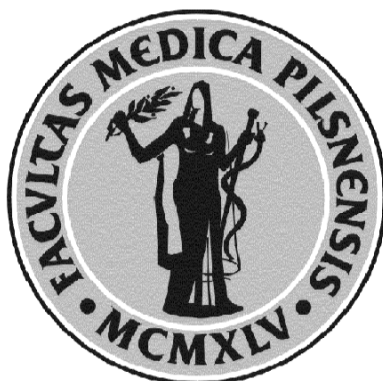


**UNIVERZITA KARLOVA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI**



AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE

**Ústav patologické fyziologie Lékařské fakulty
Univerzity Karlovy v Plzni**

MUDr. Alena Křížková

**MOTORICKÉ A KOGNITIVNÍ DŮSLEDKY
VROZENÉ MOZEČKOVÉ DEGENERACE
A NĚKTERÉ MOŽNOSTI JEJÍHO OVLIVNĚNÍ**

Vědní obor: Fyziologie a patologická fyziologie

Autoreferát disertační práce

Plzeň 2005

Disertační práce byla vypracována v rámci distančního postgraduálního doktorského studia na Ústavu patologické fyziologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni.

Doktorandka:

MUDr. Alena Křížková, Ústav patologické fyziologie LF UK v Plzni.

Školitel:

Doc. MUDr. František Vožeh, CSc., Ústav patologické fyziologie LF UK v Plzni

Oponenti:

Doc. MUDr. Jan Mareš, CSc., Ústav normální, patologické a klinické fyziologie 3. LF UK v Praze

Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc., Ústav fyziologie 1. LF UK v Praze

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba disersertační práce se koná dne _____ před komisí
pro obhajoby disertačních prací doktorandského studia v oboru fyziologie a
patologická fyziologie na Lékařské fakultě UK v Plzni.

Místo konání:

Úvod

Současný stav problematiky

Mozečku je tradičně připisována úloha koordinátora pohybů, rovnováhy a regulátora svalového tonu. Později byla odhalena i účast mozečku na motorickém učení a kognitivních funkcích obecně (Marr, 1969, Albus, 1971, Houk a spol., 1996, Brainesenberga a spol., 1997).

Vhodným modelem pro výzkum degenerace mozečku jsou myši typu Lurcher, u nichž dochází v průběhu života k velkému úbytku Purkyňových buněk, granulárních buněk a neuronů dolní olivy (Caddy a Biscoe, 1979, Wetts a Herrup, 1982 a, b, Carpenter, 1986). Zánik Purkyňových buněk je podmíněn mutací genu pro delta 2 glutamátový receptor na šestém chromozomu (Zuo a spol., 1997). Navzdory ataxii (Thullier a spol., 1997, Fortier a spol., 1987) jsou mutantní myši typu Lurcher schopni motorického učení (Lalonde a spol., 1992, Lalonde, 1994 a, b, Caston a spol., 1995 a, b), avšak nedosahují tak dobrých výsledků jako zdravé kontroly (Lalonde, 1994a,b, 1996 a, b).

Dizocilpin neboli MK-801 patří mezi nekompetitivní antagonisty NMDA. Vliv chronického neonatálního podávání MK-801 na prostorové i neprostorové učení v dospělosti byl intenzivně studován (Mc Lamb a spol., 1990, Gorter a de Bruin, 1992, Tandon a spol., 1996, Greisbach a Amsel, 1998). Někteří autoři uvádějí, že chronická blokáda NMDA receptorů během neonatálního období vede k dlouhotrvajícím poruchám hipokampálních funkcí tedy k poškození učení a paměti (Gorter a de Bruin, 1992), jiní experimentátoři např. Tandon a spol. (1996) nenašli dlouhotrvající účinky na chování zvířat. NMDA antagonismus může zvyšovat neurodestrukci v dospělém mozku podléhajícím neurodegeneraci (Pohl a spol., 1999, Takadera a spol., 1999, Ikonomidou a spol., 2000). Neurotoxický efekt MK-801 je mnohem vážnější v raném postnatálním období. Blokáda NMDA receptorů jen na několik hodin během pozdního fetálního nebo časného neonatálního období spustí rozsáhlou apoptotickou neurodegeneraci ve vyvíjejícím se potkaním mozku (Ikonomidou a spol., 1999).

