



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

---

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

# **Analýza změn vývoje hipokampu v rané fázi adolescence po podání metamfetaminu**

## **Analysis of changes in hippocampal development in early adolescence after methamphetamine administration**

Bakalářská práce

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalářské práce: Kristýna Patková

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Barbora Čechová

---

**Kladno 2022**

## I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: Patková Jméno: Kristýna Osobní číslo: 469722  
Fakulta: Fakulta biomedicínského inženýrství  
Garantující katedra: Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva  
Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

## II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Analýza změn vývoje hipokampu v rané fázi adolescence po podání metamfetaminu

Název bakalářské práce anglicky:

Analysis of Changes in Hippocampal Development in Early Adolescence after Methamphetamine Administration

Pokyny pro vypracování:

Hipokampus patří do limbického systému a hraje významnou roli při konsolidaci informací z krátkodobé do dlouhodobé paměti. Předmětem bakalářské práce bude zkoumání vývoje hipokampu u laboratorních potkanů v rané fázi adolescence při podávání metamfetaminu. Teoretická část bude zaměřena na popis metamfetaminu a jeho vlivu na organismus. Dále bude probírána současná situace užívání metamfetaminu ve světě a v ČR. Zahrnut bude i popis vývoje lidského jedince v období adolescence, neboť osoby v této vývojové etapě podléhají zneužívání návykových látek nejčastěji. Praktická část bude obsahovat rozbor působení metamfetaminu pomocí experimentu na zvířeti. Pokusným jedincům bude podáván metamfetamin. Zkoumáno bude jejich chování a schopnosti, dále pak budou odebírány vzorky ze tkáně hipokampu a pomocí vybraných markerů bude vyhodnocen vliv metamfetaminu na jeho vývoj v rané adolescenci. Základními metodami pro dosažení výsledků bude Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) v kombinaci s metodou Western Blot.

Seznam doporučené literatury:

- [1] BALÍKOVÁ, Marie, Forezní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření, ed. 2 doplněné, Galén, 2017, ISBN 978-80-7492-304-3
- [2] ALVES, R.L., OLIVEIRA, P., LOPES, I.M. et al, Early-life stress affects drug abuse susceptibility in adolescent rat model independently of depression vulnerability, online, Sci Rep , ed. 2020, ročník 10, číslo 1, Přístupné z: doi: 10.1038/s41598-020-70242-4, ISSN 2045-2322
- [3] MOUTON, M., HARVEY, B.H., COCKERAN, M. et al. , The long-term effects of methamphetamine exposure during pre-adolescence on depressive-like behaviour in a genetic animal model of depression, online, Metab Brain Dis 31, ed. 2016, ročník 31, číslo 1, Přístupné z: doi.org/10.1007/s11011-015-9765-y, ISSN 0885-7490

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

Mgr. Barbora Čechová

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: 20.09.2021

Platnost zadání bakalářské práce: 22.09.2023

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Analýza změn vývoje hipokampu v rané fázi adolescence po podání metamfetaminu vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 09.05.2022

.....  
Kristýna Patková

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Barboře Čechové za její trpělivost, ochotu a cenné rady při vedení mé bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala přednostce Ústavu fyziologie 3.LF UK prof. MUDr. Romaně Šlamberové PhD. za možnost realizace mé práce, a MUDr. Daniele Obitkové za konzultace ohledně formální stránky práce.

## ABSTRAKT

Mechanismy vlivu metamfetaminu na organismus jsou stále předmětem zkoumání. Neurotoxická, zejména pak oxidativní stres a účinky na neurotransmitery představují hlavní problémy při expozici metamfetaminu. Bakalářská práce se v teoretické části zabývá látkami patřícími mezi psychostimulancia, zejména se zaměřením na metamfetamin. Detailně je popsán mechanismus neurotoxicity metamfetaminu. Probrána je i epidemiologie užívání této drogy ve světě a v České republice. V této části je zahrnuta i neurogeneze hipokampu. Dále jsou zde obecně popsány neurotransmitery a jejich úloha v organismu.

Praktická část obsahuje popis metodiky analýzy markerů vývoje hipokampu a rozbor působení metamfetaminu na tyto markery pomocí experimentu na zvířeti. Jednalo se zejména o látky patřící mezi neurotransmitery, jako je dopamin (DA), noradrenalin (NA), glutamát (GLU), kyselina gama-aminomáselná (GABA) a serotonin (SER). Jako hlavní marker neurogeneze byl vybrán doublecortin. Potkani byli rozděleni do tří skupin po deseti jedincích. Skupina M byla pravidelně během rané fáze adolescence vystavována účinkům metamfetaminu, u skupiny S probíhalo vyvolání stresové reakce v podobě vpichu do podkoží a skupina C byla zvolena jako kontrolní. Pokusným jedincům byl podáván metamfetamin, následně probíhal behaviorální test a poté analýza metodami Western blot a ELISA ze vzorku tkáně hipokampu, který byl odebrán po ukončení testu učení a paměti v Morrisově vodním bludišti (MWM).

Při hodnocení behaviorálního testu v MWM byly hodnoceny tři parametry – rychlost nalezení ostrůvku, dráha zvířete během testování a rychlost jeho plavání. V testu byla hodnocena fáze učení a test paměti. Rozdíly mezi skupinami byly zaznamenány zejména v testu paměti. Při analýze metodou ELISA nebyly nalezeny žádné signifikantní rozdíly v koncentracích neurotransmiterů v tkáni mezi skupinami laboratorních zvířat. Taktéž při hodnocení doublecortinu metodou Western blot, nebyly zaznamenány žádné změny.

## **Klíčová slova**

Psychostimulancia; metamfetamin; neurotoxicita; adolescence; neurotransmitery

## **ABSTRACT**

The mechanisms of methamphetamine's effects on the body are still under investigation. Neurotoxicity, in particular oxidative stress, and effects on neurotransmitters, are major concerns in methamphetamine exposure. The theoretical part of the thesis deals with substances belonging to the category of psychostimulants, with a particular focus on methamphetamine. The mechanism of neurotoxicity of methamphetamine is described in detail. The epidemiology of the use of this drug in the world and in the Czech Republic is also discussed. The neurogenesis of the hippocampus is also included. In addition, neurotransmitters and their role in the organism are generally described.

The practical part includes a description of the methodology of analysis of markers of hippocampal development and the analysis of the effect of methamphetamine on these markers using experiment on animals. Our main focus was on substances belonging to neurotransmitters such as dopamine (DA), noradrenaline (NA), glutamate (GLU), gamma-aminobutyric acid (GABA) and serotonin (SER). Doublecortin was selected as the main marker of neurogenesis. The rats were divided into three groups of ten individuals each. Group M was regularly exposed to methamphetamine during early adolescence, group S was subjected to stress in the form of subcutaneous injection and group C was chosen as control group. The experimental subjects were administered with methamphetamine, followed by a behavioral test and then we analyzed the hippocampal tissue sample using Western blot and ELISA. The samples were collected after the Morris Water Maze (MWM) learning and memory test.

Three parameters were evaluated in the behavioral test in the MWM: the speed of finding the island, the animal's path of movement during each test, and its swimming speed. We were evaluating learning capacity and memory. When we analyzed the collected data by ELISA, there were no significant differences in neurotransmitter tissue concentrations between the groups. Similarly, when doublecortin was assessed by Western blot, no changes were noted.

## **Keywords**

Psychostimulants; methamphetamine; neurotoxicity; adolescence; neurotransmitters



## Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce .....	11
3	Současný stav .....	12
3.1	Centrální nervový systém .....	12
3.2	Hematoencefalická bariéra .....	12
3.3	Limbický systém .....	12
3.3.1	Hipokampus .....	13
3.3.2	Amygdala .....	13
3.3.3	Hypotalamus .....	14
3.4	Neurogeneze v dospívání .....	14
3.5	Neurotransmitery .....	15
3.5.1	Glutamát.....	15
3.5.2	GABA .....	16
3.5.3	Katecholaminy jako neurotransmitery .....	17
3.5.4	Serotonin .....	19
3.6	Látky stimulující centrální nervový systém .....	20
3.6.1	Účinky psychostimulancií .....	20
3.7	Neurotoxická .....	21
3.8	Metamfetamin.....	21
3.8.1	Způsoby aplikace .....	22
3.8.2	Stav odvykání.....	23
3.8.3	Epidemiologie METH ve světě.....	23

3.8.4	Epidemiologie v ČR.....	24
3.8.5	Mechanismus neurotoxicity METH.....	25
3.8.6	Neuropsychiatrické prezentace .....	25
3.8.7	METH a vliv na neurotransmitery .....	26
3.8.8	Excitocita metamfetaminu .....	26
3.8.9	Noradrenalin a metamfetamin.....	28
3.8.10	Serotonin a metamfetamin.....	28
3.8.11	Oxidativní stres .....	29
3.8.12	Neurální mitochondrie a jejich úloha v neurotoxicitě.....	30
3.8.13	Vliv metamfetaminu na neurogenezi u laboratorního zvířete.....	32
4	Metodika .....	33
4.1	Chov .....	33
4.2	Expozice metamfetaminu .....	33
4.3	Morrisovo vodní bludiště .....	34
4.4	Odběr mozkových tkání .....	35
4.5	Homogenizace .....	35
4.6	Ultrazvuková homogenizace .....	36
4.7	Centrifugace .....	36
4.8	Spektrofotometrické stanovení koncentrace.....	37
4.9	Western blot.....	37
4.9.1	Potřeby a chemikálie .....	37
4.9.2	Pracovní postup .....	38
4.10	ELISA .....	40
4.10.1	ELISA glutamátu.....	41

5	Výsledky .....	44
5.1	Morrisovo vodní bludiště .....	44
5.1.1	Učení .....	44
5.1.2	Test paměti .....	47
5.2	Vyhodnocení Western blotu .....	49
5.3	Vyhodnocení ELISA metody .....	50
5.3.1	ELISA glutamátu .....	51
5.3.2	ELISA dopaminu .....	52
5.3.3	ELISA GABA .....	53
5.3.4	ELISA noradrenalinu .....	54
5.3.5	ELISA serotoninu .....	55
6	Diskuze .....	56
7	Závěr .....	60
8	Seznam použitých zkratk .....	61
9	Seznam použité literatury .....	62
10	Seznam použitých obrázků .....	69
11	Seznam použitých tabulek .....	71
12	Seznam Příloh .....	72

# 1 ÚVOD

Psychostimulancia jsou látky, které patří mezi běžně zneužívané drogy po celém světě. Mezi tyto látky spadá právě metamfetamin neboli pervitin, který je jednou z nejhojněji zneužívaných drog v České republice a také ve světě. Ačkoliv jsou statistiky užívání metamfetaminu mezi dospělými a mladistvými alarmující, v současné době stále neznáme všechny mechanismy jeho toxicity pro lidský organismus.

Neurogeneze hipokampu je také stále předmětem intenzivního zkoumání. Před více než 100 lety bylo objeveno, že vývoj hipokampu pokračuje prakticky během celého života, a nejen v prenatálním a časném postnatálním období, jak se domnívalo. Dnes je již obecně tento fakt přijímán i přes to, že je stále předmětem určitých kontroverzí.

Práci na téma účinky metamfetaminu na vývoj hipokampu jsem si vybrala z důvodu, že v tomto odvětví pracuji a zajímá mě. Považuji za důležité zjistit co nejvíce o toxicitě látek, které jsou zneužívané po celém světě, mezi které se metamfetamin řadí. Tato práce navazuje na předchozí výzkumy na ústavu Fyziologie 3.LF UK. Studie na téma prenatální a časně postnatální expozice metamfetaminu u potkanů probíhají pod záštitou přednostky ústavu prof. MUDr. Romany Šlamberové PhD.

## 2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zmapování ukazatelů vývoje hipokampu v rané fázi adolescence a jejich změny po podání metamfetaminu pokusnému zvířeti.

V teoretické části bylo cílem popsat neurotoxicitu metamfetaminu a jeho negativní účinky na centrální nervový systém. Dílčím cílem této části práce bylo též podat ucelený přehled o mechanismu účinku metamfetaminu a přehled neurotransmiterů, které mohou být drogou ovlivněny.

V praktické části je cílem zvládnutí analytických metod ELISA a Western blot včetně precizního vyhodnocení výsledků. Dalším cílem bylo zvládnutí behaviorálního testu pro pozorování učení a paměti pokusného zvířete včetně hodnocení jeho průchodu Morrisovým vodním bludištěm.

## **3 SOUČASNÝ STAV**

### **3.1 Centrální nervový systém**

Centrální nervový systém (CNS) řídí funkci všech orgánů, koordinuje jejich činnosti, tak aby celý organismus byl v rovnováze. Jedná se tedy o nejdříve postavený systém v celém organismu. CNS má řadu specifických vlastností. Vyniká zejména rychlostí reakce na velké množství informací o vnitřním i vnějším stavu organismu. Je velmi variabilní, což je důležité vzhledem ke klíčové vlastnosti nervového systému a tou je plasticita. Plasticitou označujeme dvě skupiny funkčních změn jako je adaptace, ta se výrazně podílí na utváření jedinečnosti CNS, a plasticita samotná, jejíž projevy vyvolávají reverzibilitu a rychlost nástupu změn (Kittnar 2020).

Pro neurony, které jsou základní funkční a stavební jednotkou CNS, musí být zabezpečeno vhodné prostředí tak, aby byl zajištěn dostatečný přísun energie pro tvorbu vzruchů. Tyto podmínky jsou zajišťovány extraneuronálními elementy, které jsou uvnitř a okolo CNS. Mezi tyto elementy řadíme mozkomíšni mok, extracelulární prostředí a neuroglie, které se podílejí na obraných funkcích CNS (Kittnar 2020).

### **3.2 Hematoencefalická bariéra**

Hematoencefalickou bariéru tvoří především síť mozkových kapilár, které se od ostatních kapilár v organismu značně liší. Bariéra zajišťuje transport látek z mozku do krve a naopak. Vysokomolekulární látky se přes membránu prakticky nedostávají. Jejich přenos je uskutečňován pomocí transportních vezikulů a prostřednictvím pinocitózy (Kittnar 2020).

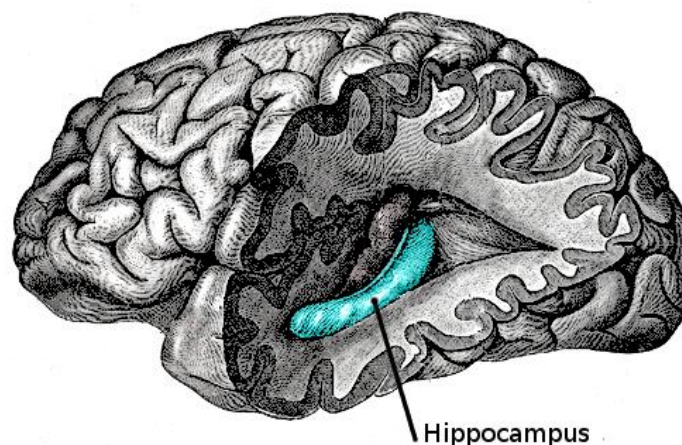
### **3.3 Limbický systém**

Limbický systém je skupina mozkových center, které jsou navzájem propojené krátkými i dlouhými nervovými drahami. Tento systém zahrnuje některé části mozkové kůry a podkorové oblasti. Mezi funkce limbického systému patří řízení emocí a pocitů a

ovládání somatovegetativních systémů. Limbický systém hraje také zásadní roli v mechanismech paměti a učení. Systém se skládá z několika částí, které mají specifické funkce (Kittnar 2020; Rokyta 2015).

### 3.3.1 Hipokampus

Hipokampus je centrum limbického systému, které má na starosti individuální chování jedince a má důležitou roli v ukládání informací do dlouhodobé paměti. Jedná se o strukturu, která je uložena ve spánkovém laloku (Obrázek 1). Je také jednou z oblastí, kde se i u dospělého jedince vytvářejí neurony, které jsou nezbytné pro určité typy paměti. Nově vzniklé neurony v dospělém hipokampu dozrávají z prekurzorových buněk, které se nacházejí v subgranulární části hipokampu. Tyto neurony exprimují doublecortin, který se využívá jako marker pro sledování neurogenese adolescentů (Kittnar 2020; Hood et al. 2018).



*Obrázek 1 Na ilustraci je zeleně označena hipokampální struktura, která je umístěna ve spánkovém laloku (převzato z Gray 1973).*

### 3.3.2 Amygdala

Jedná se o seskupení neuronálních skupin, které jsou součástí mozkové kůry. Podílí se na vzniku emočních expresí na podněty (bušení srdce při strachu). Dále pomáhá rozlišovat příjemné a nepříjemné signály a podílí se na úsudku (Kittnar 2020; Rokyta 2015).

### 3.3.3 Hypotalamus

Řídí základní tělesné funkce a hraje roli v dráhách odměny a trestu. Je zodpovědný za pocity ukojení nebo odporu na základě motivačního úsilí. Díky těmto pocitům představuje jakousi hnací sílu, která vede k projevům chování jedince (Kittnar 2020; Rokyta 2015).

### 3.4 Neurogeneze v dospívání

Dospívání definujeme jako období mezi dětskou a dospělou fází. Existuje spousta definic a dohadů, kdy vlastně tato fáze začíná a v průběhu věku se její hranice neustále posouvá. Obecně můžeme toto období rozdělit do několika po sobě jdoucích fází. Raná adolescence ve věku přibližně 10-12 let, střední adolescence v období 13-16 let a mladí dospělí ve věku do 23 let (Crone a Dahl 2012; Sisk a Zehr 2005).

Dospívání podle jiné definice začíná v období puberty, která je doprovázena kaskádou změn. Tyto změny začínají u každého jedince jinak a v současné společnosti se tyto známky objevují u jedinců již od devátého roku života. Během období puberty se zvětšuje objem korové bílé hmoty, zejména v oblasti čelních lalocích. Zvyšuje se také schopnost logického uvažování a změnami prochází i osobnost jedince. Období puberty je navíc doprovázeno neurobehaviorálními změnami, jako je touha objevovat nové věci, občas i v negativním smyslu (Crone a Dahl 2012; Kittnar 2020; Sisk a Zehr 2005).

Dříve se předpokládalo, že tvorba nových funkčních neuronů v CNS probíhá pouze během prenatalního a časného postnatálního vývoje. Toto dogma bylo ale zpochybněno, když u laboratorních potkanů byla prokázána neurogeneze i v pozdější době postnatálního vývoje. Během dalších desítek let se nahromadily důkazy, které prokazují existenci tohoto procesu v lidském hipokampu v průběhu celého života. Ačkoliv stále přetrvávají jisté kontroverze, v dnešní době je již tento fakt všeobecně přijímán. Behaviorální studie na zvířatech potvrdila, že nově vytvořené neurony hipokampu v postnatálním vývoji, hrají důležitou roli v prostorovém učení, ukládání paměti nebo v regulaci nálad. Tyto neurony se mohou lišit v reakci na vliv a faktory prostředí, podle toho, v jakém období vývoje byly vytvořeny (Allen 1918; Zhao et al. 2008).



V období dospívání je úroveň neurogeneze mnohem vyšší než u dospělých jedinců, což bylo doloženo díky studii na laboratorních hlodavcích. Při přechodu z adolescence do dospělosti dochází k dramatickému snížení neurogeneze. Mechanismy, za jakým účelem k této skutečnosti dochází zatím nejsou zcela známy a na zkoumání tohoto procesu vývoje hipokampu se dosud zaměřilo pouze omezený počet studií (Kozareva et al. 2019).

### **3.5 Neurotransmitery**

Neurotransmitery (NEU) jsou chemické látky, které jsou schopné zprostředkovávat signalizaci mezi buňkami. Nejčastěji se jedná o vzruch mezi neurony, nebo mezi neuronem a svalovou buňkou. Z chemického hlediska se nejedná o jednotnou skupinu látek. Můžeme je rozdělit do několika skupin: nízkomolekulární, peptidy a ostatní (puriny nebo plyny). Do skupiny nízkomolekulárních neurotransmiterů řadíme acetylcholin, aminokyseliny (glutamát, asparát, glycin) a deriváty aminokyselin (kyselina gama-aminomáselná, noradrenalin, dopamin a serotonin). Neurotransmitery hrají klíčovou roli ve vývoji nervové soustavy. Ukazuje se, že exprese určitého typu neurotransmiteru je závislá na tkáňovém faktoru, ale může být ovlivněna i faktory dalšími. Faktor prostředí je důležitý pro diferenciaci neuronových buněk a může mít rozhodující úlohu v kritických fázích vývoje (Čechová a Šlamberová 2021; Kittnar 2020).

