předpokladem pro vývoj neuropsychiatrických chorob je interakce mezi vnějším prostředím a genetickými faktory, která může vést k patologické přestavbě neuronálních obvodů. Častá expozice světlu s vlnovou délkou v modrém spektru dlouho do noci je spojována s rozvojem mnoha civilizačních chorob. Podle průzkumů zdravotnických organizací po celém světě více než 30% rodičů nechává své děti spát při zapnutých elektronických přístrojů jako je televize, tablety, počítače nebo chytré telefony. Ložnice ve velkých městech jsou navíc osvětleny více než 10 luxy pronikajícího světla z ulice a světelného smogu. Takové množství světla v noci je v lidské historii bezprecedentní a dnes je chápáno jako velké ohrožení zdraví a kvality života lidí.

Observační studie u lidí ukázaly, že vystavení LAN v ložnici je spojeno s insomnií (Obayashi et al., 2014) a zvýšenou četností buzení (Cho et al., 2013, 2016), obezitou (McFadden et al., 2014) a dyslipidemií (Obayashi et al., 2013). Expozice tlumenému světlu během spánku v noci navíc snížila hloubku spánku a světlo o síle pouhých 10 luxů během spánku má neblahý efekt na kognitivní mozkové funkce, jak bylo změřeno fMRI (Kang et al., 2016). U animálních modelů dlouhodobé vystavení stálému světlu narušuje chování circadiánního rytmu (Fonken et al., 2010; Coomans et al., 2013), snižuje celkovou dobu bdění (Stephenson et al., 2012), vyvolává depresivní příznaky a kognitivní poškození, redukuje amplitudu hormonálních rytmů (Dauchy et al., 2010, 2015) a způsobuje obezitu a cukrovku 2. typu (Fonken et al., 2010; Coomans et al., 2013).

Nejlépe prozkoumaný patologický efekt LAN je okamžité potlačení melatoninu, které nastane během jedné minuty po expozici LAN. Světelné informace jsou zprostředkovány glutamátergním retinohypothalamickým traktem do SCN, kde aktivují GABAergickou neurotransmisi do PVN, která ihned zastaví posílání induktivních signálů do epifýzy (Kalsbeek et al. 1999). Glutamátergní retinohypothalamický trakt ovšem nekončí jenom v SCN. Souběžné přenosy informací byly zaznamenány v laterálním hypothalamu, laterální habenule, mediální amygdale a ventrolaterální preoptické oblasti. Oblasti účastnící se kontroly nálady a kognitivních funkcí, jako ventrální tegmentální oblast, nuclei raphe a hipokampus, jsou ovlivňovány světlem prostřednictvím GABA a glutamátergních signálů z SCN, mediální amygdaly nebo habenuly (LeGates et al., 2014). Dlouhodobé vystavení LAN tak znamená obrovskou zátěž pro homeostatické procesy v mozku, buďto závislé na melatoninu nebo pod přímou kontrolou SCN a dalších světelně senzitivních hypothalamických struktur.

Bylo prokázáno, že vystavení zvířat dlouhé fotoperiodě zvyšuje úroveň GABAergické excitace v neuronech SCN (Farajnia et al., 2014). Lze předpokládat, že tonické ozařování světlem vede k posunům rovnováhy mezi neuronální excitací a inhibicí a následným změnám vlastností v síti SCN. Kromě toho záznamy elektrické aktivity z SCN volně se pohybujících myší ukazují akutní zažíhání SCN neuronů v závislosti na světle, které se udržuje po celou dobu trvání stimulu. Byla také zjištěna zvýšená úroveň glutamátu v mozku laboratorních zvířat chovaných za stálého osvětlení, což bylo spojeno s významnými změnami v chování, zhodnocenými testem otevřeného prostoru (Kumaravel et al., 2012).

Ontogenetický vývoj projekcí sítnice závisí na GABAergických progenitorových buňkách (Delogu et al., 2012). Expozice LAN během kritického vývojového období může vést ke změnám v GABAergické funkci a vyvolat tonické glutamátergní uvolňování ze zakončení sítnice v SCN a také dalších oblastí mozku reagujících na světlo, což má za následek vznik neuspořádané neuronální sítě v mozkun. Rostoucí řada důkazů zdůrazňuje, že vyvíjející se biologické hodiny jsou více zranitelné vůči narušování stálým osvětlením a buněčná desynchronizace během zrání biologických hodin může mít dlouhotrvající účinky (Ohta et al., 2006). Proto předpokládáme, že stálé osvětlení pravděpodobně vytváří trvalý excitační proud, který mění poměr inhibičních a excitačních neurotransmisí, což narušuje koordinovaný vývoj neuronálních sítí v mozku a zvyšuje tak zranitelnost vůči následným událostem zacíleným na „*ménage à trois*".