NO je volný radikál, který může působit jako signální molekula i neurotoxin. Může být syntetizován spolu s L-citrulinem z L-argininu (Knowles a spol., 1989) jednou ze tří isoform NO syntázy (NOS): neuronální NOS (nNOS), endoteliální NOS (eNOS) a inducibilní NOS (iNOS) (Marletta, 1994). NO má vliv na učení a paměť (Medina a Izquiero, 1995). NO donor S-nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) zlepšuje retenci paměti u potkanů (Fin a spol., 1995). Inhibitory NO syntázy (NOS), např. N(G)-nitro-L-arginin metyl ester (L-NAME) nebo 7-nitroindazol (7-NI), poškozují učení a paměť v radiálním bludišti. L-arginin má schopnost zvrátit efekt inhibitorů NOS (Zou a spol., 1998), což podporuje domněnku, že NO pozitivně ovlivňuje učení a paměť (Paul a spol., 2003).

V této práci jsme sledovali:

- vývoj motorického učení a aktuálních motorických dovedností v průběhu 1. měsíce po narození,
- pozitivní a negativní ovlivnění syntézy NO a jeho dopadu na diskriminační učení,
- účinek podávání MK-801 (nekompetitivního antagonisty NMDA receptoru) na diskriminační učení myši typu Lurcher a wild odvozených od dvou kmenů

Materiál a metodiky

Na našem pracovišti chováme myši typu Lurcher a wild kmenů C3H a C57B1/7. Postižení jedinci kmene C3H mívají téměř vždy světlou barvu srsti (+/Lc), zatímco zdraví jedinci (+/+) bývají tmaví, což umožňuje rozlišení obou typů ihned po narození. U kmene C57B1/7 nelze rozlišit postižené a zdravé jedince podle barvy srsti.

Animální model

V našich experimentech jsme pracovali s myšmi typu Lurcher (+/Lc) (jedinci s postižením mozečku) a myšmi typu wild (+/+) (zdraví jedinci) kmene C3H a kmene C57B1/7 z chovu Ústavu patologické fyziologie LF UK v Plzni. Samci myši typu Lurcher (+/Lc) byli kříženi se samicemi wild typu (+/+) téhož kmene. Polovina mláďat pak byla postižena degenerací mozečku (myši typu Lurcher), zatímco druhá polovina byla zdravá (myši typu wild) a sloužila v pokusech jako kontroly. Při křížení samic a samců myši typu Lurcher (+/Lc) část vrhu tvoří homozygoti Lurcher (+/+), kteří však nejsou životaschopní, proto jsme vždy k chovu připouštěli postižené samce (+/Lc) a zdravé samice (+/+), což zaručovalo dobrou péči o mláďata, která byla chována v boxech s matkou. Zvířata byla chována za standardních podmínek: teplota 22 - 23 °C, vlhkost 40-50 %, periody světla a tmy se střídaly po 12 hodinách (6-18-18-6). Potravu myši dostávaly ad libitum.

Pokusy byly prováděny s předchozím souhlasem Etické komise LF UK v Plzni. Byly zachovány všechny etické normy a zákony platné pro práci s laboratorními zvířaty.

Použité látky a roztoky

Byl použit L-arginin v dávce 20 mg/kg subkutánně (s.c.) a L-NAME v dávce 20 mg/kg s.c., MK-801 v dávce 0,25 mg/kg s.c. a jako kontrola fyziologický roztok s.c.

Metodiky

Motorické učení

Pro hodnocení motorického učení se užívá několika metodik, umožňujících rozpoznat různé postižení motoriky (Barnett, 1964, Lalonde a spol., 1995, Joyal a spol., 1996, Lalonde a spol., 1996 a, b, Marec a Lalonde, 1997).