#### **3.5.1 Glutamát**

Glutamát (GLU) je aminokyselina, která je hlavní excitační NEU v CNS. Nachází se ve všech buňkách a má klíčovou roli v mnoha metabolických drahách. Je zároveň prekurzorem kyseliny gama-aminomáselné (GABA), která je hlavním inhibičním neurotransmiterem v centrální nervové soustavě. Má úlohu v tzv. synaptické plasticitě, což je proces zániku starých synapsí a zároveň i vzniku synapsí nových. Ve vysokých koncentracích je GLU velmi silným neurotoxinem. Díky této skutečnosti je potřeba omezit jeho aktivitu, která by zabráňovala buněčné smrti (Čechová a Šlamberová 2021; Kittnar 2020).

GLU je produkován přeměnou z glutaminu pomocí enzymu glutamináza. Po uvolnění glutamátu je jeho menší množství vycytáno zpátky do presynaptického neuronu. Glutamátové transportéry pak zprostředkovávají přenos většího množství glutamátu, který vycytávají astrocyty. Jedná se o transportéry excitačních aminokyselin EAAT1 a EAAT2. V astrocytu je pak takto přenesený GLU přeměněn na glutamin pomocí glutaminsyntetázy. Glutamin je poté přenesen zpět do neuronu, kde dojde k recyklaci glutamátu a jeho vyloučení do synaptické štěrbiny. Tento složitý proces je pravděpodobně mechanismus, který brání přílišné excitaci neuronů, která by vznikla, pokud by astrocyt GLU vypouštěl volně do extracelulární tekutiny (Čechová a Šlamberová 2021; Kittnar 2020).

Na základě podjednotek rozeznáváme některé typy glutamátových ionotropních receptorů. Jedná se např. o AMPA receptory, NMDA receptory nebo KA receptory. Při otevření AMPA receptorů dochází k toku sodíku a v některých případech i vápníku. Po aktivaci se rychle uzavře (Čechová a Šlamberová 2021; Mark 2004).

NMDA receptory zvyšují permeabilitu membrány pro vápník, sodík a draslík. Ionový kanál se otevře pouze v případě, je-li membrána dostatečně depolarizována. K otevření vyžadují jak vazbu s GLU, tak i vazbu s glycinem. Jejich zajímavou vlastností je to, že jsou obecně propustné pro vápník. Na základě toho vznikla hypotéza, že by měly NMDA receptory určitou roli při učení a paměti (Čechová a Šlamberová 2021; Mark 2004).

### **3.5.2 GABA**

GABA neboli kyselina gamma-aminomáselná je hlavní inhibiční neurotransmitter v CNS. V mozku obratlovců je přítomná ve velkých koncentracích ve většině inhibičních neuronech. Vzniká dekarboxylací glutamátu pomocí reakce katalyzovanou enzymem glutamátdekarboxylázou. Hlavní prekurzor je glutamin, který se transportuje z astrocytů. Glutamin je glutaminázou přeměněn na GLU, ze kterého dekarboxylací vzniká GABA (Kittnar 2020).

GABA je vycytávána z větší části astrocyty, kde se dále přeměňuje na glutamin. Prvním krokem přeměny je transaminace, kdy je aminoskupina nahrazena aldehydovou

skupinou vlivem GABA transferázy, čímž vzniká sukcinátsamialdehyd. Vzniklý produkt je dále oxidován na sukcinát. Ze sukcinátu může pak dále vzniknout alfa-KG, který se přeměňuje na GLU. Za spotřeby ATP se glutamát přeměňuje na glutamin, čímž je cyklus uzavřen. Rozlišujeme tři typy podjednotek GABAergních receptorů: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>C</sub> (Kittnar 2020).

GABA<sub>A</sub> je ionotropní receptor, který zvyšuje permeabilitu membrány buněk pro Cl<sup>-</sup> ionty. Aktivita receptoru vede k influxu těchto iontů do cytoplazmy, čímž snižují membránový potenciál. Jedná se o hlavní inhibiční neurotransmiterový receptor, který zprostředkovává rychlé inhibiční účinky. Receptor je součástí tzv. supramolekulárního receptorového komplexu. Tento komplex kromě GABA<sub>A</sub> zahrnuje receptory pro benzodiazepiny, barbituáty a jiné látky. Všechny receptory z tohoto komplexu působí inhibičně na postsynaptický neuron (Čechová a Šlamberová 2021; Chebib a Johnson 2000; Kittnar 2020).

GABA<sub>B</sub> je metabotropní receptor, který je spřažen s G-proteinem se sedmi transmembránovými doménami. Vazba GABA na GABA<sub>B</sub> vede k aktivaci K<sup>+</sup> kanálů a hyperpolarizaci membrány. Aktivita kanálů pro Ca<sup>2+</sup> je naopak snížena. Tyto změny vedou ke snížení množství neurotransmiterů. GABA<sub>C</sub> je o ionotropní receptor, který se na rozdíl od GABA<sub>A</sub> receptoru otevírají pomaleji, ale zůstávají aktivované mnohem déle. To způsobuje, že jeho inhibiční účinek je 10x silnější (Čechová a Šlamberová 2021; Chebib a Johnson 2000; Kittnar 2020).

### 3.5.3 Katecholaminy jako neurotransmitery

Mezi katecholaminy řadíme noradrenalin (NA), adrenalin a dopamin (DA). Funkcí se liší, ale všichni jsou významnými neurotransmitery v centrální nervové soustavě. Název katecholaminů je odvozen od jejich chemické struktury, ve svých molekulách obsahují pyrokatechol, což je benzen se dvěma hydroxylovými skupinami, na němž je navázán postranní řetězec s aminokyselinou (Kittnar 2020; Linhart 2014).

V černé hmotě (*substantia nigra*), hypotalamu a středním mozku nacházíme především dopaminové receptory (DAR), jejichž aktivace má budivé účinky na psychiku.

Ve ventrální tegmentální oblasti jsou DAR důležitou součástí odměny a jejich aktivace může mít za následek vzniku závislosti (Čechová a Šlamberová 2021).

### 3.5.3.1 Noradrenalin

Jedná se o neurotransmitter, který v CNS působí jako regulátor aktivity. NA je odvozen od adrenalinu odtržením methyly na dusíku. Při zvýšení aktivity noradrenergických drah dochází ke snížení nebo zvýšení excitability míst v závislosti na receptorech. Tyto dráhy mohou také regulovat funkci glutamátu i funkci GABA (Čechová a Šlamberová 2021; Linhart 2014).

Noradrenalin působí na určité typy receptorů na membránách cílové buňky. V CNS existují čtyři podtypy těchto receptorů. Jedná se o podtypy  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  a  $\beta_2$  (Čechová a Šlamberová 2021).

### 3.5.3.2 Dopamin

Dopamin je velmi důležitým neurotransmiterem pro řízení motorických funkcí a také při iniciaci různých vzorců chování. DArgické neurony nacházíme v oblasti černé hmoty mozkové (*substantia nigra*) a ve ventrální tegmentální oblasti. Promítají se také do bazálních ganglií, limbických oblastí, hipokampu a do kůry. V prefrontální oblasti nacházíme vysoký obsah dopaminu. Tato část je důležitá při řešení problémů, uvažování nebo při plánování (Čechová a Šlamberová 2021; Boyson a Adams 1997).

V současné době známe pět receptorů pro DA, které jsou spřaženy s G-proteinem, který ovlivňuje aktivitu adenylátcyklázy. Tyto receptory dělíme do dvou skupin, podle toho, jestli adenylcyklázu stimulují (receptory  $D_1$ ,  $D_5$ ), nebo jí inhibují (receptory  $D_2$ ,  $D_3$ ,  $D_4$ ). V limbickém systému převládají receptory  $D_3$  a  $D_4$ . Pro většinu dopaminových receptorů jsou adrenalin s noradrenalinem parciálními antagonisty (Čechová a Šlamberová 2021; Kittnar 2020).

### 3.5.4 Serotonin

Serotonin (SER) vzniká z tryptofanu hydroxylací a dekarboxylací. Prvním krokem je hydroxylace tryptofanu, za účasti enzymu tryptofanhydroxylázy, v páté poloze, čímž vzniká 5-hydroxytryptamin (5-HT). Druhým krokem je dekarboxylace, kde poté jako výsledný produkt vzniká serotonin (Čechová a Šlamberová 2021; Frankle et al. 2005).

Serotoninergní systém zastává v CNS řadu důležitých úloh. Má velmi podobnou roli jako noradrenergní systém a reguluje celou řadu funkcí a aktivitu dalších systémů. Léky zvyšující aktivitu serotoninergního systému SSRI (specifické inhibitory zpětného vychytávání serotoninu) se využívají například při léčbě deprese. Serotoninergní neurony rozdělujeme funkčně na dva systémy. Jedná se o systém ascendentní a descendentní (Kittnar 2020).

Ascendentní serotoninergní systém zastává řadu důležitých funkcí, mezi které řadíme regulaci spánkového rytmu, zpracování informací v sensorických částech mozku nebo řízení emocí. Dále má vliv na hypothalamické funkce. Ascendentní serotoninergní systém vysílá signály do kůry, limbického systému (např. do hipokampu), thalamu a hypothalamu (Kittnar 2020).

Descendentní serotoninergní systém se podílí zejména na regulaci vnímání bolesti. Jeho zvýšená aktivita má posilující efekt při užití anestetik nebo opiátů. Neurony descendentního serotoninergního systému vysílají signály zejména do oblasti mozkového kmene, mozečku a míchy (Kittnar 2020).

Serotoninergní receptory mají funkci inhibiční i excitační. Doposud je známo 7 typů těchto receptorů, které označujeme zkratkou 5-HT<sub>1-7</sub>R. Většina z těchto receptorů patří do skupiny G-proteinových receptorů (Kittnar 2020).

### **3.6 Látky stimulující centrální nervový systém**

Psychostimulancia jsou látky, které podstatně ovlivňují kognitivní fungování a chování. Tyto látky vedou k povzbuzení organismu až k hyperaktivitě, zvyšují jak duševní, tak tělesný výkon. V různé míře tento budivý efekt bývá doprovázen neklidem, unáhleným jednáním, tachykardií, dysrytmií, hypertenzí, třesem nebo křečemi. Zornice jsou u osob užívající psychostimulancia často myadrické (Balíková 2017; Kalina 2015).

Mezi látky stimulující centrální nervovou soustavu řadíme budivé aminy, konkrétně pak deriváty amfetaminu – zejména metamfetamin (METH), kokain, ale například i kofein. Do této skupiny řadíme i některá léčiva jako například metylfenidát, dexfenfluramin. Psychostimulancia mohou mít vážné neurotoxické účinky (Balíková 2017; Kalina 2015).

Mechanismem účinku látek stimulující centrální nervový systém je zvýšení hladiny dopaminu, noradrenalinu, popřípadě i serotoninu buď v synapsích v CNS nebo i ve vazbě na receptory v CNS, což má za následek zvýšený přenos signálu na postsynaptický neuron (Kalina 2015; Linhart 2014).

#### **3.6.1 Účinky psychostimulancií**

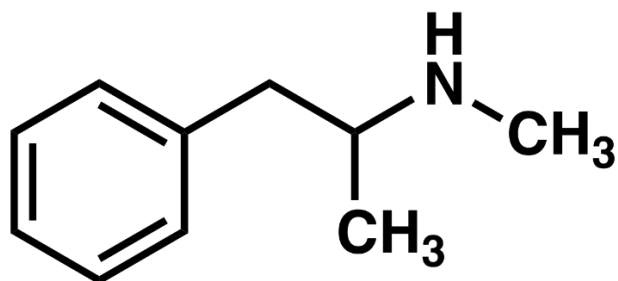
Mezi pozitivní účinky psychostimulancií patří aktivace osy sympatiku, díky nimž se osoba užívající tyto látky cítí méně unaveně, má pocit síly a energie. Tyto látky zároveň snižují potřebu příjmu potravy. Mezi nežádoucí účinky se řadí pocit sucha v ústech při intoxikaci, nadměrné pocení. Dochází k přetížení krevního oběhu, což zvyšuje riziko selhání srdce. Po odeznění budivého účinku následuje nadměrné vyčerpání organismu a nastává stav celkového útlumu. V některých případech může nastat úzkost či paranoia. Při dlouhodobém užívání se vyskytují případy halucinací a bludů (Kalina 2015).

### 3.7 Neurotoxická

Neurotoxická je obecně definována jako poškození neuronů. V širším smyslu může znamenat negativní účinek na strukturu nebo funkci neuronů, které má za následek jejich poškození. Toxické látky, které svými účinky působí na nervový systém se nazývají neurotoxické. Jelikož nervový systém je rozmístěn po celém organismu a řídí jej, látky, které jsou neurotoxické, mohou sekundárně poškozovat další orgány a systémy celého těla (Moszczynska et al. 2017; Linhart 2014).

### 3.8 Metamfetamin

Metamfetamin, jinak také pervitin nebo lidově perník, se řadí mezi nejpotentnější syntetická psychostimulancia (Obrázek 2). Jedná se o derivát amfetaminu, který je zneužíván po celém světě. Poprvé byl syntetizován z efedrinu v roce 1893 japonským chemikem Nagayoshi Nagaiem, poté v roce 1919 další japonský chemik Akira Agata zjednodušil proces výroby a dal tím vzniknout první krystalické formě metamfetaminu. Jeho užívání je v současné době protizákonné, ale stále je využíván jako léčivo při ADHD, nebo těžké obezitě. I přes znalosti potenciálních toxických účinků této drogy bylo vynaloženo jen velmi malé úsilí na vývoj prostředků, které by byly schopné čelit těmto účinkům na lidský organismus. Studie založené na zmapování neurotoxicity metamfetaminu by měli poskytnout poznatky k lepšímu přístupu k těmto problémům (Jayanthi et al. 2021; Linhart 2014; Yang et al. 2018).



Obrázek 2 chemická struktura metamfetaminu.

### **3.8.1 Způsoby aplikace**

Způsoby aplikace metamfetaminu jsou rozsáhlé. V případě derivátů amfetaminu se užívá nejčastěji intravenózní aplikace, v některých případech i intranazální aplikace. Dále se pak využívá zahřátí na alobalu a následná inhalace, nebo požití per os (Kalina 2015).

#### **3.8.1.1 Intravenózní podání**

Při tomto typu aplikace se látka dostává přímo do krevního oběhu, díky kterému se dále distribuuje do cílových orgánů, konkrétně do CNS. Jedná se o nejrychlejší cestu aplikace, při níž odpadá absorpce. Intravenózní aplikace vede rychle ke vzniku drogové závislosti. Jedné se také o rizikové podání, jelikož představuje zvýšené riziko infekcí při sdílení jehel. Mezi nejzávažnější infekce, které je potřeba zmínit, patří HIV nebo hepatitida B a C (Linhart 2014).

#### **3.8.1.2 Podání per os**

Při požití látka vstupuje do trávicího traktu. Z ústní dutiny se dostává nejprve do jícnu, žaludku, tenkého a tlustého střeva. Během této cesty se látka postupně vstřebává přes stěnu trávicího traktu a absorbuje se do krve. Nevstřebaná látka se vyloučí z organismu skrz gastrointestinální systém. Ke vstřebávání může docházet již v dutině ústní, další probíhá v žaludku a ve střevech. Nejdůležitější pro absorpci je tenké střevo, konkrétně k největší absorpci dochází v jejunu a ileu, kde se látky vstřebávají skrz silně prokrvenou střevní stěnu, která má velký povrch (Linhart 2014).

Velký vliv na rychlost vstřebávání má zejména rozpustnost látky, jelikož molekuly látky se vstřebávají na střevní stěně z roztoku. Při podání per os můžeme do organismu vpravit velké množství látky za krátký čas, ale absorpce z gastrointestinálního traktu je pomalá a často neúplná (Linhart 2014).



### 3.8.1.3 Inhalace

Při aplikaci inhalací látka vstupuje nosem a poté prochází hrtanem, průdušnicí až do plic. Látky, které se dostanou do plic, jsou poté v plicních sklípcích absorbovány do krve poměrně snadno díky prokrvenosti a velkému povrchu plicních sklípků.

Je patrný rozdíl mezi inhalací a podání per os. To spočívá především ve skutečnosti, že inhalované látky jsou v plynné fázi, kdežto látky podávané per os jsou zpravidla v kapalinném nebo pevném skupenství. Pro uvedení příkladu 18 ml vody představuje až 22 litrů páry, což je více než tisícinásobný objem. Při inhalaci jsme omezeni kapacitou plic, při podání per os můžeme požit větší množství látky za kratší čas (Linhart 2014).

### 3.8.2 Stav odvykání

Při abstinenci se obvykle dostaví únava, neklid a akutní potřeba k užití drogy. Somatické příznaky abstinence obvykle souvisí s vyčerpáním organismu a v poměrně krátké době z větší části vymizí. Tento stav není zdravý ani život ohrožující. Abstinenci můžeme rozdělit do několika po sobě jdoucích fází:

1. Mezi akutní stavy řadíme únavu, kdy se může dostavit až několikadenní spánek, a velká chuť k jídlu. Jsou přítomné některé psychické stavy jako deprese, úzkost.
2. Po akutní fázi nastává silná touha po droze. Deprese přetrvává a může se dostavit podrážděnost. Tento stav trvá v rozmezí dnů až několika týdnů.
3. Organismus postupně přestává prahnout po droze, deprese a úzkosti postupně mizí. Řádově může tato fáze trvat až několik měsíc (Kalina 2015).

### 3.8.3 Epidemiologie METH ve světě

Studie z roku 2019 ukázaly, že přibližně 27 miliónů jedinců někdy požili látku ze skupiny ATs (amphetamine-type stimulants), což je přibližně 0,5 % dospělé populace. Metamfetamin je tedy široce užívanou drogou po celém světě, a to bez ohledu na věk.

Největší frekvence užívání byla zmapována ve věku 15-64 let, což je velké věkové rozpětí (Jayanthi et al. 2021).

Přibližně 95 % pervitinu je ilegálně syntetizováno, z nichž nejvíce produkce probíhá v USA, Thajsku a Mexiku, kde je asi 80 % celosvětové ilegální výroby. Pro syntézu METH se používají látky efedrin, pseudoefedrin nebo fenyl-2-propanol (P-2-P) a prekurzor pseudoefedrinu (Jayanthi et al. 2021).

Podle výzkumu z roku 2016, prováděným *National Survey on drug use and health* se přibližně 1,6 milionů jedinců, s průměrným věkem 23,3 let, v USA přiznalo k užívání metamfetaminu (Jayanthi et al. 2021).

#### **3.8.4 Epidemiologie v ČR**

V roce 2021 proběhla studie o závislostech v České republice prováděná *Národním monitorovacím střediskem pro drogy a závislosti* (NMS), která je součástí protidrogové politiky úřadu vlády České republiky (Chomynová et al. 2022).

Podle tohoto průzkumu přibližně 4-6 % dotázaných mělo zkušenosti s užíváním pervitinu. Odhadem pak 33 tisíc jedinců v ČR užívá pervitin pravidelně, což je za posledních deset let čtvrtinový nárůst. Při průzkumu závislosti mezi dětmi a dospívajícími se 1 % šestnáctiletých studentů přiznalo, že v posledních 12 měsících užilo alespoň jednou metamfetamin (Chomynová et al. 2022).

Podle odhadu spotřeby nelegálních drog se v roce 2016 užilo přibližně 6,5 tuny pervitinu, což podle dlouhodobých studií představuje nárůst oproti předchozích let. Česká republika je velkým producentem pervitinu, ale zaznamenává se i dovoz metamfetaminu a pseudoefedrinu, ze kterého se metamfetamin syntetizuje. V souvislosti s protiepidemickými opatřeními proti viru COVID-19 byl v rocích 2020-2021 zaznamenán nárůst online nabídky nelegálních drog (Chomynová et al. 2022).