Zapojené sujekty:

- Fyziologický ústav AV: doc. PharmDr. Hana Kubová, DrSc.
- Národní ústav duševního zdraví: doc. RNDr. Bendová, PhD; RNDr. Karel Valeš, PhD.
- 3. lékařská fakulta UK – prof. MUDr. Romana Šlamberová, PhD

Literatura:

1) Cho, C. H. et al. Exposure to dim artificial light at night increases REM sleep and awakenings in humans. Chronobiology international 33, 117–123 (2016).

2) Cho, J. R., Joo, E. Y., Koo, D. L. & Hong, S. B. Let there be no light: the effect of bedside light on sleep quality and background electroencephalographic rhythms. Sleep Med. 14, 1422–1425 (2013).

3) Coomans, C. P. et al. Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. FASEB journal 27, 1721–1732 (2013).

4) Dauchy, R. T. et al. Dark-phase light contamination disrupts circadian rhythms in plasma measures of endocrine physiology and metabolism in rats. Comp Med. 60, 348–356 (2010).

5) Dauchy, R. T. et al. The influence of red light exposure at night on circadian metabolism and physiology in Sprague-Dawley rats. J Am Assoc Lab Anim Sci 54, 40–50 (2015).

6) Delogu A, Sellers K, Zagoraiou L, Bocianowska-Zbrog A, Mandal S, Guimera J, Rubenstein JL, Sugden D, Jessell T, Lumsden A. Subcortical visual shell nuclei targeted by ipRGCs develop from a Sox14+-GABAergic progenitor and require Sox14 to regulate daily activity rhythms. Neuron. 2012 Aug 23;75(4):648-62.

7) Farajnia S, van Westering TL, Meijer JH, Michel S. Seasonal induction of GABAergic excitation in the central mammalian clock. Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111: 9627–9632.

8) Fonken, L. K. et al. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. PNAS 107, 18664–18669 (2010).

9) Kalsbeek A, Cutrera RA, Van Heerikhuize JJ, Van Der Vliet J, Buijs RM. GABA release from suprachiasmatic nucleus terminals is necessary for the light-induced inhibition of nocturnal melatonin release in the rat. Neuroscience. 1999;91(2):453-61.

10) Kang SG, Yoon HK, Cho CH, Kwon S, Kang J, Park YM, Lee E, Kim L, Lee HJ. Decrease in fMRI brain activation during working memory performed after sleeping under 10 lux light. Sci Rep. 2016 Nov 9;6:36731.

11) Kumaravel P, Subash S, Seethalakshmi KS, Murugan N, Yuvarajan R, Subramanian P. Monosodium glutamate modulates the circadian rhythms of biochemical variables and behavioral activity in rats under constant light. Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis 2012;2:251-7

12) LeGates TA, Fernandez DC, Hattar S. Light as a central modulator of circadian rhythms, sleep and affect. Nat Rev Neurosci. 2014 Jul;15(7):443-54.

13) McFadden, E., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. The relationship between obesity and exposure to light at night: cross-sectional analyses of over 100,000 women in the Breakthrough Generations Study. American journal of epidemiology 180, 245–250 (2014).

14) Obyashi, K. et al. Exposure to Light at Night, Nocturnal Urinary Melatonin Excretion, and Obesity/Dyslipidemia in the Elderly: A Cross-Sectional Analysis of the HEIJO-KYO Study. JCEM 98, 337–344 (2013). www.nature.com/scientificreports/ Scientific Reports | 6:35662 | DOI: 10.1038/srep35662 11

15) Obayashi, K., Saeki, K. & Kurumatani, N. Association between light exposure at night and insomnia in the general elderly population: the HEIJO-KYO cohort. Chronobiology international 31, 976–982 (2014).

16) Ohta H, Mitchell AC, McMahon DG. Constant light disrupts the developing mouse biological clock. Pediatr Res. 2006 Sep;60(3):304-8.

17) Raap, T., Pinxten, R. & Eens, M. Light pollution disrupts sleep in free-living animals. Scientific reports 5, 13557 (2015).

18) Stephenson, R., Lim, J., Famina, S., Caron, A. M. & Dowse, H. B. Sleep-wake behavior in the rat: ultradian rhythms in a light-dark cycle and continuous bright light. Journal of biological rhythms 27, 490–501 (2012).