Hrazda

Hodnotí se schopnost zvířete setrvat na malé hrazdě (průměr drátu 1 mm, výška 40 cm), na kterou se zavěsí tak, aby se chytlo předními končetinami. Zvíře je úspěšné (splní kritérium), pokud se udrží na náradí po dobu jedné minuty.

Rotující válec (rotorod)

Hodnotí se schopnost zvířete udržet se na pomalu se otáčejícím válci (průměr 15 cm, délka 20 cm, rychlost 1 otáčka/minuta).

Pokus má tři modifikace:

- I myš se umístí na válec hlavou ve směru pohybu válce
- II myš se umístí na válec hlavou proti směru pohybu válce
- III myš se umístí napříč válcem

V každé pozici splní zvíře kritérium, když se udrží na válci 1 minutu.

Lávka

Hodnotí se schopnost zvířete stát či chodit po malé úzké lávce. Myš se umístí do středu lávky (výška 40 cm, délka 30 cm, šířka 2 cm).

Kritérium úspěšnosti je setrvat na lávce 2 minuty.

Žebřík

Hodnotí se schopnost zvířete stát nebo šplhat po žebříku (délka 35 cm, šířka 4 cm, průměr příček žebříku 4 mm, vzdálenost mezi příčkami 1 cm, úhel sklonu 60 stupňů). Myš se umístí do středu jeho délky.

Pokus má tři modifikace :

- I myš se umístí na žebřík hlavou nahoru
- II myš se umístí na žebřík hlavou dolů
- III myš se umístí napříč žebříkem

Kritérium úspěšnosti je udržet se na žebříku 1 minutu v každé pozici.

U všech testů motorického učení byla pod každým náradím položena měkká pokrývka, která tlumila případné pády myši.

U metodik rotující válec a žebřík jsme používali tři variant pokusů, čímž jsme dosáhli různých úrovní náročnosti, což platí zejména pro neurodeficientní myši. Každé zvíře absolvovalo všechny testy v pořadí: hrazda, rotující válec I, rotující

válec II, rotující válec III, lávka, žebřík I, žebřík II, žebřík III. Mezi jednotlivými testy mělo každé zvíře oddechovou přestávku 30-40 s. Testy byly prováděny ráno, vždy ve stejném čase.

Diskriminační učení typu inhibiční reakce pasivní avoidance

Pro výzkum inhibiční reakce pasivní avoidance myši a potkanů byly vyvinuty metodiky step through a step down (Mysliveček, 1990, Mysliveček a Hassmannová, 1990, Mysliveček a Hassmannová, 1991).

Step through

Tato metodika je určena pro sledování učení ještě slepých mláďat myši a potkanů. Mláďe je umístěno do experimentálního boxu o rozměrech 130 x 90 x 130 mm a vystaveno proudu studeného vzduchu, před kterým se snaží uniknout do druhé části prostoru. Poté, co se zvíře naučí ve třech po sobě následujících pokusech unikat do druhé části boxu, je v další fázi experimentu do podlahy této části boxu zapojen přívod elektrického proudu (0,5 mA, 1 Hz, trvání 0,2 s). Zvíře se pak zpravidla naučí zůstat v první, chladnější části boxu. Ze dvou nepříjemných podnětů tedy volí ten nebolestivý. Myš splní kritérium, pokud zůstane dvakrát za sebou 60 s mimo elektrickou mřížku (splní první a druhé kritérium). Za 24 hodin je pokus opakován, aby se zjistila paměťová retence.

Během pokusu dochází k těmto situacím:

1. Mláďe zpočátku téměř vždy vlez na elektrifikovanou podlahu, kde je vystaveno bolestivé stimulaci. Pokud se zvíře nevrátí během 10 s z elektrifikované části, je odtud vyjmuto a drženo 30 s mimo box a poté je pokus opakován (zahájeno další sezení).
2. V další fázi dochází u mláďete k vytváření paměťové stopy v souvislosti s bolestivými podněty. Zvíře se pohybuje směrem na elektrifikovanou podlahu a pak se vrací zpět, což se různě dlouho opakuje.
3. Třetí fáze je charakterizována již vytvořenou paměťovou stopou. Mláďe se pasivně vyhýbá bolestivému podnětu tím, že neopouští bezpečnou podlahu, kde je pouze excitováno vzduchem.