### **3.8.5 Mechanismus neurotoxicity METH**

Metamfetamin jakožto derivát amfetaminu má podobné účinky jako amfetamin nebo jiná psychostimulancia, např. kokain. Na rozdíl od kokainu, účinek METH přetrvává poměrně dlouhou dobu. Jelikož se jedná o psychostimulant, navazuje pocit bdělosti se zvýšenou mentální aktivitou, čehož mnohdy zneužívají studenti. METH získal pravděpodobně popularitu díky těmto účincům, navíc má METH také účinky anorektika, což může představovat další důvod jeho oblíbenosti (Balíková 2017; Linhart 2014).

Pokud je opakovaně a nekontrolovatelně užíván může mít vážné zdravotní následky. Mezi ně se řadí neurologické a psychiatrické komplikace, kardiovaskulární problémy nebo také renální selhání. Mezi neurologické a psychické efekty řadíme mozkovou mrtvici, schizofrenii nebo psychózu. Neurotoxické účinky zahrnují poškození dopaminergních a serotoninergních drah, apoptózu buněk a aktivaci astroglíí a mikroglíí, která vedou k protizánětlivé reakci (Jayanthi et al. 2021; Paulus a Stewart 2020; Yang et al. 2018).

I přes to, že se jedná o vysoce zneužívanou drogu po celém světě, tak stále neexistuje mnoho studií, které by mapovaly toxicitu metamfetaminu u dospělých jedinců. Ještě hůře je na tom výzkum vlivu prenatální intoxikace, nebo intoxikace v období vývoje (Panenka et al. 2013; Ševčíková et al.).

### **3.8.6 Neuropsychiatrické prezentace**

Užívání metamfetaminu má dlouhodobý a negativní dopad na CNS. Nadměrné užívání metamfetaminu může vyvolat změny v mozku, které mohou být příčinou jeho neurotoxicity. Dlouhodobé užívání METH může vést ke vzniku závislosti (Mouton et al. 2016; Yang et al. 2018; Jayanthi et al. 2021).

Na rozvoji závislosti se podílejí různé rizikové faktory uváděny jako například duševní poruchy, genetické predispozice nebo stresový faktor. U dospívajících je jednou z nejčastějších duševních poruch deprese. Závislost na METH je způsobena dlouhodobou neurální adaptací, která způsobuje, že systémy odměny a motivace jsou přecitlivělé na podnět s drogou spojený. Opakované užívání pak kromě závislosti zahrnuje behaviorální

abnormality nebo psychické epizody. Uživatelé mohou trpět stavy úzkosti, paranoiou, psychózou a depresí (Mouton et al. 2016; Yang et al. 2018; Jayanthi et al. 2021).

Vztah mezi závislostí a depresí můžeme popsat jako obousměrný vztah. U jedinců, kteří užívají metamfetamin je zvýšené riziko ke vzniku depresí, zatímco jedincům, kteří depresemi již trpí, hrozí vyšší riziko k vývoji závislosti. Podobně jako deprese může stres a jeho dopad na člověka vést ke vzniku závislosti (Mouton et al. 2016; Yang et al. 2018; Jayanthi et al. 2021).

Výzkumy prokázaly, že uživatelé metamfetaminu mohou trpět neuropsychologickými poruchami, jako je například neschopnosti rozhodování, či logického uvažování, snížená může být i rychlost zpracování informací (Alves et al. 2020).

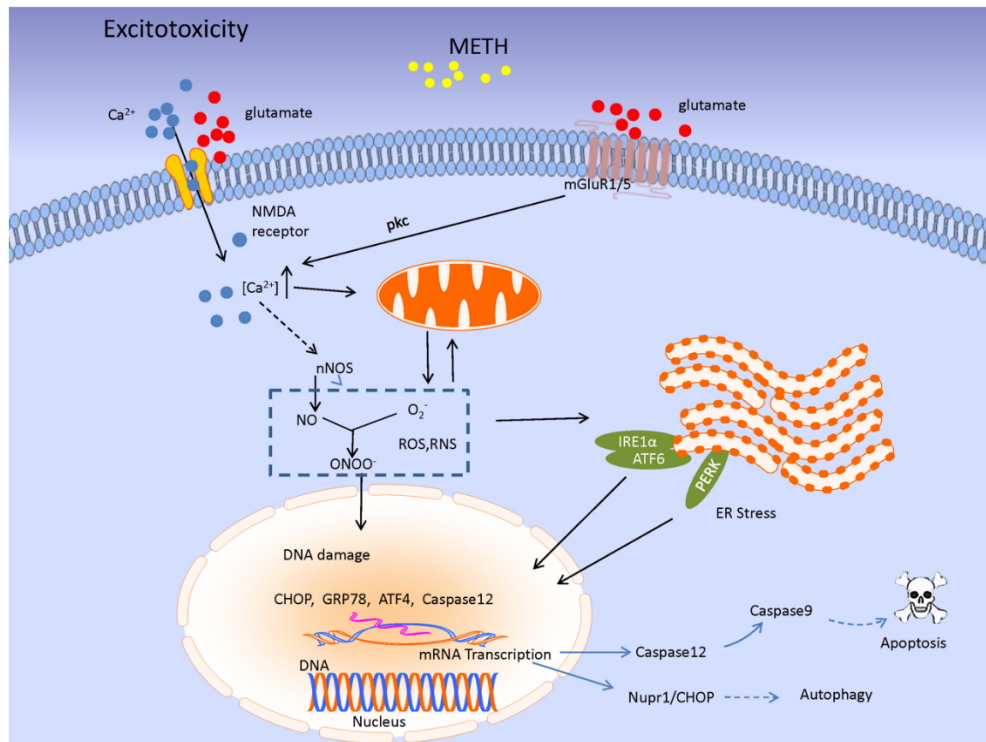
### **3.8.7 METH a vliv na neurotransmitery**

S novými výzkumy přibývá čím dál více důkazů o vlivu metamfetaminu na neurotransmitery, ale jeho přesný mechanismus ještě stále není zcela rozluštěn. Chronické užívání vede ke kognitivní dysfunkci, především kvůli výrazným změnám v distribuci a ukládání neurotransmiterů, jako je dopamin a noradrenalin, což je způsobeno díky podobné chemické struktuře s metamfetaminem. METH má také vliv na neurotransmisi serotoninu a dalších neurotransmiterů, např. neurotransmisi glutamátu či kyseliny gama-aminomáselné (Čechová a Šlamberová 2021; Jayanthi et al. 2021; Yang et al. 2018).

### **3.8.8 Excitocita metamfetaminu**

Metamfetamin působí pomocí bazálních ganglií na limbický systém, který řídí cestu odměny. Striatum obsahuje GABA<sub>A</sub>ergní neurony, které exprimují NMDA receptory. Studie ukázaly, že akutní podání metamfetaminu snižuje GABA<sub>B</sub> transmissi a zvyšuje uvolňování dopaminu. Expozice metamfetaminem má tedy za následek aktivaci GABA neuronů vlivem zvýšenému uvolňování dopaminu ve striatu a prefrontální kůře. Vyšší koncentrace dopaminu je spojena s pocitem euforie. Zvýšená aktivita GABA na neuronech disinhibuje thalamokortikální dráhu glutaminu, což vede ke zvýšení hladiny

glutamátu v kůře a striatu. Hromadění glutamátu nadměrně aktivuje N-metyl-D-asparátové receptory (NMDAR), což vede k nárůstu influxu  $\text{Ca}^{2+}$ , čímž se zvyšuje intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Nadbytek  $\text{Ca}^{2+}$  v buňce spouští kaskádu reakcí, jež mají za následek produkci oxidu dusnatého, který způsobuje stres endoplazmatického retikula (ER). Stres ER vede k apoptóze neuronů, která zahrnuje aktivaci různých mechanismů, jež mají dále za následek aktivaci receptorů buněčné smrti. Bylo prokázáno, že vysoké dávky metamfetaminu indukují ve striatu laboratorního zvířete expresi několika genů pro stres endoplazmatického retikula. Obrázek zobrazuje mechanismy excitotoxicity metamfetaminu (Obrázek 3) (Čechová a Šlamberová 2021; Jayanthi et al. 2021; Yang et al. 2018).



Obrázek 3 ukazuje schéma excitační toxicity METH. Zvýšená hladina GLU vede ke stimulaci N-metyl-D-asparátových receptorů (NMDAR), což vede k nárůstu influxu  $\text{Ca}^{2+}$ . Zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v buňkách vede k produkci NO, který působí jako stresor endoplazmatického retikula (ER). ER pak spouští kaskádu apoptických drah. (obrázek převzat z Yang et al. 2018)

*Legenda k obrázku 3: excitotoxicity – excitotoxicita, glutamate – glutamát, ER stress – stres endoplazmatického retikula, apoptosis – apoptóza, autophagy – autofágie, nucleus – jádro, DNA damage – poškození DNA, mRNA transcription – přepis RNA*

### **3.8.9 Noradrenalin a metamfetamin**

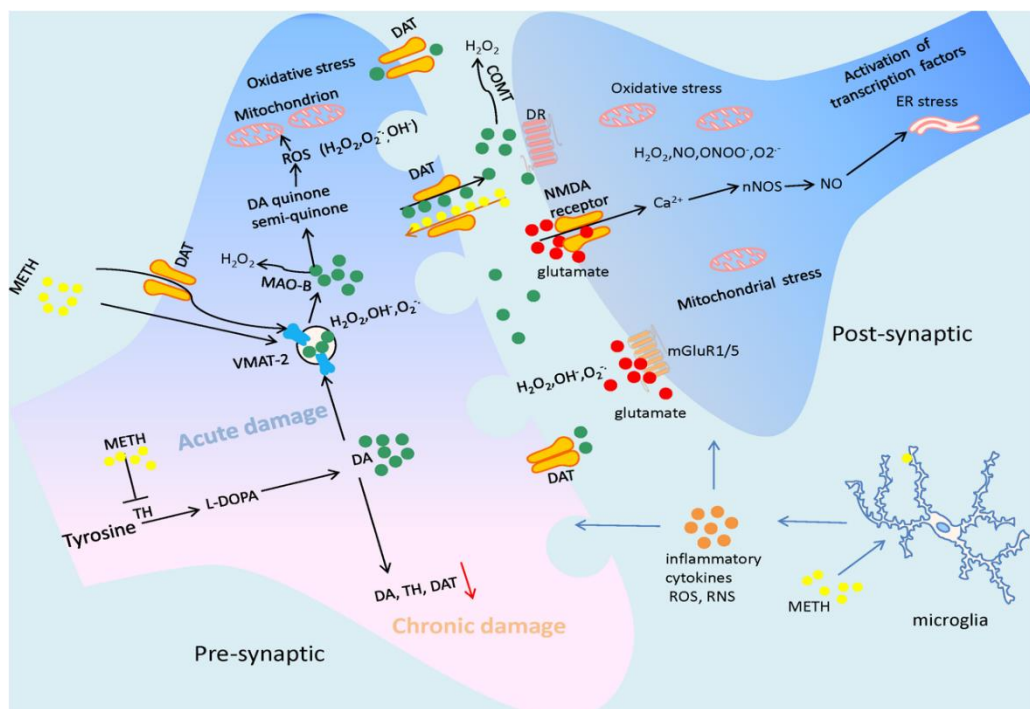
NA je nezbytný pro normální vývoj mozku a noradrenergní neurony jsou přítomny již v raném stádiu vývoje. Noradrenergní systém koriguje vývoj Cajal-Retziových buněk, které jsou prvními neurony v mozkové kůře. Blokování neurotransmise antagonistou zabráňuje proliferaci gliových buněk nebo astroglióze. Během raného vývoje existuje kritické období, kdy má METH vliv na formování drah odpovědných za rozvinutí mateřského chování. Podílí se také na ovlivnění čichového učení novorozence, které má význam pro rozpoznání matky. NAT, které jsou exprimovány noradrenergními neurony, mohou vychytávat molekuly METH. NA je jedním z hlavních neurotransmiterů, které silně modulují chování a cestu odměny vyvolané užíváním metamfetaminu a tím dává základ ke vzniku závislosti (Čechová a Šlamberová 2021; Jayanthi et al. 2021; Yang et al. 2018).

### **3.8.10 Serotonin a metamfetamin**

Při užívání METH dochází ke snížení koncentrace serotoninu v přední oblasti mozku, striatu a hipokampu. Snížená nebo zvýšená koncentrace serotoninu představuje velký problém, jelikož může vlivem této změny koncentrace docházet k nadměrné nebo nedostatečné aktivaci specifických receptorů 5-HT<sub>1</sub>. Tato skutečnost se během vývoje může podílet na vzniku úzkostných poruch nebo na rozvoji drogové závislosti. Mechanismus snížení koncentrace serotoninu vlivem metamfetaminu nebyl dodnes vysvětlen a může být způsoben řadou faktorů, které způsobují neurochemické změny v serotoninergním systému, což vede k poruchám chování a nálad. Příčinou těchto změn může být pravděpodobně i vznik kyslíkových radikálů (ROS) při podání metamfetaminu (Čechová a Šlamberová 2021).

### 3.8.11 Oxidativní stres

Oxidativní stres hraje v neurotoxických účincích metamfetaminu zásadní roli. METH vyvolává značnou produkci reaktivních forem kyslíku, což vede ke zvýšené oxidaci dopaminu. METH prochází hematoencefalickou bariérou do mozku díky své rozpustnosti v lipidech a vstupuje pomocí dopaminových transportérů (DAT) do dopaminergních drah, kvůli své podobnosti s dopaminem. Jelikož metamfetamin zvyšuje koncentraci dopaminu a podporuje jeho další uvolňování, v synaptických šterbinách vlivem jeho hromadění dochází k jeho autooxidaci a vzniku ROS, zejména peroxidu vodíku  $H_2O_2$ , hydroxylové skupiny  $OH^-$  a superoxidového aniontu  $O_2^-$ . ROS podporují řadu oxidačně stresových reakcí jako je peroxidace lipidů a aktivace proteáz, což může vést k buněčné smrti (apoptóze). Kyslíkové radikály mají velkou úlohu v neurotoxicitě, což bylo prokázáno mnoha studiemi na zvířecích modelech. U uživatelů metamfetaminu byla nalezena zvýšená hladina oxidačně-stresových markerů a snížená aktivita enzymů fosfolipidového metabolismu. Obrázek zobrazuje mechanismy neurotoxicity metamfetaminu (Obrázek 4) (Cadet a Branock 1998.; Yang et al. 2018).



Obrázek 4 Molekulární mechanismus neurotoxicity METH. Významnými faktory toxicity jsou oxidační stresové reakce, oxidace DA a velká produkce GLU. Oxidací DA vznikají reaktivní kyslíkové formy (ROS), které vedou k mitochondriální dysfunkci. To má

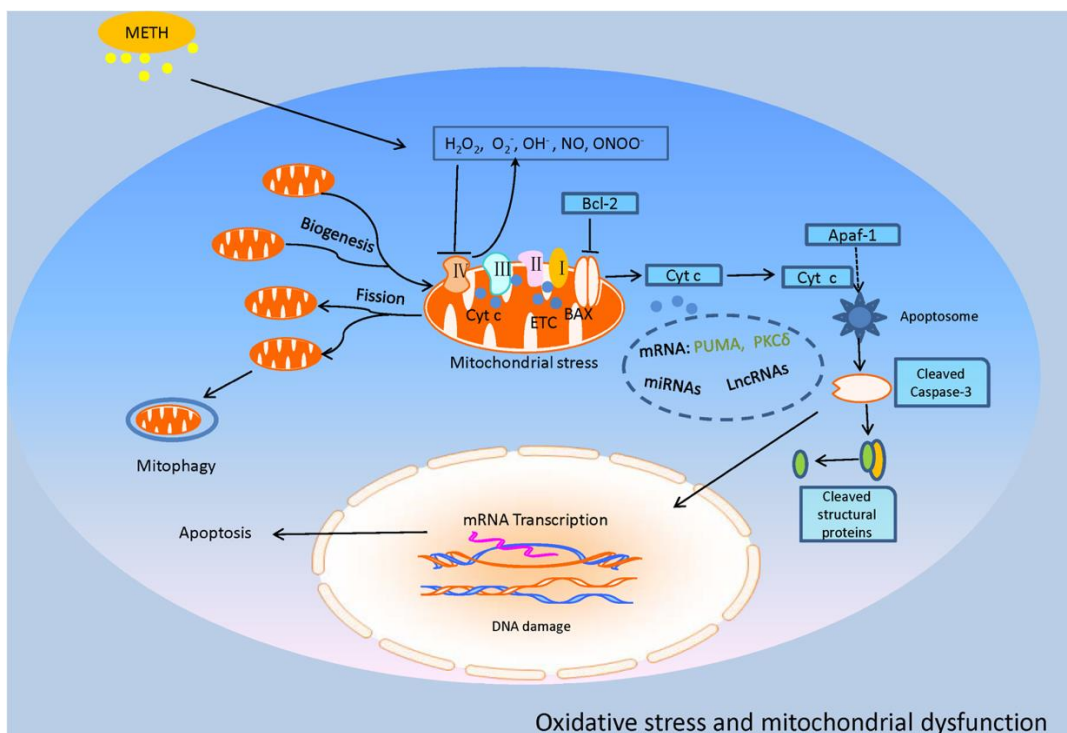
za následek poškození neurálních buněk. Vlivem neurozánětu zprostředkovaný mikroglie pak dochází k apoptóze buněk. Při chronickém užívání METH dochází často k poklesu DA, DAT a jiných markerů. (obrázek převzat z Yang et al. 2018)

*Legenda k obrázku 4: pre-syntaptic – presyntaptický, chronic damage – chronické poškození, microglia – mikroglie, acute damage – akutní poškození, tyrosine – tyrozin, glutamate – glutamát, post-synaptic – postsynaptický, mitochondrial stress – mitochondriální stres, mitochondrie – mitochondrie, oxidative stress – oxidativní stres, ER stress – stres endoplazmatického retikula, inflammatory cytokines – zápalové cytokiny, activation of transcription factors – aktivace transkripčních faktorů*

### **3.8.12 Neurální mitochondrie a jejich úloha v neurotoxicitě**

Mitochondrie jsou buněčné organely, které zprostředkovávají buněčné dýchání. Po expozici METH jsou právě mitochondrie místem největší produkce ROS. ROS pravděpodobně inhibují některé klíčové enzymy, jako jsou komplexy I, II, a IV v metabolismu mitochondrií, což způsobuje dysfunkci mitochondrií (Obrázek 5). Defekty v mitochondriálním metabolismu, zejména inhibice Krebsova cyklu, se pak podílí na apoptóze nervových buněk. Změny v mitochondriálních enzýmech jsou ale stále předmětem diskuse (Dawson a Dawson 2017; Klongpanichapak et al. 2006).





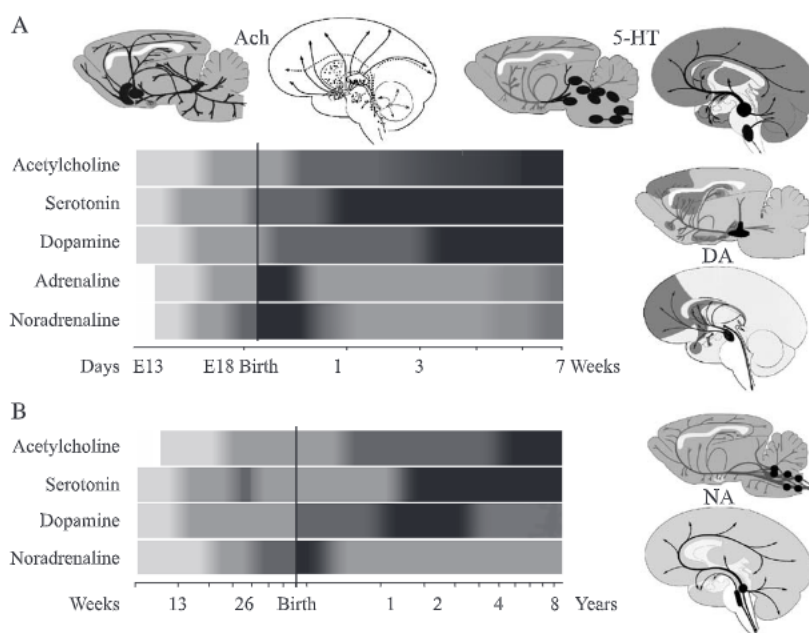
Obrázek 5 Znárodňuje schéma oxidativního stresu a mitochondriální dysfunkce, které se podílejí na neurotoxicitě METH. Při expozici METH vzniká velké množství ROS.