Pokusy jsou ukončeny, pokud zvíře zůstane mimo elektrický rošt dvakrát 60 s - nikoli ihned po sobě- (dvě sezení) a nebo po desátém sezení, kdy je vyhodnoceno jako neschopné se to naučit.

Pro hodnocení učení je rozhodující počet nutných spojů **N** (čili počet sezení se zapojenou elektrifikovanou podlahou) do dosažení kritéria (tedy dvakrát preferovat bezpečnou podlahu a zůstat na ní).

K hodnocení paměti se používá retenční index: $RI = (n_1 - n_r) / n_1$, kde n_1 je počet nutných spojů do splnění kritéria během učení a n_r počet nutných spojů do splnění kritéria během testování paměti.

RI=1 znamená úplnou paměť, RI<1>0 neúplnou paměť, RI=0 žádnou paměť.

Step down

Step down metodika se užívá u starších, již vidících zvířat. Podlážku pokusného boxu o rozměrech: 220 x 250 x 190 mm tvoří elektrická mřížka (elektrický proud – 1,5 mA, frekvence stimulace 1 Hz, trvání stimulace 0,5 s). Myš se umístí dovnitř na úzkou lavičku vzdálenou od podlážky boxu 5 mm. Velikost lavičky se liší podle věku a velikosti pokusného zvířete, nesmí však být pro zvíře příliš pohodlná. To je důvodem, že myš z lavičky obvykle seskočí, avšak bolestivá stimulace ji přinutí vrátit se zpět. Myš splní kritérium, pokud setrvá na lavičce po dobu 100 s. Za 24 h se provádí test paměťové retence.

Hodnotili jsme tyto parametry:

1. doba latence do prvního sestupu z bezpečné lavičky
2. počet sestupů do dosažení kritéria
3. čas do dosažení kritéria
4. doba nociceptivní stimulace (jak dlouho byla myš na elektrické mřížce)

Pracovní postupy:

Pokus č.1

V našich pokusech jsme použili celkem 150 zvířat obou pohlaví. Polovinu tvořily myši typu Lurcher (+/Lc), zbytek myši typu wild(+/+) kmene C3H. Patnáct zvířat každého typu bylo podrobeno úkolům motorického učení pouze v 15., 20., 25. nebo 30. dnu PŽ bez předchozího tréninku (celkem 120 myší). Ostatní myši – typu Lurcher a zdravé kontroly (15 +/Lc a 15 +/+) byly trénovány ve všech metodikách motorického učení ve 3., 6., 9., 12., 15., 20., 25., 30. dnu PŽ. Výsledky trénovaných jedinců z 15., 20., 25. a 30. dne PŽ byly srovnány s výsledky netrénovaných myší stejného stáří a typu (Lurcher nebo wild). Testy byly prováděny ve stanoveném pořadí: hrazda, rotující válec I, rotující válec II, rotující válec III, lávka, žebřík I, žebřík II, žebřík III, vždy ráno v 7 hodin. Mezi jednotlivými testy byly přestávky 30-40 s, aby sledované zvíře mělo možnost oddechu. V našem chovu jsou neurodegenerativní změny téměř vždy spojeny s se světlou barvou kůže a srsti zvířete, což umožnilo rozlišit budoucí zdravé a postižené jedince (tedy Lurcher a wild). Studentův t-test a Chi kvadrátový test byly použity k statistickému vyhodnocení a srovnání výkonů trénovaných a netrénovaných myší (Lurcher i wild) v jednotlivých metodikách.

Pokus č.2

Byly vytvořeny skupiny myší o 15 jedincích stejného typu (wild nebo Lurcher) kmene C3H, kterým byl od 2. do 12. dne PŽ každý druhý den podáván buď nespecifický inhibitor NOS L-NAME nebo donor NO L-arginin v dávce 20 mg/kg subkutánně (vždy v 9 hodin ráno). Kontrolám byl ve stejných dnech subkutánně podáván fyziologický roztok. U všech zvířat bylo sledováno diskriminační učení typu inhibiční reakce pasivní avoidance – ve 3., 4., 6. a 7.

dnu PŽ metodou „step through“, v 15. ,16., 20. a 21.dnu PŽ metodou „step down“ (vždy v 7 hodin ráno). Výsledky byly statisticky zpracovány Studentovým t-testem.

Pokus č.3

Čtyřem skupinám myší wild (+/+) a Lurcher (+/Lc) kmenů C3H a C57B1/7 o 10 jedincích v každé z nich byl každý druhý den, počínaje 2. a konče 14. dnem aplikován subkutánně buď nekompetitivní antagonist NMDA MK-801 (0,25mg/kg) a nebo fyziologický roztok vždy v 9 hodin ráno. Zvířata byla podrobena metodikám diskriminačního učení typu „step through“ (v 6. a 7. dni PŽ) a „step down“ (v 15. a 16.dnu PŽ) vždy v 7 hodin ráno. Výsledky byly statisticky zpracovány Studentovým t-testem.

Výsledky:

Pokus č.1

Myši typu Lurcher

15. den postnatálního života

V 15. dnu PŽ byli trénovaní jedinci úspěšnější v metodice rotující válec III ($p < 0,05$). V metodikách rotující válec II, lávka a žebřík I byly rozdíly na hranici statistické významnosti.

20.den postnatálního života

Ve 20. dnu PŽ byly výkony trénovaných zvířat lepší jen v metodice lávka ($p < 0,05$). V ostatních metodikách byly úspěšnější netrénovaní jedinci (žebřík II $p < 0,05$, žebřík III $p < 0,01$, hrazda, rotující válec II a III opět na hranici statistické významnosti).

25. den postnatálního života

Ve 25. dnu PŽ byla trénovaná zvířata úspěšnější v metodice hrazda ($p < 0,01$) a rotující válec I ($p < 0,01$). V ostatních disciplínách byly buď výkony obou skupin vyrovnané anebo byla úspěšnější netrénovaná zvířata (žebřík II a III, $p < 0,05$).

30. den postnatálního života

V 30. dnu PŽ trénovaní jedinci byli signifikantně lepší než netrénovaní v metodikách rotující válec ($p < 0,05$) a žebřík III ($p < 0,01$). V metodikách hrazda, rotující válec I, III a žebřík II byly rozdíly na hranici statistické významnosti.

Myši typu wild

15. den postnatálního života

V 15. dnu PŽ byly trénované myši signifikantně úspěšnější ve čtyřech testech: rotující válec I a II ($p < 0,01$), rotující válec III ($p < 0,001$) a lávka ($p < 0,01$). Nesignifikantní rozdíly mezi trénovanými a netrénovanými byly nalezeny v metodice hrazda a všech variantách metodiky žebřík.

20. den postnatálního života

Ve 20. dnu PŽ byly myši obou skupin 100 % úspěšné v metodice lávka. Trénované myši podaly lepší výkony v metodice rotující válec III ($p < 0,01$). Nesignifikantní rozdíly byly zjištěny v metodikách hrazda, rotující válec I a žebřík III. V ostatních disciplínách byla úspěšnější netrénovaná zvířata (žebřík I $p < 0,05$, žebřík II $p < 0,05$, rotující válec na hranici statistické významnosti).

25. den postnatálního života

V 25. dnu PŽ byla zvířata obou skupin 100 % úspěšná v metodikách lávka a žebřík I. V ostatních testech trénovaná zvířata byla úspěšnější v metodikách rotující válec III ($p < 0,05$) a rotující válec I (na hranici statistické významnosti). Netrénovaní jedinci byli lepší než trénovaní v metodikách žebřík II ($p < 0,0001$) a žebřík III ($p < 0,05$). Výsledky ostatních disciplín neukázaly výrazné rozdíly mezi oběma skupinami (hrazda, rotující válec).

30. den postnatálního života

Ve 30. dnu PŽ byly všechny myši úspěšné v metodice lávka. V ostatních disciplínách byly trénované myši také 100 % úspěšné. V pěti metodikách byla trénovaná zvířata signifikantně lepší než netrénovaná (hrazda $p < 0,01$, rotující válec I, II, III, žebřík II $p < 0,05$).