Nadměrné množství těchto forem inhibuje klíčové enzymy mitochondriálního metabolismu, což vede k dysfunkci těchto organel. Dysfunkce pak vyvolá apoptickou kaskádu. (obrázek převzat z Yang et al. 2018)

Legenda k obrázku 5: biogenesis – biogeneze, fission – štěpení, mitophagy – mitofágie, apoptosis – apoptóza, mRNA transcription – přepis mRNA, DNA damage – poškození DNA, mitochondrial stress – mitochondriální stres, apoptosome – apoptozom, cleaved caspase 3 – štípaná kaspáza 3, cleaved structural proteins – štípané strukturální proteiny

### 3.8.13 Vliv metamfetaminu na neurogenezi u laboratorního zvířete

Vývoj hipokampu u laboratorního potkana má podobný mechanismus jako u člověka (Obrázek 6), proto jsou ideálními modely pro pozorování neurotoxicity metamfetaminu. Mechanismy neurotoxicity metamfetaminu u laboratorních hlodavců je taktéž obdobný. Velké dávky metamfetaminu negativně ovlivňují dopaminergní a serotoninergní systém. Neurotoxicita je rovněž doprovázena astrocytární a mikroglální aktivací. Dlouhodobé podávání METH u hlodavců v rámci studie se projevilo trvalým snížením DA a DAT v různých mozkových oblastech (Čechová a Šlamberová 2021; Jayanthi et al. 2021).



Obrázek 6 Vývoj NEU v potkaním a lidském mozku. Schéma A ukazuje prenatální a postnatální vývoj neurotransmiterů v mozku potkana. Schéma B ukazuje prenatální a postnatální vývoj u člověka. Pruhy představují buňky a projekci NEU systému. (obrázek převzat z Herlenius et al. 2001)

Legenda k obrázku 6: acetylcholine – acetylcholin, dopamine – dopamin, adrenaline – adrenalin, noradrenaline – noradrenalin, days – dny, weeks – týdny, birth – narození

## 4 METODIKA

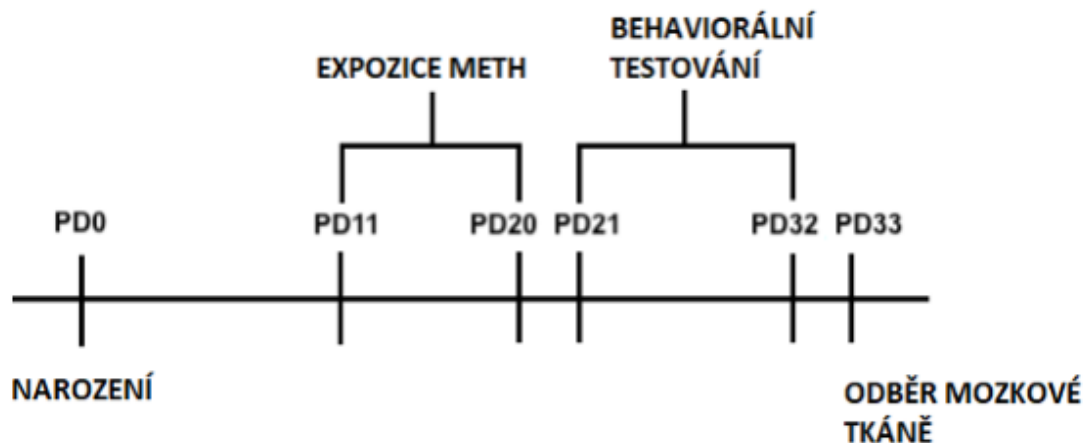
### 4.1 Chov

Pro naše účely jsme použily samce potkanů outbredního kmene Wistar od firmy Velaz (Praha, Česká republika, chovatel Charles River Laboratories International, Inc.), kteří byli umístěni v místnosti s řízenou teplotou (21–22 °C), relativní vlhkostí (60 %) a standardním 12hodinovým cyklem světlo/tma. Samci byli v den narození rozděleni do tří skupin po deseti:

- M skupina (podávání metamfetaminu 2,5 mg/ml);
- S skupina (vyvolání stresové situace píchnutím);
- C skupina (kontrolní).

### 4.2 Expozice metamfetaminu

Podávání metamfetaminu samcům M skupiny probíhalo ve fázi rané adolescence, což je u potkanů 11 až 20 postnatální den (PD). Pokusným jedincům byla podávána subkutánně dávka METH v koncentraci 2,5 mg/ml v množství 1 ml/kg každý den. Na obrázku je znázorněna časová osa experimentu (Obrázek 7).



Obrázek 7 Časová osa znázorňující průběh experimentu (vlastní zdroj).

### 4.3 Morrisovo vodní bludiště

Toto vodní bludiště bylo vyvinuto Richardem Morrisem jako metoda pro hodnocení prostorové paměti a učení. Morris popsal základní postupy v roce 1984, které pak dále doplnil o postupy a podrobnosti (Morris 1984; Vorhees a Williams 2006).

Třicátý první den postnatálního vývoje se začalo s behaviorálním testem paměti v Morrisovu vodním bludišti (MWM). Vodní bludiště sestávalo z vodní nádrže a ostrůvku, který měli potkani nalézt.

Test probíhal za přednastaveného osvětlení, tak aby se dodržovala intenzita osvětlení a aby se eliminovaly světelné paprsky, které by mohly narušovat průběh záznamu. Teplota vody v nádrži byla udržována kolem 20 °C.

Test sestával ze tří částí – learning (prvních 6 dní), probe test (8. den) a memory (12. den). Do bludiště byly potkani dáváni ve dvou cyklech ze světových stran – sever, jih, východ západ. První cyklus byl z každé světové strany jednou a druhý cyklus byl pouze jednou ze severu a jednou z jihu. To znamená, že každé zvíře bylo do bazénu vloženo celkem 6x. Zvíře mělo pokaždé 60 vteřin na to, aby našlo ostrůvek. Pokud ostrůvek do té doby nenalezlo, bylo potřeba ho na něj navést. Ostrůvek byl umístěn v severovýchodním kvadrantu.

Probe test probíhal tak, že se ostrůvek vybral z bazénu. Každé testované zvíře se vložilo do vodní nádrže pouze jednou ze severu. Během 60 sekund se sledoval pohyb zvířete, a zda se nejvíce času pohybovalo v kvadrantu, ve kterém se právě dříve ostrůvek nacházel. Na postup testu byl použit protokol, který je používán na Ústavu fyziologie 3.LF UK s modifikacemi pro danou věkovou skupinu mláďat laboratorních potkanů. Konzultace ohledně změn protokolu probíhaly na základě doporučení MUDr. Mikulecké z Fyziologického ústavu Akademie věd. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programu Ethovision XT 14. Výsledky byly statisticky zpracovány.

#### **4.4 Odběr mozkových tkání**

Po skončení behaviorálního testu s MWM se provedl odběr mozkové tkáně. Potkani byli uspáni pomocí 8 % roztoku chloral-hydrátu. Následně byla provedena perfuze heparizovaným fyziologickým roztokem 0,01 M pro odstranění krve z mozkové tkáně. Perfuze byly prováděny za asistence doc. MVDr. Šimona Vaculína. Po vyjmutí mozkové tkáně byl odebrán hipokampus, který se zvážil a zmrazil na teplotu -80 °C do dalšího zpracování.

#### **4.5 Homogenizace**

Ke vzorkům byl přidán vypočítaný objem roztoku T-PER (Tabulka 1 hmotnosti potkanů, hipokampu a objem přidaného pufru). Samotná homogenizace probíhala pomocí mechanického homogenizátoru. Do zkumavky se vložil malý tyčový mixér. Zkumavkou se pohybovalo nahoru a dolů, tak aby došlo k dostatečnému rozdrčení tkáně. Aby nedošlo k přehřátí vzorku, byla zkumavka umístěna do kádinky s ledem.

## 4.6 Ultrazvuková homogenizace

Po dostatečné homogenizaci byly vzorky umístěny do přístroje Qsonica Sonicator Q700 (Obrázek 8). Sonikátor pracuje na principu nízkofrekvenčních ultrazvukových vln, které prochází vzorkem a pomáhají narušit buněčnou membránu a uvolnit buněčný obsah. Sonikace v přístroji trvala 10 minut (Suslick 1990).



*Obrázek 8 přístroj Qsonica Sonicator Q700 (vlastní zdroj).*

## 4.7 Centrifugace

Dalším krokem po ultrazvukové homogenizaci vzorků byla centrifugace. Centrifugace je proces, který slouží k rozdělení částic za pomoci odstředivé síly. Centrifugace vzorků probíhala při 14 000 G po dobu deseti minut. Následně se přepipetoval supernatant, který byl použit k analyzování a peleta k dalšímu zpracování potřeba nebyla (Schneiderka 2004).

## **4.8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace**

U homogenizovaných vzorcích byla pomocí spektrofotometrie stanovena koncentrace bílkovin v tkáni hipokampu. Tato koncentrace byla potřebná pro další zpracování vzorků metodu Western blot. Koncentrace proteinů byla stanovena při vlnové délce 450 nm pomocí přístroje 800 TS Absorbance reader od firmy BioTek.

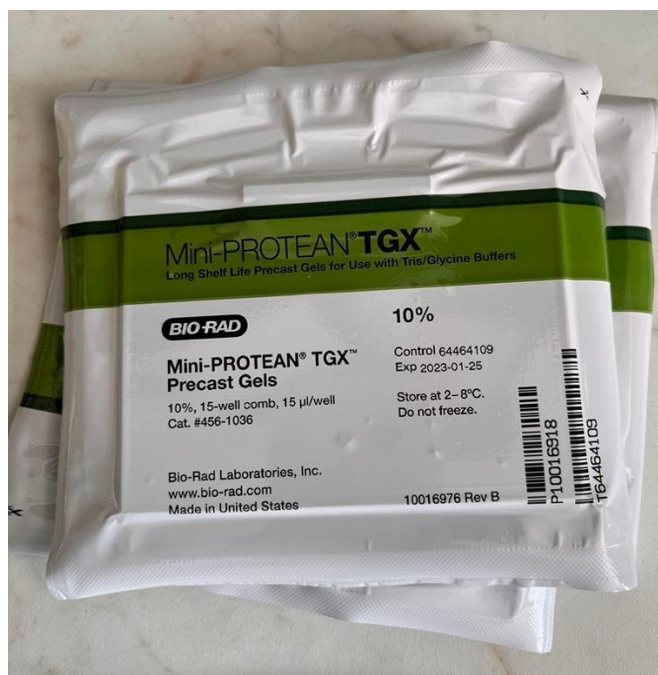
## **4.9 Western blot**

Western blot je metoda používaná pro detekci specifických proteinů např. v homogenizovaném vzorku tkáně. Prvním krokem je polyakrylamidová elektroforéza, což je metoda pro rozdělení proteinů podle povrchového náboje a velikosti molekul. Elektroforéza probíhá v elektrickém poli. Poté jsou proteiny z gelu přebíjeny na membránu, kde jsou detekovány pomocí specifických protilátek (Bartůňková a Paulík 2011).

Tuto metodu jsme prováděly pro detekci aktinu a doublecortinu v homogenizovaných vzorcích hipokampu potkanů. Pro analýzu byla využita blotovací a elektroforetická sada firmy Bio rad. Na obrázku jsou zobrazeny použité gely firmy Bio rad (Obrázek 9).

### **4.9.1 Potřeby a chemikálie**

Elektroforetická aparatura, zdroj stejnosměrného napětí, třepačka, automatická pipety, homogenizované vzorky, membrány, přístroj pro měření chemiluminiscence Chemidoc Bio rad, T-PER, running buffer, marker, SLBT, DTT, polyakrylamidové gely, blot blocking buffer, primární protilátka, sekundární protilátka (kozí protilátka proti králičímu IgG) TBS-T, chemiluminiscenční směsi.



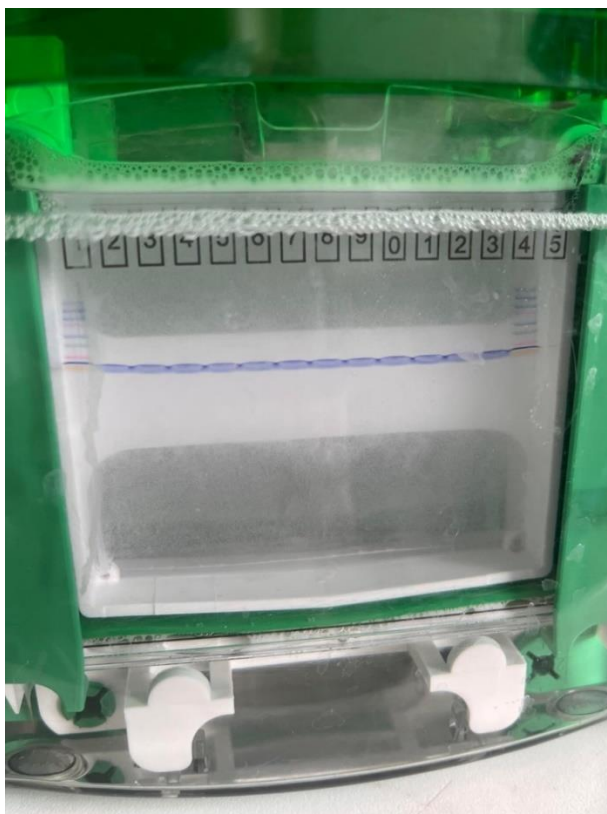
Obrázek 9 Gely pro elektroforézu od firmy Bio rad (vlastní zdroj)

#### 4.9.2 Pracovní postup

Homogenizované vzorky s naměřenou koncentrací bílkovin byly analyzovány metodou Western blot. Pomocí koncentrací jsme vypočítaly množství potřebných reagentů (Tabulka 2). SLB a DTT jsme podle tabulky napipetovaly do mikrozkušavky. Mix jsme poté přepipetovaly do mikrozkušavek, do kterých jsme následně přidaly určené množství T-PER a homogenizovaných vzorků. Takto připravené vzorky jsme na 10 minut přenesly do suchého bloku na teplotu 95 °C a poté umístily na led.

Sestavily jsme si elektroforetickou aparaturu, do jejíž komory a mezi gely jsme přidaly komorový pufr (running buffer). Do jamek gelu jsme pipetovaly 7 µl markeru do pozic 1 a 14 a 10 µl vzorků v dubletu do zbylých pozic (Tabulka 3). Elektroforéza probíhala po dobu přibližně 30 minut za napětí o velikosti 200 V (Obrázek 10). Po skončení elektroforézy jsme z plastových nosičů opatrně vyjmuly gel. Poté jsme si připravily potřebné pomůcky pro blotování.





*Obrázek 10 Probíhající elektroforéza na pozici 1 a 14 můžeme vidět rozdělení bílkovin markeru a na ostatních pozicích jsou vzorky v dupletu (vlastní zdroj).*

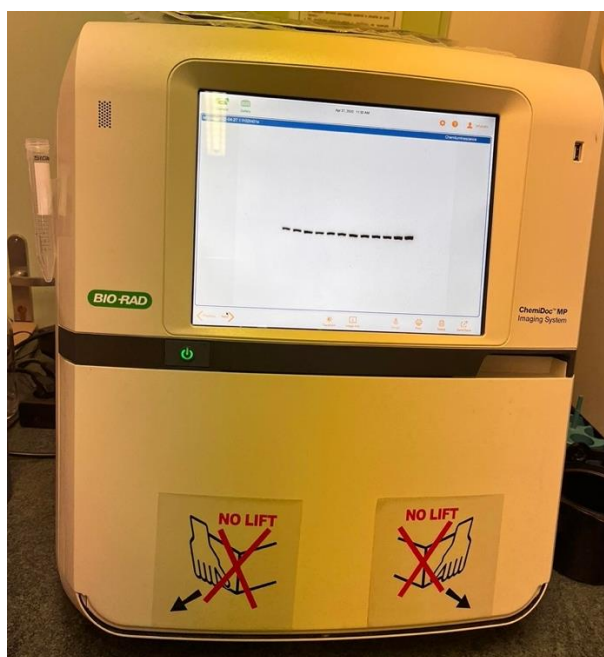
Membrány na western blot jsme na jednu minutu ponořily do methanolu. Poté jsme methanol vylili a nahradily ho transfer puffrem. Na membrány jsme položily gel z elektroforézy. Na gel a membránu jsme z obou stran přiložily filtrační papír a polštářky namočené v transfer puffru. Sestrojily jsme aparaturu pro blotování (Obrázek 11).



*Obrázek 11 aparatura pro metodu Western blot (vlastní zdroj).*

Blotování probíhalo v chladu při napětí 100 V po dobu 90 minut. Po blotování jsme promývaly membrány TBS-T roztokem na třepačce. Poté následovalo promývání na 5 min pomocí blokovacího pufru (blot blocking buffer), následně znovu 3x 10 minut v TBS-T. Membránu jsme ustříhly na dvě části, horní část obsahovala aktin s velikostí 100 kDA a spodní část s doublecortinem s velikostí 45 kDA. Každá z částí se inkubovala pomocí jiné primární protilátky, jedna pro aktin a druhá pro doublecortin. Inkubace probíhala přes noc na třepačce v chladu.

Druhý den po inkubaci se membrána znovu promývala pomocí TBS-T. Připravily jsme si sekundární protilátku, která byla ředěna v poměru 1:10000. Inkubace se sekundární protilátkou trvala 60 min a následně jsme znovu promývaly pomocí TBS-T. Na membrány jsme napipetovaly chemiluminiscenční směsi od firmy Azure Biosystems v poměru 1:1. Chemiluminiscenci jsme hodnotily pomocí přístroje ChemiDoc od firmy Bio Rad (Obrázek 12).



Obrázek 12 Přístroj ChemiDoc od firmy Bio rad (vlastní zdroj).

#### 4.10 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je metoda založená na specifické interakci antigen-protilátka, známý také jako imunokomplex. Na jeden z partnerů komplexu je kovalentně navázán enzym, který katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na barevný produkt (Alberts 2002).

Touto metodou jsme stanovovaly neurotransmitery v hipokampu. Konkrétně se jednalo o glutamát, GABA, noradrenalin, dopamin a serotonin. Pro stanovení koncentrace jednotlivých neurotransmiterů v homogenizovaného vzorku byly použity ELISA kity od firmy Labor Diagnostika Nord. Jelikož sady pro jednotlivé neurotransmitery byly od stejné firmy, pracovní postup byl totožný s výjimkou některých použitých reagensů. Pro demonstraci je popsána ELISA glutamátu.

#### **4.10.1 ELISA glutamátu**

Jedná se o kompetitivní ELISA metodu mikrodestičkového formátu. Antigen se naváže na pevnou fázi mikrotitrační destičky. Koncentrace derivatizovaného analytu ve vzorcích a analyt vázaný na pevnou fázi soutěží o vazbu na protilátku. Volný antigen a volné komplexy antigen-protilátka se odstraní promytím. Protilátka navázaná na antigen na pevné fázi se detekuje konjugátem proti králičímu IgG a peroxidáze za použití TMB jako substrátu.

##### **4.10.1.1 Materiály a chemikálie**

Automatické pipety, třepačka, lepící fólie, mikrotitrační destička 96 jamková, extrakční deska 48 jamková, promývací pufr, enzymový konjugát (kozí imunoglobuliny proti králičím konjugované s peroxidázou), chromogenní substrát, stop roztok (0,25 M kyselina sírová), glutamátové mikrotitrační destičky, testovací pufr (pufr s alkalickým pH), vyrovnávací činidlo, standardy, kontrolní vzorek, D-reagent, TRIS pufr, diluent (pufr s octanem sodným), roztok hydroxidu sodného NaOH.

##### **4.10.1.2 Extrakce**

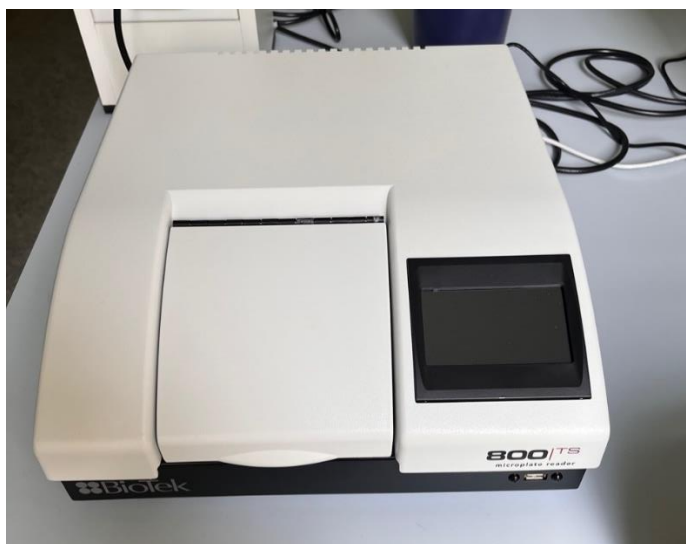
Do příslušných jamek extrakční destičky jsme napipetovaly 100 µl standardů, kontrol a vzorků. Poté jsme do všech jamek přidaly 100 µl diluentu a destičku přikryly lepící fólií. Destičku jsme daly na třepačku na přibližně 600 otáček za minutu a nechaly tak po dobu 10 minut.

#### 4.10.1.3 Derivatizace

Do jamek reakční destičky jsme přepipetovaly 25  $\mu\text{l}$  extrahovaných standardů, kontrol a vzorků. Do všech jamek jsme pipetovaly 10  $\mu\text{l}$  NaOH, 50  $\mu\text{l}$  vyrovnávacího činidla a 10  $\mu\text{l}$  D-reagentu. Destičku jsme přikryly lepící fólií a daly na třepačku na přibližně 600 otáček za minutu po dobu 2 h. Poté jsme do všech jamek napipetovaly 75  $\mu\text{l}$  Q-pufru. Znovu jsme destičku daly na třepačku na 10 min.

#### 4.10.1.4 ELISA

Do příslušných jamek glutamátových mikrotitračních destiček jsme napipetovaly 25  $\mu\text{l}$  připravených standardů, kontrol a vzorků. Do všech jamek jsme přidaly 50  $\mu\text{l}$  glutamátového antiséra a krátce přenesly na třepačku. Přikryly jsme destičky lepící fólií a inkubovaly přes noc v teplotě 2-8 °C. Po inkubaci jsme odstranily fólii a obsah z jamek. Destičku jsme 3x promyly 300  $\mu\text{l}$  promývacího pufru a destičku osušily. Do všech jamek jsme pipetovaly 100  $\mu\text{l}$  konjugátu enzymu. Destička byla inkubována 30 min na třepačce na přibližně 600 otáček. Po inkubaci jsme odstranily obsah pomocí automatické pipety a 3x jsme destičku promyly 300  $\mu\text{l}$  promývacího pufru. Destičku jsme osušily a napipetovaly do každé jamky 100  $\mu\text{l}$  substrátu. Inkubovaly jsme 30 min na třepačce. Po inkubaci jsme do každé jamky přidaly 100  $\mu\text{l}$  stop roztoku a chvíli přenesly na třepačku pro promíchání. Koncentrace byla měřena pomocí známé koncentrace standardů, metodou kalibrační křivky, spektrofotometricky na přístroji 800 TS Absorbance reader od firmy BioTek (Obrázek 12) při vlnové délce 450 nm.



*Obrázek 13 Příklad přístroje 800 TS Absorbance reader od firmy BioTek (vlastní zdroj).*

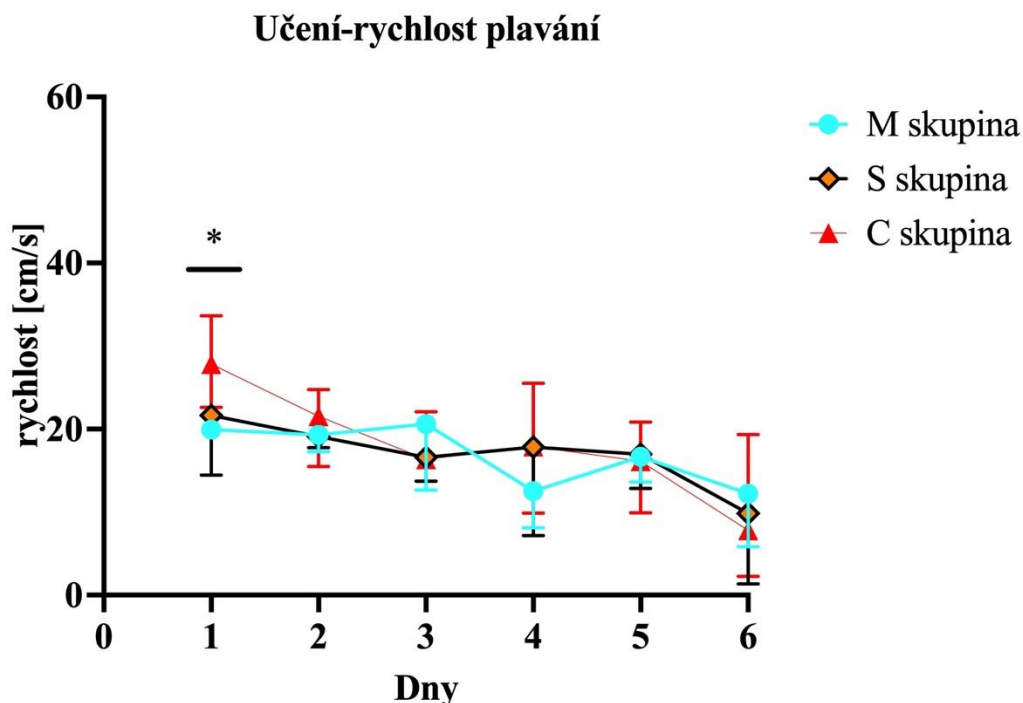
## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Morrisovo vodní bludiště

Analýza parametrů MWM byla hodnocena pomocí programu Ethovision XT 14. Analyzovány byly tři parametry – rychlost nalezení ostrůvku, dráha, kterou zvíře během jedné sekce urazilo a rychlost plavání zvířete. Tyto parametry byly vyhodnoceny zvlášť během učení a testu paměti. Pro každý parametr byl vytvořen zvlášť graf, kde jsou zaznamenány hodnoty všech testovaných skupin. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí Graph Pad Prism 9. Pro statistické porovnání mezi skupinami byl použit post hoc test Tukey.

#### 5.1.1 Učení

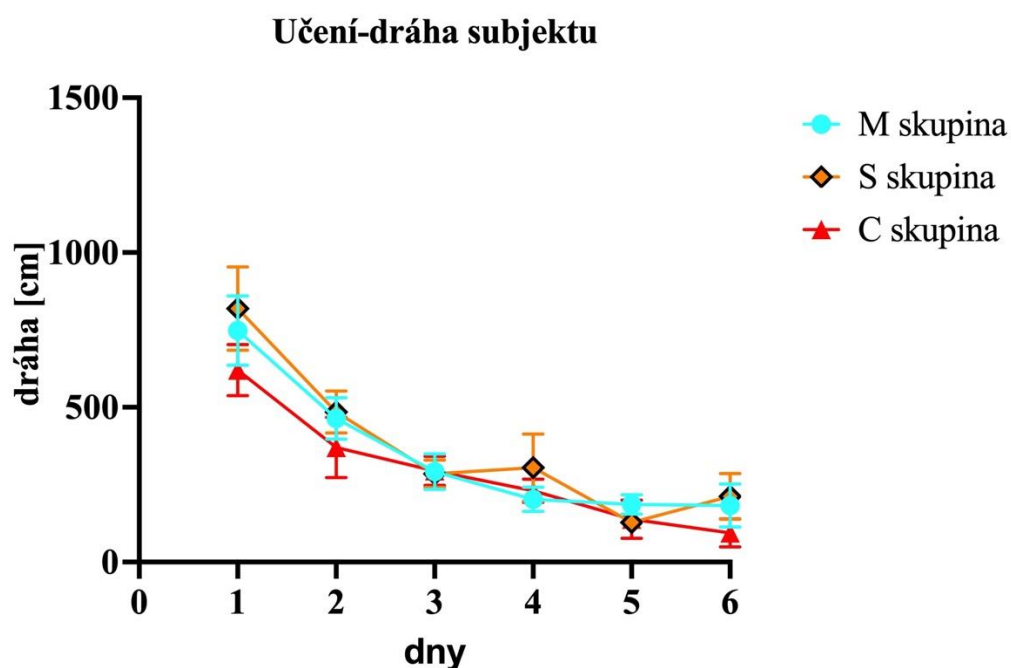
Všechny parametry fáze učení byly statisticky zpracovány testem Two-way ANOVA. V programu Graph Pad Prism 9 byly z naměřených hodnot vytvořeny grafy pro každý parametr.



Obrázek 14 Graf Učení-rychlost plavání (vlastní zdroj).

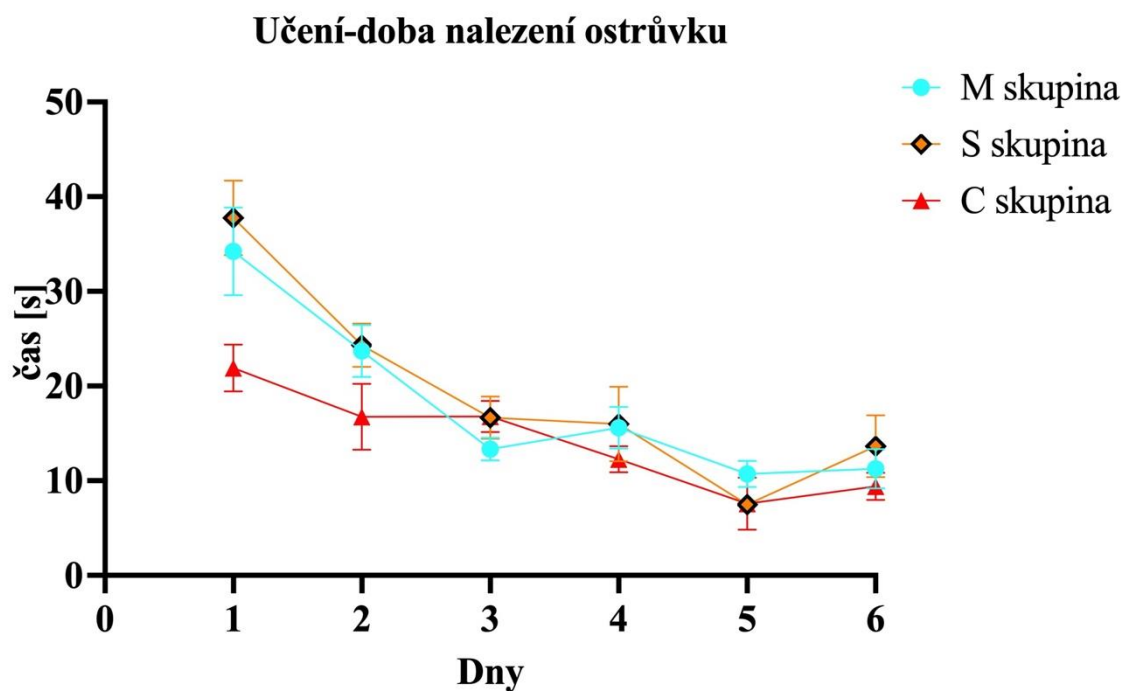
V parametru rychlost plavání jsme zaznamenaly jediné statisticky signifikantní rozdíly v prvním dni. Podle grafu Učení-rychlost plavání (obrázek 14) si můžeme všimnout, že v tento den měla nejmenší rychlost skupina M, tedy skupina, které byl podáván metamfetamin. Skupina C neboli kontrolní skupina, měla v tento den rychlost největší.

Rozdíly v dalších dnech už nejsou statisticky významné, všem skupinám se dařilo podobně. Celková signifikace parametru treatment v rychlosti plavání testem ANOVA vyšla [ $F(2, 15) = 0.2681$ ;  $p=0.7685$ ].



Obrázek 15 Graf Učení-dráha subjektu (vlastní zdroj).

Uražená dráha během učení byla u všech skupin obdobná a nebyly zaznamenány žádné markantní rozdíly. Z grafu Učení-dráha subjektů (Obrázek 15) si můžeme všimnout, že dráhy se postupně během učení snižovaly. Celková signifikace parametru treatment v dráze subjektu testem ANOVA vyšla [ $F(2, 15) = 0.7448$ ;  $p=0.4916$ ].



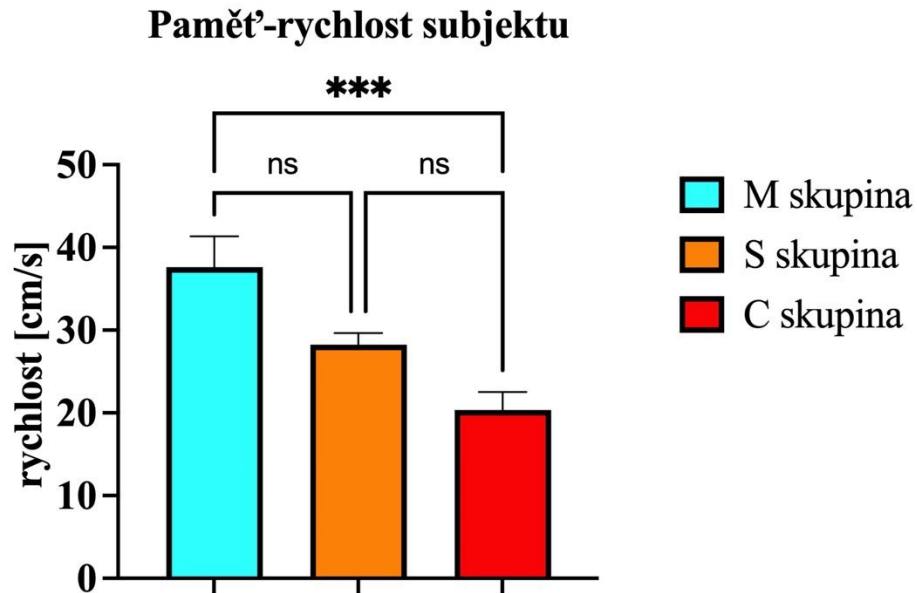
Obrázek 16 Graf Učení-doba nalezení ostrůvku (vlastní zdroj).

V době, za kterou subjekt ostrůvek našel, nebyly taktéž zaznamenány žádné statisticky signifikantní rozdíly. Výsledky jsou zaznamenány v grafu Učení-doba nalezení ostrůvku (Obrázek 16). Zde se také postupně zkracovala doba nalezení ostrůvku ve všech skupinách obdobně. Celková signifikace parametru treatment v době, za kterou objekt ostrůvek našel testem ANOVA vyšla [ $F(2, 15) = 0.7448$ ;  $p = 0.4916$ ].



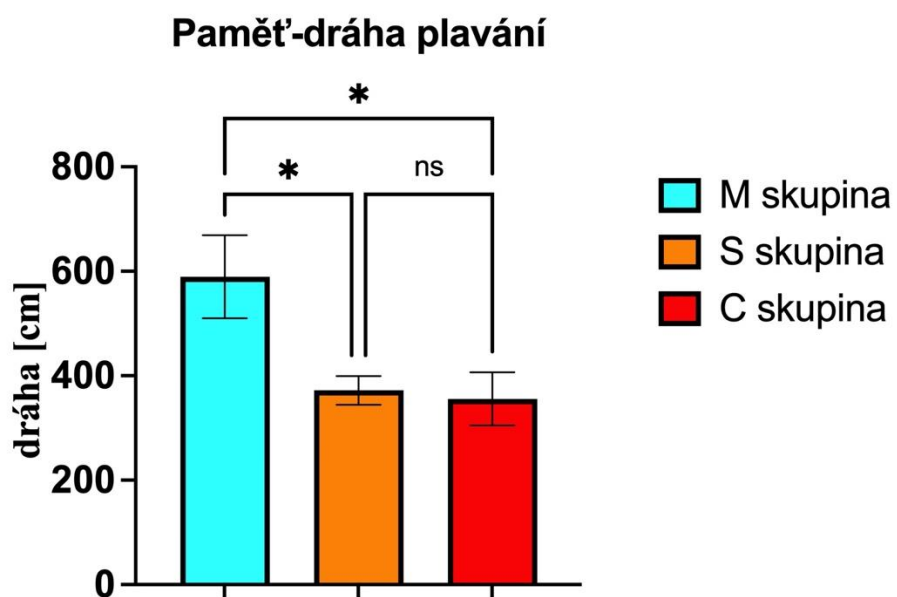
### 5.1.2 Test paměti

12. den probíhal test paměti. Výsledky byly hodnoceny pomocí statistického testu One-way ANOVA.



Obrázek 17 Graf Paměť-rychlost subjektu (vlastní zdroj).

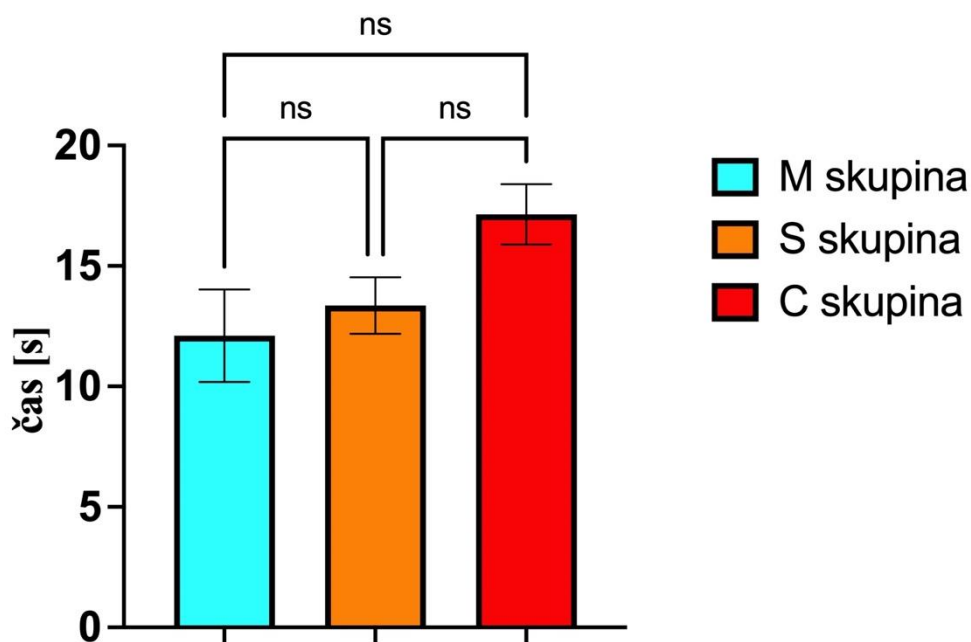
V parametru rychlost plavání byl veliký signifikantní rozdíl mezi skupinou M a C (Obrázek 17). Hodnota  $p$  mezi těmito skupinami se rovnala 0,0009. Celkově byla hodnota signifikance parametru treatment [ $F(2, 15) = 10.92$ ;  $p=0.0012$ ]. V Brown-Forsythe testu byla hodnota signifikance ( $p=0,0197$ ).



Obrázek 18 Graf Paměť-dráha plavání (vlastní zdroj).

Rozdíly drah mezi skupinami v testu paměti byly také statisticky významné. Skupina M v tento den urazila v průměru nejdelší dráhu během hledání ostrůvku, na druhou stranu skupina C měla v průměru dráhu nejkratší ( $p=0,0276$ ), mezi skupinou M a S byla hodnota P rovna 0,0409 (Obrázek 18). V celkovém ANOVA testu byla signifikace parametru treatment rovna [ $F(2, 15) = 5.266, p=0.0185$ ].