Pokus č.2

Myši typu Lurcher (+/Lc)

Podávání L-argininu vedlo k zhoršení učení těchto myší ve srovnání s kontrolami v metodice step through v dosahování 1. kritéria ve 4. dnu PŽ ($p < 0,001$) a v 6. a 7. dnu PŽ ($p < 0,05$). V metodice step down byly u jedinců ovlivňovaných L-argininem pozorovány naopak lepší výsledky než u kontrol s fyziologickým roztokem ovšem jen na hranici statistické významnosti.

Podávání L-NAME myším typu Lurcher vedlo v metodice step through v 4. dnu PŽ k signifikantnímu zhoršení průběhu učení oproti kontrolám s fyziologickým roztokem v dosahování 1. kritéria ($p < 0,001$) a na hranici statistické významnosti v dosahování 2. kritéria. V 6. a 7. dnu PŽ jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly mezi skupinou ovlivňovanou L-NAME a skupinou kontrolní.

V metodice step down v 16., 20. a 21. dnu PŽ se ukázaly jako úspěšnější myši s podávaným L-NAME oproti kontrolám s podávaným fyziologickým roztokem ovšem jen na hranici statistické významnosti.

Myši typu wild (+/+)

U těchto zdravých zvířat byla v metodice step through úspěšnější v dosahování ve 3. dnu PŽ kontrolní zvířata oproti myším ovlivňovaným L-argininem (1. kritérium $p < 0,05$, 2. kritérium na hranici statistické významnosti). V 6. a 7.dnu PŽ jsme nenašli signifikantní rozdíly mezi skupinou ovlivňovanou L-argininem a skupinou s fyziologickým roztokem. V metodice step down dosáhly v 16. a 20. dnu PŽ lepších výkonů kontrolní zvířata oproti jedincům s podávaným L-argininem ovšem jen na hranici statistické významnosti. Další statisticky významné rozdíly nebyly nalezeny.

Myši typu wild s podávaným L-NAME byly ve 4. dnu PŽ v dosahování 2. kritéria signifikantně úspěšnější než kontroly s fyziologickým roztokem ($p < 0,001$). V metodice step down naopak jedinci ovlivňovaní L-NAME dosahovali horších výsledků než kontrolní zvířata (v 15. dnu PŽ $p < 0,05$, v 16. a 20. dnu PŽ na hranici statistické významnosti). Další statisticky významné rozdíly jsme nezaznamenali.

Pokus č.3

Myši typu Lurcher (+/Lc), kmen C3H

V 6. dnu PŽ v metodice step through byly úspěšnější v dosahování 2. kritéria myši ovlivňované MK-801 než kontrolní zvířata jen na hranici statistické významnosti. V ostatních případech nebyly rozdíly statisticky významné.

Myši typu wild (+/+), kmen C3H

Rozdíly ve výkonech myši ovlivňovaných MK-801 a kontrolních myši, které dostávaly fyziologický roztok se v obou metodikách (step through a step down) se ukázaly jako statisticky nevýznamné.

Myši typu Lurcher (+/Lc), kmen C57B1/7

V metodice step through byly úspěšnější v 6. dnu PŽ v dosahování 2. kritéria myši ovlivňované MK-801 ($p < 0,05$). V 7. dnu PŽ (paměťová retence) byly v dosahování 1. i 2. kritéria úspěšnější kontrolní myši s podávaným fyziologickým roztokem ($p < 0,05$). V metodice step down byly rozdíly v 15. dnu PŽ statisticky nevýznamné, v 16. dnu dosahovala lepších výkonů zvířata ovlivňovaná MK-801 (ovšem jen na hranici statistické významnosti).

Myši typu wild (+/+), kmen C57B1/7

V metodice step through jsme nezaznamenali žádné statisticky významné rozdíly mezi jedinci ovlivňovanými MK-801 a kontrolami.

V metodice step down byly úspěšnější v dosahování kritéria myši ovlivňované MK-801 oproti kontrolním myším s podávaným fyziologickým roztokem (v 15. dnu PŽ $p < 0,05$, v 16. dnu PŽ na hranici statistické významnosti).

Srovnání myší typů Lurcher kmenů C3H a C57B1/7

V metodice step through v 7. dnu PŽ byla v dosahování 1. a 2. kritéria úspěšnější skupina myší kmene C57B1/7 ($p < 0,001$). V metodice step down nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi oběma kmeny.

Srovnání myší typu wild kmenů C3H a C57B1/7

V metodice step through v dosahování 1. i 2. kritéria byly úspěšnější v 7. dnu PŽ myši kmene C57B1/7 (1. kritérium $p < 0,01$, 2. kritérium $p < 0,001$). V metodice step down v 15. dnu PŽ byly rozdíly statisticky nevýznamné, v 16. dnu PŽ dosahovaly lepších výkonů myši kmene C3H ($p < 0,01$).

Diskuse

Naše výsledky ukazují, že netréované i trénované myši typu Lurcher většinou nikdy nedosáhnou tak dobrých výsledků jako myši typu wild, které jsou signifikantně lepší v naprosté většině testů. Paradoxně horší výsledky byly nalezeny u trénovaných zvířat obou typů ve 20. dnu PŽ (signifikantně na žebříku II, III u +/Lc a žebříku I a II, u +/+, na hrazdě a rotujícím válci II a III u +/Lc a rotujícím válci II u +/+ - tyto rozdíly jsou na hranici statistické významnosti) a stále byly horší v 25. dnu PŽ (žebřík II a III u +/Lc a +/+), což bylo nepochybně způsobeno relativně častým a intenzivním tréninkem (každý třetí den prvních patnáct dnů). Příznivý efekt tréninku byl tudíž patrný jen v 15. dnu PŽ, kdy se ještě neuplatnil „overtraining reversal effect“ (ORE) a v 30. dnu PŽ, kdy byly delší intervaly mezi sezeními (přibližně každý pátý den v druhé polovině pokusu) a kdy jsme ORE již nepozorovali. Vysvětlení mechanismu, který vede k zhoršení výsledků motorického učení u myší typu Lurcher i myší typu wild v důsledku častého tréninku, nebylo dosud popsáno a tudíž ani vysvětleno. Nicméně podle našeho mínění je nutné uvést zde následující tři hypotézy:

- 1) nedostatečná motivace - trénované myši obou typů (+/Lc a +/+) v průběhu pokusu padaly z malé výšky na měkkou pokrývku stolu. Pády byly nebolestivé, takže mohly vést ztrátě motivace udržet se na náradí.
- 2) habituace mezi sezeními – podle této hypotézy proces „intersession habituation“ vede k paradoxnímu přechodnému zhoršení výsledků u často trénovaných zvířat obou typů. Na rozdíl od Lalondeho a spolupracovníků (Lalonde a spol., 1996 a), kteří popsali „intersession habituation“ u myší typu Lurcher kmene B6CBACa/A w-J ale ne u zdravých kontrolních myší, my jsme rozdíl v „intersession habituation“ mezi myšmi typu Lurcher a myšmi typu wild kmene C3H nepozorovali.
- 3) analogie ORE je známý již mnoho let. Byl pozorován hlavně v diskriminačním učení, kde nadbytečný trénink urychluje opačné učení (Reid, 1953, Richman a spol., 1972). V poslední době byla objevena důležitá úloha basálních ganglií, zvláště dopaminergních neuronů dorsálního striata v mechanismu asociativního sensorického chování, tak ORE (Van Golf Racht-Delatour a Massiou, 2000). Bylo také pozorováno zlepšení některých motorických funkcí po intraperitoneálním podání L-dopy/carbidopy, dopaminového prekurzoru u myší typu Lurcher kmene B6CBACa/A w-J (Thullier a spol., 1997, 1999). Dále byl prokázán rozdílný účinek SCH 23390, antagonisty D1 dopaminového receptoru, na prostorové učení u dvou kmenů Lurcher mutantů (C3H a C57B1/7) (Cendelin a Vožeh, 2001). Tyto rozdíly v dopaminergních funkcích mohou, jak se zdá, vysvětlovat některé odlišnosti mezi zdravými a neurodefektními zvířaty. V našich experimentech jsme však nezjistili podstatné rozdíly mezi myšmi typu Lurcher a myšmi typu wild v reakci na „overtraining“.