### Paměť- doba nalezení ostrůvku



Obrázek 19 Graf Paměť-doba nalezení ostrůvku (vlastní zdroj).

Čas, za kterou subjekt ostrůvek našel, popisuje třetí graf (Obrázek 19). V tomto parametru nebyly vyhodnoceny žádné markantní rozdíly. Signifikance testu ANOVA se rovnala [ $F(2, 15) = 3.113; p=0.0740$ ].

## 5.2 Vyhodnocení Western blotu

Výsledky Western blotu byly hodnoceny pomocí chemiluminiscenční detekce přístrojem ChemiDoc firmy Bio rad.



*Obrázek 20 Výsledek doublecortin gel 1 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj).*



*Obrázek 21 výsledek doublecortin gel 2 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj).*

Na obrázcích můžeme vidět výsledek chemiluminiscence doublecortinu, který je markerem neurogeneze hipokampu (Obrázek 20; Obrázek 21). Nebyly zaznamenány žádné změny napříč skupinami. Rozložení vzorků v gelech je zaznamenáno v tabulce (tabulka 3).



*Obrázek 22 výsledek aktinu gel 1 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj).*



*Obrázek 23 výsledek aktinu gel 2 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj).*

Chemiluminiscence aktinu, kterou vidíme na obrázcích, byla při hodnocení použita jako kontrola, díky které jsme zjistily, zda byla metoda správně provedena. Zde by neměly být viditelné žádné změny (Obrázek 22; Obrázek 23).

### **5.3 Vyhodnocení ELISA metody**

Statistické zpracování výsledků koncentrací jednotlivých neurotransmiterů bylo provedeno pomocí Graph Pad Prism 9 testem One-way ANOVA. Koncentrace ve vzorcích byla zjištěna pomocí spektrofotometrického stanovení při vlnové délce 450

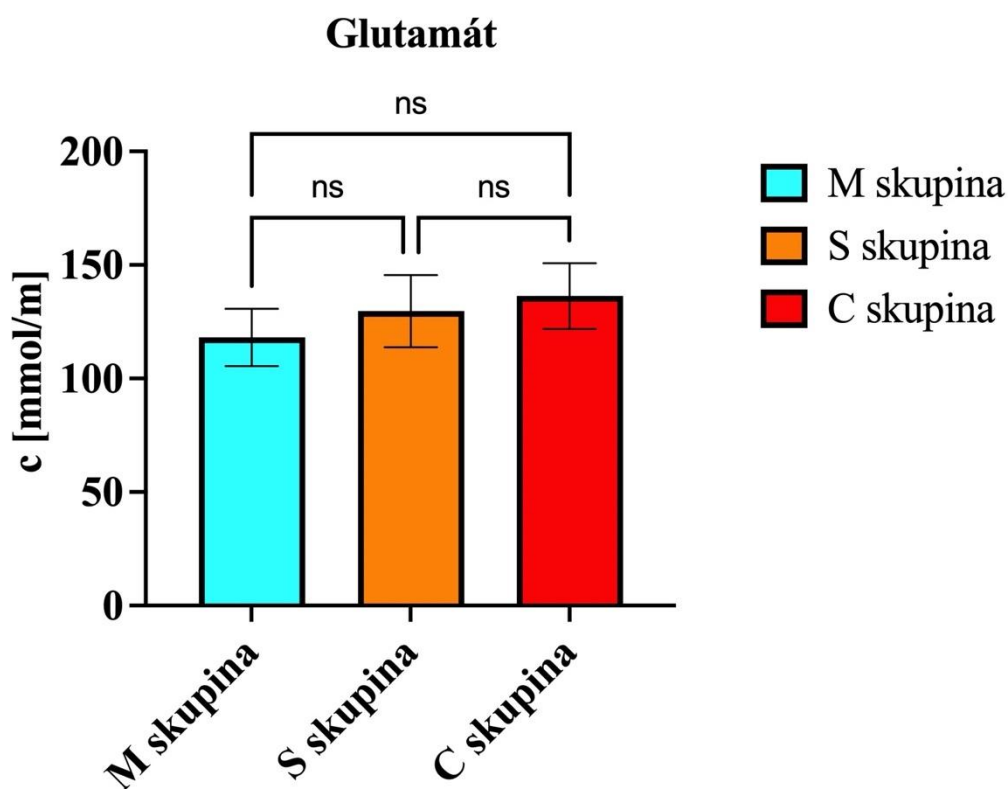
nm. Koncentrace vyšla v jednotkách ng/ml, proto bylo potřeba přepočítat koncentraci na jednotky mmol/l.

### 5.3.1 ELISA glutamátu

Naměřené výsledky spektrofotometrické analýzy byly přepočítány na jednotky mmol/l (Tabulka 4).

Vzorový výpočet vzorku 1

$$c = c_1 \cdot 6,8 = 13,891 \cdot 6,8 = 94,458 \text{ mmol/l}$$



Obrázek 24 Graf koncentrace glutamátu (vlastní zdroj).

Pomocí testu ANOVA došlo k vyhodnocení koncentrace glutamátu ve vzorcích. V grafu Glutamát (Obrázek 24) můžeme vidět, že nejnižší koncentrace byla ve vzorcích M skupiny, naopak nejvyšší byla ve vzorcích C skupiny. Žádné statisticky signifikantní

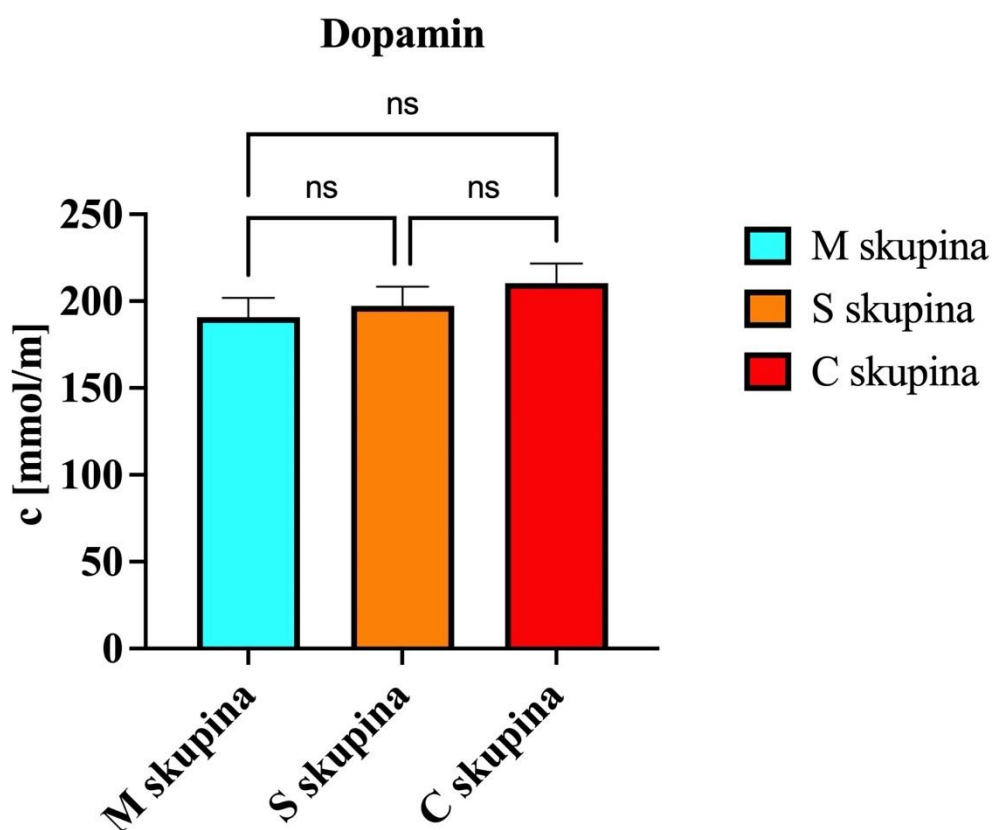
změny nebyly zaznamenány. Signifikace parametru treatment v testu ANOVA byla rovna [F (2, 27) = 0.4114; p=0.6668].

### 5.3.2 ELISA dopaminu

Naměřené výsledky spektrofotometrické analýzy byly přepočítány na jednotky mmol/l (Tabulka 5).

Vzorový výpočet vzorku 1

$$c = c_1 \cdot 6,53 = 32,906 \cdot 6,53 = 214,876 \text{ mmol/l}$$



Obrázek 25 Graf koncentrace dopaminu (vlastní zdroj).

V grafu Dopamin (Obrázek 25) můžeme vidět koncentrace dopaminu v jednotlivých skupinách. Koncentrace dopaminu byla nejnižší u M skupiny a nejvyšší u C skupiny. Rozdíly mezi jednotlivými skupinami nebyly signifikantní. Celková

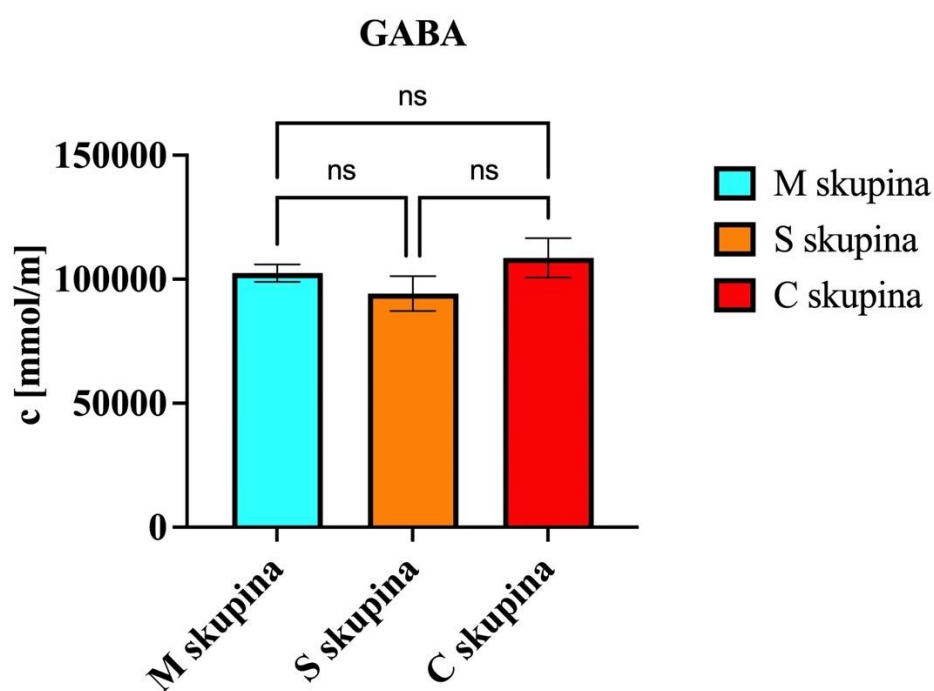
signifikance faktoru treatment testem One-way ANOVA byla rovna [ $F(2, 27) = 0.8000$   $p=0.4597$ ].

### 5.3.3 ELISA GABA

Naměřené výsledky spektrofotometrické analýzy byly přepočítány na jednotky mmol/l (Tabulka 6).

Vzorový výpočet vzorku 1

$$c = c_1 \cdot 9,7 = 10899,063 \cdot 9,7 = 105720,911 \text{ mmol/l}$$



Obrázek 26 Graf koncentrace GABA (vlastní zdroj).

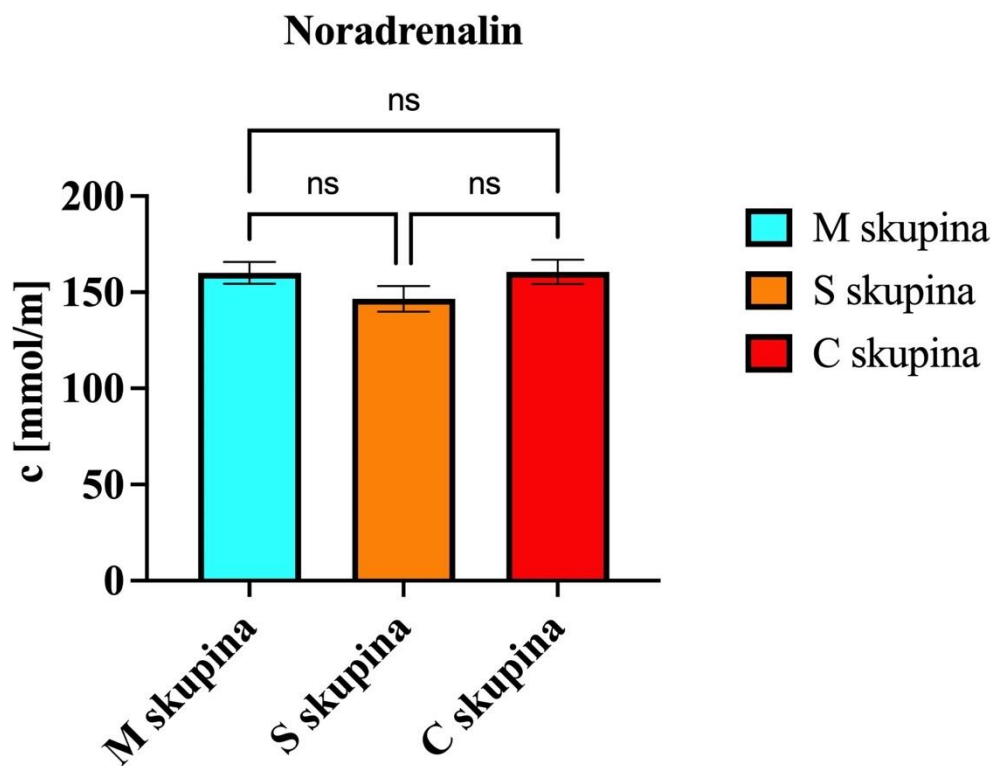
Podle grafu GABA (Obrázek 26) nebyly vyhodnoceny žádné rozdíly mezi jednotlivými skupinami, které by byly statisticky významné. Nejnižší koncentrace GABA byla vyhodnocena u S skupiny. Celková signifikance treatment faktoru ANOVA testem se rovnala [ $F(2, 27) = 1.245$ ;  $p=0.3038$ ].

### 5.3.4 ELISA noradrenalinu

Naměřené výsledky spektrofotometrické analýzy byly přepočítány na jednotky mmol/l (Tabulka 7).

Vzorový výpočet vzorku 1

$$c = c_1 \cdot 5,91 = 29,447 \cdot 5,91 = 174,031 \text{ mmol/l}$$



Obrázek 27 Graf koncentrace noradrenalinu (vlastní zdroj).

Pomocí ANOVA testu jsme vyhodnotily koncentraci dopaminu ve vzorcích. V grafu Dopamin (Obrázek 27) můžeme vidět, že nejnižší koncentrace byla ve vzorcích S skupiny. Žádné statisticky signifikantní změny nebyly vyhodnoceny. Signifikace parametru treatment v testu ANOVA se rovnala  $[F(2, 27) = 1.612; p=0.2181]$ .

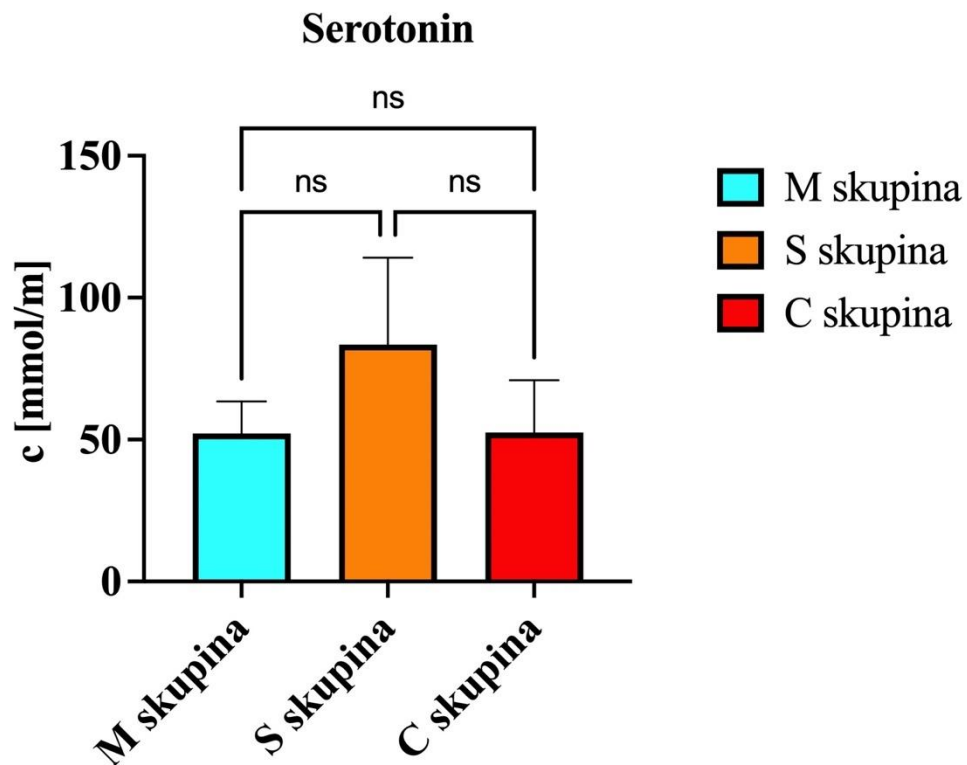


### 5.3.5 ELISA serotoninu

Naměřené výsledky spektrofotometrické analýzy byly přepočítány na jednotky mmol/l (Tabulka 8).

Vzorový výpočet vzorku 1

$$c = c_1 \cdot 5,67 = 18,611 \cdot 5,67 = 105,524 \text{ mmol/l}$$



Obrázek 28 Graf koncentrace serotoninu (vlastní zdroj).

Vyhodnocením testu ANOVA a porovnáním p hodnot mezi skupinami jsme porovnali koncentraci serotoninu ve vzorcích. I přes to, že v grafu Serotonin (Obrázek 28) jsou značné rozdíly v koncentracích mezi skupinami, tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Signifikace faktoru treatment byla rovna [F (2, 24) = 0.6887; p=0.5119].

## 6 DISKUZE

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda má aplikace metamfetaminu jedincům laboratorního potkana v rané fázi dospívání vliv na vývoj hipokampu, který v tomto období vývoje vrcholí. Hipokampus je zásadní struktura CNS, která svou funkcí ovlivňuje schopnost učení a paměti. Tuto schopnost jsme hodnotily pomocí behaviorálního testu MWM, kterým byly zvířata testovány den po poslední expozici METH. Následně bylo naším dalším cílem zjistit, zda subkutánní podávání METH v již zmíněném období ovlivňuje koncentraci neurotransmiterů v odebraných vzorcích tkáně hipokampu. Konkrétně se jednalo o neurotransmitery DA, NA, SER, GLU a GABA. Sledovaly jsme také změny v koncentraci doublecortinu v hipokampu, jelikož se jedná o marker jeho vývoje.

Několik studií ukázalo, že METH je silný psychomotorický stimulant, který ovlivňuje dopaminergní, glutamatergní a serotoninergní systémy v mozku. Nálezy podobné těm, které byly pozorovány v mozku člověka, byly pozorovány u hlodavců, kterým byl podáván METH. Bylo také zjištěno, že METH způsobuje neurodegeneraci, oxidativní stres, apoptózu a nekrózu v různých oblastech mozkové tkáně. Tato pozorování mohou naznačovat, že opakovaná expozice METH může vyvolat adaptivní změny v mozku se změnami v expresi genů a proteinů, stejně jako strukturální modifikace na dopaminergních, glutamatergních a serotoninergních synapsích (Cadet et al. 2003; Tokunaga et al. 2008; Warren et al. 2007).

Několik dalších studií se zaměřilo na změny v limbickém systému, konkrétně hipokampu, vzhledem k tomu, že hlavní působení metamfetaminu se týká právě tohoto systému. Bylo prokázáno, že chronická expozice metamfetaminu vede v klinických a experimentálních modelech k dlouhotrvajícím kognitivním deficitům. V jedné ze studií bylo zjištěno, že kognitivní poruchy v oblasti hipokampu se nevyskytovaly během expozice této drogy, ale spíše se jednalo o pozdější projev toxicity metamfetaminu. Při použití jednoho chronického modelu METH u myši bylo zjištěno, že právě po dlouhém období abstinence vykazovaly myši vystavené METH deficit prostorové paměti a hipokampálního přenosu. Navíc bylo zjištěno, že METH má rozdílný účinek na různé podoblasti hipokampu, jako je inhibice neurogeneze v oblasti ventrálního prostorového

zpracování a blokování apoptózy v oblasti dorzální hipokampu (Krasnova et al. 2010; Moratalla et al. 1996; Robison a Nestler).

Charles Vorhees, který se dlouhodobě věnuje účinkům metamfetaminu na kognitivní funkce v různých periodách vývoje, přinesl několik zajímavých poznatků. V případě expozice METH, rovněž v PD 11–20, skupina vystavená účinkům metamfetaminu vykazovala zhoršené učení v MWM. Dospěl tedy k závěru, že účinky metamfetaminu jsou jak dlouhodobé, tak závislé na stádiu vývoje a zahrnují kognitivní funkce. V dalších studiích bylo prokázáno, že expozice METH v období rané adolescence způsobuje deficit v učení a paměti, a tento deficit přetrvává dlouhodobě. Zjištění, že expozice METH vede k deficitu v prostorovém učení a referenční paměti v rámci testu MWM naznačují, že metamfetamin může s velkou pravděpodobností ovlivnit vývoj hipokampu. Zvířata vystavená METH v PD 11–20 vykazují sníženou hustotu neuronu v oblasti hipokampu. Avšak, zhoršení výkonnosti při učení a paměti nemusí souviset jenom s poškozením hipokampu, ale taky s poškozením v jiných oblastech CNS. Bylo taktéž prokázáno, že podávání METH v rané fázi adolescence nezhoršuje rychlost plavání (Vorhees et al. 1994; Vorhees et al. 2006).

Během našeho testování v MWM jsme rovněž prokázaly, že expozice METH nezhoršuje rychlost plavání subjektu. Fáze učení probíhala den po skončení expozice metamfetaminem. Z našich výsledku je zřejmé, že M skupina byla první den nejrychlejší, ale trvalo jí nejdéle ostrůvek najít. Tyto rozdíly se pak v ostatních dnech mezi jednotlivými skupinami vyrovnaly. Z grafů je patrné zlepšení všech skupin v hledání ostrůvku. Během testu paměti, který probíhal 12. den, jsme prokázaly, že M skupina laboratorních potkanů, která byla den před behaviorálním testem vystavena METH, byla v porovnání s ostatními skupinami (S skupina a C skupina) rychlejší a ostrůvek našly za nejkratší čas. Oproti tomu, dráha zvířat z M skupiny byla nejdelší, což potvrzuje fakt, že metamfetamin má negativní dopad na dlouhodobou paměť. Tyto rozdíly jsou patrné z grafu pro fázi paměti. Statisticky významné byly rozdíly mezi skupinami při porovnávání parametru rychlosti zvířete a jeho dráhy. Rozdíly v době nalezení ostrůvku byly statisticky nevýznamné.

Co se týče neurogeneze hipokampu, bylo zjištěno, že METH ovlivňuje buněčné dělení směrem k diferenciaci. Baptista a kol. prokázali, že vyšší koncentrace

metamfetaminu zvyšovala expresi doublecortinu jako markeru nezralých neuronů. Tato studie také ukazuje, že METH zvýšil v hipokampu diferenciaci v nezralé neurony, což bylo prokázáno zvýšením hladiny tohoto proteinu. Naproti tomu studie Che a spol. ukázala, že podávání METH významně snížilo proliferaci a aktivaci neurálních kmenových buněk. Tento antiproliferativní účinek metamfetaminu by mohl být taky spojen s regulací buněčného cyklu (Baptista et al 2014; Che et al. 2021).

Podle našeho výsledku metodou Western blot, nebyly zaznamenány žádné změny v doublecortinu. Analýza membrán byla provedena chemiluminiscenčním přístrojem ChemiDoc od firmy Bio rad. Vzorky byly do gelu pipetovány v dupletu a na jednom gelu byly vzorky ze všech skupin, aby mohlo dojít k nejlepšímu porovnání. Jako kontrola byl vyhodnocen protein aktin, který by u všech skupin neměl být změněn. I v tomto případě nedošlo k žádným změnám.

Při asociaci METH s neurotransmitery bylo prokázáno několik skutečností. V řadě studií bylo pozorováno poškození neurotransmise dopaminu u zvířat vystavených metamfetaminu zejména degenerace nervových zakončení dopaminu, se snížením aktivity DAT. Zobrazovací studie u lidí prokázaly snížení hladin DAT (Schmid a Gibb 1985; Volkow et al. 2001).

Zhou a spol ve své studii uvedli, že během několika hodin po injekci METH byly pozorovány dávkové účinky specifické pro daný region, přičemž při nižších dávkách METH byl postižen prefrontální kortex a hipokampus a při vyšších dávkách striatum a parietální kůra. Mechanismus poškození neurotransmise serotoninu prostřednictvím METH není přesně znám a uvolňování dopaminu se považuje za mezistupeň při příčině degenerace serotoninu. Blokování syntézy dopaminu zabraňuje degeneraci serotoninu. Vztah mezi uvolňováním DA a poškozením serotoninových vláken je složitý a může zahrnovat další neurotransmiterové systémy (Čechová a Šlamberová 2021; Zhou a Bledsoe 1996).

Výsledky koncentrace neurotransmiterů u našeho pokusu neukázaly žádné signifikantní rozdíly ani v jednom případě zkoumaného neurotransmiteru. Výsledky koncentrace glutamátu ukázaly lehce snížené koncentrace u potkanů M skupiny. Stejný výsledek nastal i v případě koncentrace dopaminu v hipokampu M skupiny oproti skupině

S a C. Naproti tomu koncentrace neurotransmiteru GABA vyšla u zvířat po expozici metamfetaminem zvýšená oproti skupině S, ale snížena v porovnání s C skupinou. Koncentrace dopaminu ve vzorcích hipokampu M skupiny byla podobná v porovnání s C skupinou. S skupina měla v tomto případě koncentraci noradrenalinu nejnižší v porovnání se skupinou M a C. Hladina koncentrace serotoninu byla zvýšená oproti M a C skupině u potkanů ze skupiny S. M a C skupina měli obdobné koncentrace serotoninu, rozdíly byly v těchto skupinách minimální.

Je možné, že vlivem neurogeneze hipokampu v období rané adolescence byly změny v koncentracích neurotransmiterů a doublecortinu rychleji vráceny do normálu, jelikož testovaným subjektům během behaviorálního testu v Morrisově vodním bludišti nebyl podáván metamfetamin. To pravděpodobně mohl být dostatečný čas pro regeneraci.

## 7 ZÁVĚR

Mechanismy neurotoxicity metamfetaminu jsou i v této době stále velkým otazníkem. Existuje jen málo studií, které by se zabývaly tímto tématem, a to i přes fakt, že METH je dlouhodobě zneužívaným psychostimulantem. Je proto důležité se touto otázkou zabývat a zjistit co nejvíce o této látce a jeho vlivu na lidský organismus. Je důležité se v tomto případě zaměřit i na adolescenty, které představují rizikovou skupinu pro užívání drog.

Analýzou vzorků metodou ELISA a Western blot se nepovedlo zjistit, zda metamfetamin vyvolává nevratné změny v oblasti hipokampu. Analyzovány byly koncentrace daných neurotransmiterů a změny v proteinu doublecortin, který je markerem neurogeneze této části mozku. Z našich výsledků nebylo patrné, že by expozice metamfetaminu vyvolávala velké změny ve vývoji hipokampu v období rané fáze adolescence u potkanů.

Dále byly hodnoceny změny v paměti a učení prostřednictvím Morrisova vodního bludiště, který patří mezi nejznámější behaviorální testy prostorové paměti. Zde byly patrné rozdíly v testu paměti, kdy jsme zaznamenaly statisticky relevantní signifikance v parametru rychlost plavání mezi skupinou C a M. Rovněž rozdíly drah byly statisticky významné.

I přes to, že jsme nenalezly markantní rozdíly v koncentracích neurotransmiterů, nebo změny v doublecortinu, je zapotřebí pokračovat v dalším výzkumu vlivu metamfetaminu na neurogenezi hipokampu, abychom byli schopni vyvozovat závěry.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ADHD	attention deficit hyperactivity disorder
AMPA	receptor alfa-amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionové kyseliny
ATSS	amphetamine-type stimulants
CNS	centrální nervová soustava
DA	dopamin
DAT	dopamin transporter
EAAT1	excitatory amino acid transporter 1
EAAT2	excitatory amino acid transporter 2
GLU	glutamát
GABA	kyselina gama-aminomáselná
KA	kainatový receptor
MAO	monoaminoxidáza
METH	metamfetamin
NA	noradrenalin
NAT	noradrenalin transporter
NEU	neurotransmitter
NMDA	receptor N-metyl-D-asparágové kyseliny
ROS	reaktivní formy kyslíku
SER	serotonin
5-HTR	5-hydroxytryptaminové receptory

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALVES, Renata L., Pedro OLIVEIRA, Igor M. LOPES, Camila C. PORTUGAL, Cecília J. ALVES, Fernando BARBOSA, Teresa SUMMAVIELLE a Ana MAGALHÃES. Early-life stress affects drug abuse susceptibility in adolescent rat model independently of depression vulnerability. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2022-04-18]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-70242-4
2. ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN isbn9780815332183
3. BALÍKOVÁ, Marie. *Forenzní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření*. Druhé, doplněné vydání. Praha: Galén, [2017]. ISBN 978-80-7492-304-3
4. BAPTISTA, Sofia, Charlene LASGI, Caroline BENSTAALI, Nuno MILHAZES, Fernanda BORGES, Carlos FONTES-RIBEIRO, Fabienne AGASSE a Ana Paula SILVA. Methamphetamine decreases dentate gyrus stem cell self-renewal and shifts the differentiation towards neuronal fate. *Stem Cell Research* [online]. 2014, **13**(2), 329-341 [cit. 2022-05-09]. ISSN 18735061. Dostupné z: doi:10.1016/j.scr.2014.08.003
5. BARTUŇKOVÁ, Jiřina a Milan PAULÍK. *Vyšetřovací metody v imunologii. 2., přeprac. a dopl. vyd.* Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3533-7
6. BOYSON, Sally J a Catherine E ADAMS. D1 and D2 Dopamine Receptors in Perinatal and Adult Basal Ganglia. *Pediatric Research* [online]. 1997, **41**(6), 822-831 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0031-3998. Dostupné z: doi:10.1203/00006450-199706000-00006
7. BREEN, M S, A UHLMANN, C M NDAY, S J GLATT, M MITT, A METSALPU, D J STEIN a N ILLING. Candidate gene networks and blood biomarkers of methamphetamine-associated psychosis: an integrative RNA-



- sequencing report. *Translational Psychiatry* [online]. 2016, **6**(5), e802-e802 [cit. 2022-04-18]. ISSN 2158-3188. Dostupné z: doi:10.1038/tp.2016.67
8. CADET, Jean Lud a Christie BRANNOCK. Invited Review Free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochemistry International* [online]. 1998, **32**(2), 117-131 [cit. 2022-04-18]. ISSN 01970186. Dostupné z: doi:10.1016/S0197-0186(97)00031-4
  9. CADET, Jean Lud, Subramaniam JAYANTHI a Xiaolin DENG. Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminal degeneration and neuronal apoptosis. *The FASEB Journal* [online]. 2003, **17**(13), 1775-1788 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.03-0073rev
  10. ČECHOVÁ, B a R ŠLAMBEROVÁ. Methamphetamine, Neurotransmitters and Neurodevelopment. *Physiological Research* [online]. S301-S315 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934821
  11. DAWSON, Ted M. a Valina L. DAWSON. Mitochondrial Mechanisms of Neuronal Cell Death: Potential Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2017, **57**(1), 437-454 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0362-1642. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pharmtox-010716-105001
  12. FERRUCCI, Michela, Fiona LIMANAQI, Larisa RYSKALIN, Francesca BIAGIONI, Carla L. BUSCETI a Francesco FORNAI. The Effects of Amphetamine and Methamphetamine on the Release of Norepinephrine, Dopamine and Acetylcholine From the Brainstem Reticular Formation. *Frontiers in Neuroanatomy* [online]. 2019, **13** [cit. 2022-04-18]. ISSN 1662-5129. Dostupné z: doi:10.3389/fnana.2019.00048
  13. FRANKLE, W. Gordon, Ilise LOMBARDO, Antonia S. NEW, et al. Brain Serotonin Transporter Distribution in Subjects With Impulsive Aggressivity: A Positron Emission Study With [<sup>11</sup>C]McN 5652. *American Journal of*

*Psychiatry* [online]. 2005, **162**(5), 915-923 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0002-953X.  
Dostupné z: doi:10.1176/appi.ajp.162.5.915

14. GRAY, Henry. *Anatomy of the human body*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1973
15. HOOD, Kimberly N., Jing ZHAO, John B. REDELL, Michael J. HYLIN, Brynn HARRIS, Alec PEREZ, Anthony N. MOORE a Pramod K. DASH. Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to the Loss of Newborn Hippocampal Neurons after Traumatic Brain Injury. *The Journal of Neuroscience* [online]. 2018, **38**(9), 2372-2384 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1756-17.2018
16. CHEBIB, Mary a Graham A. R. JOHNSTON. GABA-Activated Ligand Gated Ion Channels: Medicinal Chemistry and Molecular Biology. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2000, **43**(8), 1427-1447 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm9904349
17. CHE, Xiaohang, Yijun BAI, Jialing CAI, et al. Hippocampal neurogenesis interferes with extinction and reinstatement of methamphetamine-associated reward memory in mice. *Neuropharmacology* [online]. 2021, **196** [cit. 2022-05-09]. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108717
18. CHOMYNOVÁ, P., GROHMANNOVÁ, K., JANÍKOVÁ, B., ROUS, Z., ČERNÍKOVÁ, T., CIBULKA, J., MRAVČÍK, V. 2022. Souhrnná zpráva o závislostech v České republice 2021 [Summary Report on Addictions in the Czech Republic in 2021] CHOMYNOVÁ, P. (Ed.). Praha: Úřad vlády České republiky. ISBN 978-80-7440-293-7 (on-line, PDF)
19. JAYANTHI, Subramaniam, Atul P. DAIWILE a Jean Lud CADET. Neurotoxicity of methamphetamine: Main effects and mechanisms. *Experimental Neurology* [online]. 2021, **344** [cit. 2022-04-18]. ISSN 00144886. Dostupné z: doi:10.1016/j.expneurol.2021.113795

20. KALINA, Kamil. *Klinická adiktologie*. Praha: Grada Publishing, 2015. Psyché (Grada). ISBN 978-80-247-4331-8
21. KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2020. ISBN 978-80-247-1963-4
22. KLONGPANICHAPAK, Sirirat, Piyarat GOVITRAPONG, Sushil K. SHARMA a Manuchair EBADI. Attenuation of Cocaine and Methamphetamine Neurotoxicity by Coenzyme Q10. *Neurochemical Research* [online]. 2006, **31**(3), 303-311 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0364-3190. Dostupné z: doi:10.1007/s11064-005-9025-3
23. KRASNOVA, Irina N., Zuzana JUSTINOVA, Bruce LADENHEIM, et al. Methamphetamine Self-Administration Is Associated with Persistent Biochemical Alterations in Striatal and Cortical Dopaminergic Terminals in the Rat. *PLoS ONE* [online]. 2010, **5**(1) [cit. 2022-05-09]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008790
24. LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014. ISBN isbn978-80-7080-877-1
25. MARK, K. A. High-Dose Methamphetamine Acutely Activates the Striatonigral Pathway to Increase Striatal Glutamate and Mediate Long-Term Dopamine Toxicity. *Journal of Neuroscience* [online]. 2004, **24**(50), 11449-11456 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3597-04.2004
26. MOUTON, Moné, Brian H. HARVEY, Marike COCKERAN a Christiaan B. BRINK. The long-term effects of methamphetamine exposure during pre-adolescence on depressive-like behaviour in a genetic animal model of depression. *Metabolic Brain Disease* [online]. 2016, **31**(1), 63-74 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0885-7490. Dostupné z: doi:10.1007/s11011-015-9765-y

27. MORRIS, Richard. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 1984, **11**(1), 47-60 [cit. 2022-04-18]. ISSN 01650270. Dostupné z: doi:10.1016/0165-0270(84)90007-4
28. MORATALLA, Rosario, Ming XU, Susumu TONEGAWA a Ann M. GRAYBIEL. Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1996, **93**(25), 14928-14933 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.25.14928
29. MOSZCZYNSKA, Anna a Sean Patrick CALLAN. Molecular, Behavioral, and Physiological Consequences of Methamphetamine Neurotoxicity: Implications for Treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. 2017, **362**(3), 474-488 [cit. 2022-04-18]. ISSN 0022-3565. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.116.238501
30. PANENKA, William J., Ric M. PROCYSHYN, Tania LECOMTE, G. William MACEWAN, Sean W. FLYNN, William G. HONER a Alasdair M. BARR. Methamphetamine use: A comprehensive review of molecular, preclinical and clinical findings. *Drug and Alcohol Dependence* [online]. 2013, **129**(3), 167-179 [cit. 2022-04-18]. ISSN 03768716. Dostupné z: doi:10.1016/j.drugalcdep.2012.11.016
31. PAULUS, Martin P. a Jennifer L. STEWART. Neurobiology, Clinical Presentation, and Treatment of Methamphetamine Use Disorder. *JAMA Psychiatry* [online]. 2020, **77**(9) [cit. 2022-04-18]. ISSN 2168-622X. Dostupné z: doi:10.1001/jamapsychiatry.2020.0246
32. ROBISON, Alfred J. a Eric J. NESTLER. Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. 2011, **12**(11), 623-637 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1471-003X. Dostupné z: doi:10.1038/nrn3111

33. ROKYTA, Richard. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2. ISBN 8072036777.
34. SCHMIDT, Christopher J. a James W. GIBB. Role of the serotonin uptake carrier in the neurochemical response to methamphetamine: Effects of citalopram and chlorimipramine. *Neurochemical Research* [online]. 1985, **10**(5), 637-648 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0364-3190. Dostupné z: doi:10.1007/BF00964403
35. SCHNEIDERKA, Petr. *Kapitoly z klinické biochemie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN isbn80-246-0678-x
36. SUSLICK, Kenneth S. Sonochemistry. *Science* [online]. 1990, **247**(4949), 1439-1445 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.247.4949.1439
37. ŠEVČÍKOVÁ, M., I. PETRÍKOVÁ a R. ŠLAMBEROVÁ. Methamphetamine exposure during the first, but not the second half of prenatal development, affects social play behavior. *Physiological Research* [online]. 319-330 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: doi:10.33549/physiolres.934230
38. TOKUNAGA, Itsuo, Akiko ISHIGAMI, Shin-ichi KUBO, Takako GOTOHDA a Osamu KITAMURA. The peroxidative DNA damage and apoptosis in methamphetamine-treated rat brain. *The Journal of Medical Investigation* [online]. 2008, **55**(3,4), 241-245 [cit. 2022-05-09]. ISSN 1343-1420. Dostupné z: doi:10.2152/jmi.55.241
39. VOLKOW, Nora D., Linda CHANG, Gene-Jack WANG, et al. Association of Dopamine Transporter Reduction With Psychomotor Impairment in Methamphetamine Abusers. *American Journal of Psychiatry* [online]. 2001, **158**(3), 377-382 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0002-953X. Dostupné z: doi:10.1176/appi.ajp.158.3.377
40. VORHEES, Charles V., Kirsten G. AHRENS, Karen D. ACUFF-SMITH, Mary A. SCHILLING a J. Edward FISHER. Methamphetamine exposure during early

- postnatal development in rats: I. Acoustic startle augmentation and spatial learning deficits. *Psychopharmacology* [online]. 1994, **114**(3), 392-401 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0033-3158. Dostupné z: doi:10.1007/BF02249328
41. VORHEES, Charles V a Michael T WILLIAMS. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(2), 848-858 [cit. 2022-04-18]. ISSN 1754-2189. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.116
42. WARREN, Matthew W., Stephen F. LARNER, Firas H. KOBEISSY, Christina A. BREZING, Jennifer A. JEUNG, Ronald L. HAYES, Mark S. GOLD a Kevin K. W. WANG. Calpain and caspase proteolytic markers co-localize with rat cortical neurons after exposure to methamphetamine and MDMA. *Acta Neuropathologica* [online]. 2007, **114**(3), 277-286 [cit. 2022-05-09]. ISSN 0001-6322. Dostupné z: doi:10.1007/s00401-007-0259-9
43. YANG, Xue, Yong WANG, Qiyang LI, et al. The Main Molecular Mechanisms Underlying Methamphetamine- Induced Neurotoxicity and Implications for Pharmacological Treatment. *Frontiers in Molecular Neuroscience* [online]. 2018, **11** [cit. 2022-04-18]. ISSN 1662-5099. Dostupné z: doi:10.3389/fnmol.2018.00186

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Na ilustraci je zeleně označena hipokampální struktura, která je umístěna ve spánkovém laloku (převzato z Gray 1973). .....	13
Obrázek 2 chemická struktura metamfetaminu.....	21
Obrázek 3 ukazuje schéma excitační toxicity METH. Zvýšená hladina GLU vede ke stimulaci N-metyl-D-asparátových receptorů (NMDAR), což vede k nárůstu influxu Ca <sup>2+</sup> . Zvýšená koncentrace Ca <sup>2+</sup> v buňkách vede k produkci NO, který působí jako stresor endoplazmatického retikula (ER). ER pak spouští kaskádu apoptických drah. (obrázek převzat z Yang et al. 2018) .....	27
Obrázek 4 Molekulární mechanismus neurotoxicity METH. Významnými faktory toxicity jsou oxidační stresové reakce, oxidace DA a velká produkce GLU. Oxidací DA vznikají reaktivní kyslíkové formy (ROS), které vedou k mitochondriální dysfunkci. To má za následek poškození neurálních buněk. Vlivem neurozánětu zprostředkovaný mikroglie pak dochází k apoptóze buněk. Při chronickém užívání METH dochází často k poklesu DA, DAT a jiných markerů. (obrázek převzat z Yang et al. 2018) .....	29
Obrázek 5 Znázorňuje schéma oxidativního stresu a mitochondriální dysfunkce, které se podílejí na neurotoxicitě METH. Při expozici METH vzniká velké množství ROS. Nadměrné množství těchto forem inhibuje klíčové enzymy mitochondriálního metabolismu, což vede k dysfunkci těchto organel. Dysfunkce pak vyvolá apoptickou kaskádu. (obrázek převzat z Yang et al. 2018) .....	31
Obrázek 6 Vývoj NEU v potkaním a lidském mozku. Schéma A ukazuje prenatální a postnatální vývoj neurotransmiterů v mozku potkana. Schéma B ukazuje prenatální a postnatální vývoj u člověka. Pruhy představují buňky a projekci NEU systému. (obrázek převzat z Herlenius et al. 2001).....	32
Obrázek 7 Časová osa znázorňující průběh experimentu (vlastní zdroj).....	33
Obrázek 8 přístroj Qsonica Sonicator Q700 (vlastní zdroj).....	36
Obrázek 9 Gely pro elektroforézu od firmy Bio rad (vlastní zdroj) .....	38
Obrázek 10 Probíhající elektroforéza na pozici 1 a 14 můžeme vidět rozdělení bílkovin markeru a na ostatních pozicích jsou vzorky v dupletu (vlastní zdroj).....	39
Obrázek 11 aparatura pro metodu Western blot (vlastní zdroj).....	39
Obrázek 12 Přístroj ChemiDoc od firmy Bio rad (vlastní zdroj). .....	40

Obrázek 13 Přístroj 800 TS Absorbance reader od firmy BioTek (vlastní zdroj). ....	43
Obrázek 14 Graf Učení-rychlost plavání (vlastní zdroj). .....	44
Obrázek 15 Graf Učení-dráha subjektu (vlastní zdroj).....	45
Obrázek 16 Graf Učení-doba nalezení ostrůvku (vlastní zdroj). .....	46
Obrázek 17 Graf Paměť-rychlost subjektu (vlastní zdroj).....	47
Obrázek 18 Graf Paměť-dráha plavání (vlastní zdroj). .....	47
Obrázek 19 Graf Paměť-doba nalezení ostrůvku (vlastní zdroj).....	48
Obrázek 20 Výsledek doublecortin gel 1 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj). ....	49
Obrázek 21 výsledek doublecortin gel 2 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj). ....	49
Obrázek 22 výsledek aktinu gel 1 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj).....	50
Obrázek 23 výsledek aktinu gel 2 (chemiluminiscence) (vlastní zdroj). .....	50
Obrázek 24 Graf koncentrace glutamátu (vlastní zdroj). .....	51
Obrázek 25 Graf koncentrace dopaminu (vlastní zdroj). .....	52
Obrázek 26 Graf koncentrace GABA (vlastní zdroj). .....	53
Obrázek 27 Graf koncentrace noradrenalinu (vlastní zdroj). .....	54
Obrázek 28 Graf koncentrace serotoninu (vlastní zdroj). .....	55
Obrázek 29 graf kalibrační křivky pro koncentraci glutamátu .....	74
Obrázek 30 Graf kalibrační křivky pro koncentraci katecholaminů .....	75
Obrázek 31 graf kalibrační křivky pro koncentraci GABA.....	75



## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 hmotnosti potkanů, hipokampu a objem přidaného pufru .....	72
Tabulka 2 množství reagensů pro elektroforézu .....	73
Tabulka 3 pozice vzorků v gelu.....	74
Tabulka 4 koncentrací glutamátu ve vzorcích.....	76
Tabulka 5 koncentrace dopaminu ve vzorcích .....	77
Tabulka 6 koncentrace GABA ve vzorcích .....	78
Tabulka 7 koncentrace noradrenalinu.....	79
Tabulka 8 koncentrace serotoninu ve vzorcích .....	80

## 12 SEZNAM PŘÍLOH

*Tabulka 1 hmotnosti potkanů, hipokampu a objem přidaného pufru*

č. vzorku	skupina	hmotnost [g]	hmotnost hipokampu [mg]	objem pufru [μl]
1	M	146	93	854
2	M	150	107	850
3	M	135	114	865
4	M	149	150	851
5	M	141	112	859
6	M	137	140	863
7	M	138	110	862
8	M	134	126	866
9	S	162	130	838
10	S	164	136	836
11	S	166	101	834
12	S	170	110	830
13	S	145	106	855
14	S	150	108	850
15	S	163	145	837
16	M	145	77	855
17	M	128	86	872
18	S	147	80	853
19	S	153	106	847
20	S	127	117	873
21	C	127	92	873
22	C	145	80	855
23	C	144	143	856
24	C	150	131	850
25	C	141	89	859
26	C	120	103	880
27	C	130	130	870
28	C	144	108	856
29	C	124	137	876
30	C	136	129	864

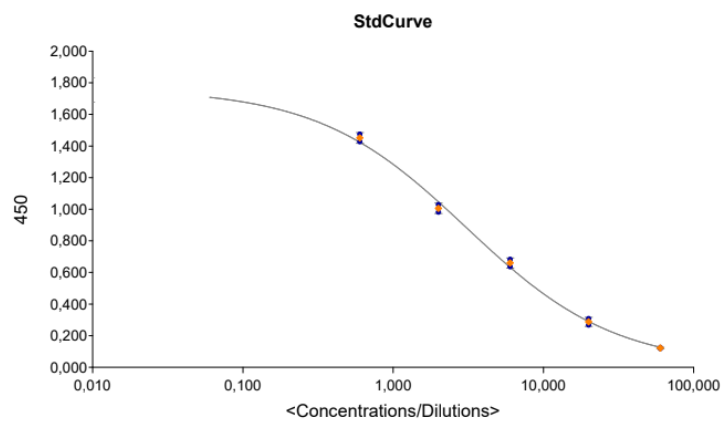
Tabulka 2 množství reagentů pro elektroforézu

č. vzorku	c vzorku	ředění vz x- krat	V vz [μl]	V SLB 1:3 [μl]	DTT [μl]	T-PER [μl]	final c	final V [μl]
1	5,079	2,54	11,81	7,5	0,83	9,85	2	30
2	5,772	2,89	10,39	7,5	0,83	11,27	2	30
3	5,036	2,52	11,92	7,5	0,83	9,75	2	30
4	5,598	2,80	10,72	7,5	0,83	10,95	2	30
5	5,087	2,54	11,80	7,5	0,83	9,87	2	30
6	4,685	2,34	12,81	7,5	0,83	8,86	2	30
7	5,995	3,00	10,01	7,5	0,83	11,66	2	30
8	4,536	2,27	13,23	7,5	0,83	8,44	2	30
9	4,978	2,49	12,05	7,5	0,83	9,61	2	30
10	4,706	2,35	12,75	7,5	0,83	8,92	2	30
11	7,345	3,67	8,17	7,5	0,83	13,50	2	30
12	5,423	2,71	11,06	7,5	0,83	10,60	2	30
13	6,362	3,18	9,43	7,5	0,83	12,24	2	30
14	5,467	2,73	10,98	7,5	0,83	10,69	2	30
15	5,744	2,87	10,45	7,5	0,83	11,22	2	30
16	4,556	2,28	13,17	7,5	0,83	8,50	2	30
17	4,361	2,18	13,76	7,5	0,83	7,91	2	30
18	4,487	2,24	13,37	7,5	0,83	8,30	2	30
19	5,177	2,59	11,59	7,5	0,83	10,08	2	30
20	6,415	3,21	9,35	7,5	0,83	12,31	2	30
21	4,589	2,29	13,07	7,5	0,83	8,59	2	30
22	4,676	2,34	12,83	7,5	0,83	8,84	2	30
23	6,070	3,04	9,88	7,5	0,83	11,78	2	30
24	5,859	2,93	10,24	7,5	0,83	11,43	2	30
25	4,475	2,24	13,41	7,5	0,83	8,26	2	30
26	6,090	3,04	9,85	7,5	0,83	11,81	2	30
27	4,658	2,33	12,88	7,5	0,83	8,78	2	30
28	5,760	2,88	10,42	7,5	0,83	11,25	2	30
29	5,545	2,77	10,82	7,5	0,83	10,85	2	30
30	5,655	2,83	10,61	7,5	0,83	11,06	2	30

Tabulka 3 pozice vzorků v gelu

gel	číslo vzorku	pozice	skupina
1	marker	1	
1	1	2	M
1	1	3	M
1	9	4	S
1	9	5	S
1	21	6	C
1	21	7	C
1	2	8	M
1	2	9	M
1	10	10	S
1	10	11	S
1	22	12	C
1	22	13	C
1	marker	14	

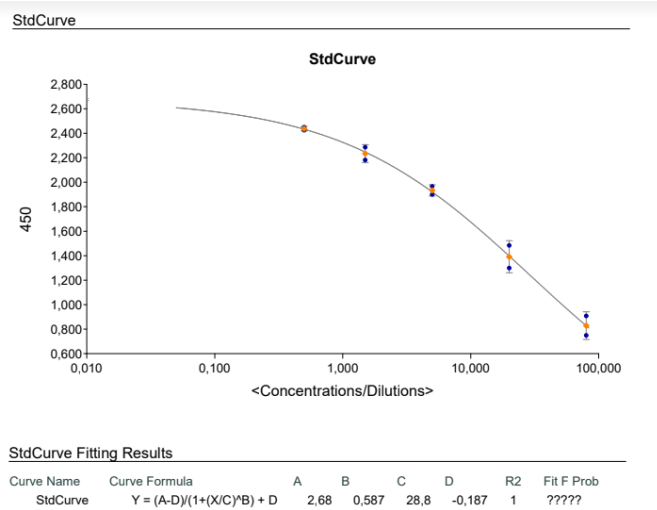
StdCurve



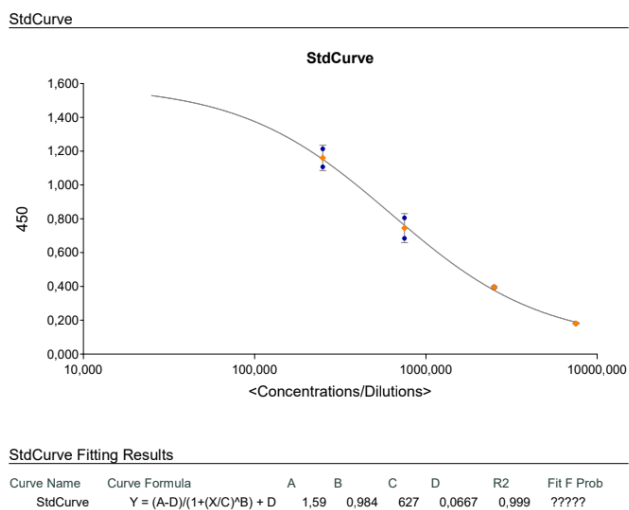
StdCurve Fitting Results

Curve Name	Curve Formula	A	B	C	D	R2	Fit F Prob
StdCurve	$Y = (A-D)/(1+(X/C)^B) + D$	1,76	0,878	3,07	0,00632	0,998	?????

Obrázek 29 graf kalibrační křivky pro koncentraci glutamátu



Obrázek 30 Graf kalibrační křivky pro koncentraci katecholaminů



Obrázek 31 graf kalibrační křivky pro koncentraci GABA

*Tabulka 4 koncentrací glutamátu ve vzorcích*

č. vzorku	skupina	Absorbance	koncentrace	
			[ng/ml]	[nmol/l]
1	M	0,162	13,891	94,459
2	M	0,166	15,917	108,236
3	M	0,149	22,837	155,292
4	M	0,157	30,576	207,917
5	M	0,177	21,019	142,929
6	M	0,163	14,602	99,294
7	M	0,182	11,703	79,580
8	M	0,167	16,161	109,895
9	S	0,159	18,626	126,657
10	S	0,169	19,358	131,634
11	S	0,167	25,752	175,114
12	S	0,25	17,272	117,450
13	S	0,184	28,488	193,718
14	S	0,182	31,927	217,104
15	S	0,19	11,87	80,716
16	M	0,164	11,426	77,697
17	M	0,168	15,523	105,556
18	S	0,156	11,422	77,670
19	S	0,145	14,655	99,654
20	S	0,174	11,329	77,037
21	C	0,145	18,381	124,991
22	C	0,177	14,631	99,491
23	C	0,144	15,04	102,272
24	C	0,166	16,891	114,859
25	C	0,141	24,427	166,104
26	C	0,18	14,077	95,724
27	C	0,171	24,802	168,654
28	C	0,14	14,96	101,728
29	C	0,174	21,942	149,206
30	C	0,197	35,365	240,482

*Tabulka 5 koncentrace dopaminu ve vzorcích*

č. vzorku	skupina	Absorbance	koncentrace [ng/ml]	koncentrace [nmol/l]
1	M	1,737	32,906	214,876
2	M	2,06	19,918	130,065
3	M	2,201	26,954	176,010
4	M	2,095	22,225	145,129
5	M	2,181	26,569	173,496
6	M	1,501	38,149	249,113
7	M	1,808	31,402	205,055
8	M	1,813	31,292	204,337
9	S	1,434	40,15	262,180
10	S	2,339	29,005	189,403
11	S	2,129	24,629	160,827
12	S	2,22	27,348	178,582
13	S	2,161	25,888	169,049
14	S	1,627	35,19	229,791
15	S	1,698	33,709	220,120
16	M	1,853	30,378	198,368
17	M	1,763	32,365	211,343
18	S	1,647	34,767	227,029
19	S	2	25,661	167,566
20	S	2,158	25,79	168,409
21	C	1,643	34,851	227,577
22	C	1,56	36,681	239,527
23	C	1,576	36,312	237,117
24	C	1,682	34,039	222,275
25	C	1,685	33,977	221,870
26	C	2,229	27,517	179,686
27	C	2,132	24,772	161,761
28	C	2,091	21,757	142,073
29	C	1,596	35,863	234,185
30	C	1,575	36,334	237,261

*Tabulka 6 koncentrace GABA ve vzorcích*

č. vzorku	skupina	Absorbance	koncentrace [ng/ml]	koncentrace [nmol/l]
1	M	0,162	10899,063	105720,911
2	M	0,166	10405,628	100934,592
3	M	0,149	12844,807	124594,628
4	M	0,157	11579,222	112318,453
5	M	0,177	9238,187	89610,414
6	M	0,163	10771,748	104485,956
7	M	0,182	8783,203	85197,069
8	M	0,167	10288,595	99799,372
9	S	0,159	11298,0568	109591,151
10	S	0,169	10061,592	97597,442
11	S	0,167	10288,595	99799,372
12	S	0,25	5112,097	49587,341
13	S	0,184	8612,383	83540,115
14	S	0,182	8783,203	85197,069
15	S	0,19	8134,123	78900,993
16	M	0,164	10647,126	103277,122
17	M	0,168	10173,941	98687,228
18	S	0,156	11724,667	113729,270
19	S	0,145	13577,583	131702,555
20	S	0,174	9532,155	92461,904
21	C	0,145	13577,583	131702,555
22	C	0,177	9238,187	89610,414
23	C	0,144	13772,978	133597,887
24	C	0,166	10405,628	100934,592
25	C	0,141	14391,662	139599,121
26	C	0,18	8960,235	86914,280
27	C	0,171	9843,546	95482,396
28	C	0,14	14609,576	141712,887
29	C	0,174	9532,155	92461,904
30	C	0,197	7633,393	74043,912



*Tabulka 7 koncentrace noradrenalinu*

č. vzorku	skupina	Absorbance	koncentrace [ng/ml]	koncentrace [nmol/l]
1	M	0,878	29,447	174,032
2	M	2,399	23,721	140,191
3	M	2,376	23,259	137,461
4	M	2,394	23,633	139,671
5	M	2,391	23,578	139,346
6	M	0,846	29,381	173,642
7	M	0,991	29,732	175,716
8	M	0,829	29,348	173,447
9	S	0,79	29,278	173,033
10	S	2,435	24,221	143,146
11	S	2,42	24,036	142,053
12	S	2,325	20,122	118,921
13	S	2,374	23,235	137,319
14	S	0,786	29,271	172,992
15	S	0,971	29,674	175,373
16	M	0,865	29,42	173,872
17	M	0,826	29,343	173,417
18	S	2,218	24,397	144,186
19	S	2,42	24,036	142,053
20	S	2,324	19,85	117,314
21	C	0,735	29,189	172,507
22	C	0,719	29,165	172,365
23	C	0,662	29,086	171,898
24	C	0,71	29,152	172,288
25	C	0,822	29,335	173,370
26	C	2,324	19,85	117,314
27	C	2,401	23,755	140,392
28	C	2,42	24,036	142,053
29	C	0,671	29,098	171,969
30	C	0,682	29,112	172,052

Tabulka 8 koncentrace serotoninu ve vzorcích

č. vzorku	skupina	Absorbance	koncentrace	
			[ng/ml]	koncentrace [nmol/l]
1	M	0,529	18,611	105,524
2	M	0,507	23,721	134,498
3	M	0,568	7,219	40,932
4	M	0,356	3,681	20,871
5	M	0,573	6,699	37,983
6	M	0,583	5,856	33,204
7	M	0,58	6,086	34,508
8	M	0,527	20,309	115,152
9	S	0,398	4,812	27,284
10	S	0,468	11,594	65,738
11	S	0,479	15,511	87,947
12	S	0,513	60,684	344,078
13	S	0,362	3,807	21,586
14	S	0,382	4,297	24,364
15	S	0,585	5,712	32,387
16	M	0,492	26,974	152,943
17	M	0,56	8,242	46,732
18	S	0,437	6,99	39,633
19	S	0,5	53,299	302,205
20	S	0,522	26,412	149,756
21	C	0,496	25,57	144,982
22	C	0,441	7,35	41,675
23	C	0,332	3,275	18,569
24	C	0,369	3,963	22,470
25	C	0,618	4,054	22,986
26	C	0,366	3,895	22,085
27	C	0,654	3,06	17,350
28	C	0,496	35,57	201,682
29	C	0,492	26,974	152,943
30	C	0,602	5,226	29,631