Ukázala se také rozdílná úroveň obtížnosti jednotlivých specifických testů a jejich variant, hlavně u myši typu Lurcher. Například v metodice látka jsme zjišťovali poškození schopnosti udržování rovnováhy, kdy ve 30. dnu PŽ byla v této metodice úspěšnost netréovaných jedinců typu Lurcher 30 % a trénovaných 40 %, zatímco myši typu wild prokázaly 100 % úspěšnost v obou skupinách (trénování i trénování). Tyto výsledky jenom částečně korespondují s výkony mladých dospělých myši typu Lurcher (odvozenými od kmene B6CBACa/A w-J). Tato zvířata dosahovala špatných výsledků v některých testech (věšák, vertikální mřížka), zatímco na dřevěném břevnu (látce) se nenašly rozdíly ve srovnání s normálními kontrolami (Lalonde, 1992).

Nejvýznamnější výsledky jsme získali v našich pokusech u metodik rotující válec a žebřík, kde různé startovní pozice zvířat (tři varianty v každé metodě) hrají důležitou úlohu hlavně u netréovaných myši typu Lurcher, protože jejich neurodefekt jim neumožňuje se rychle vypořádat s nově vzniklou situací a tudíž dochází k častým pádům. Progresivní mozečková degenerace patrně způsobuje signifikantně horší aktuální sensorimotorickou odpověď na změnu startovní pozice. Nicméně mutanti typu Lurcher jsou schopni učit se a do jisté míry zlepšovat své motorické výkony během prvního měsíce života, ačkoli v tomto měsíci dochází k rozvoji jejich neurodeficitu. Ve 30. dnu PŽ myši typu Lurcher prokázaly relativně větší schopnost učení než zdravé myši. Zlepšení představovalo průměrně 36 % u myši typu Lurcher a 18 % u myši typu wild, když jsme srovnali průměrné výkony trénovaných a netréovaných myši obou typů. Naše výsledky vývoje raného motorického učení společně s pozorováními Lalondeho a spolupracovníků (Lalonde, 1994 a, b, Lalonde a spol., 1996 a, b, Lalonde 1998) podporují hypotézu o účasti mozečku na motorickém učení, ale na druhé straně dochází k aktivaci mechanismů, které se snaží kompenzovat vzniklý neurodefekt (Křížková a Vožeh, 2004).

Ovlivňování L-argininem vedlo v metodice step through u **myši typu Lurcher** k horšímu dosahování 1. kritéria v 4. dnu PŽ ($p < 0,001$) a 6. a 7. dnu PŽ ($p < 0,05$). V metodice step down u jedinců s podávaným L-argininem jsme naopak pozorovali větší úspěšnost ale pouze na hranici statistické významnosti.

U **myši typu wild** jsme v metodice step through zachytili ve 3. dnu PŽ v dosahování 1. kritéria lepší výkony kontrolních jedinců ($p < 0,05$). V metodice step down jsme u myši typu wild v 16. a 20. dnu PŽ zaznamenali lepší výkony u kontrolní skupiny s podávaným fyziologickým roztokem než u myši ovlivňovaných L-argininem ale jen na hranici statistické významnosti.

Můžeme tedy konstatovat, že L-arginin v podávaném množství 20 mg/kg v našich pokusech neměl výrazný pozitivní efekt na učení, dokonce jsme zachytili negativní vliv L-argininu hlavně v raném učení (metodika step through – 3., 4., 16. den PŽ). Jiní autoři naopak našli pozitivní efekt L-argininu na učení. Plech a spol. (2003) zjistili prodlouženou latenci v testu pasivní avoidance (při podání 0,1 mg/kg L-argininu s.c. potkanům kmene Wistar), což svědčí pro to, že L-arginin zlepšuje učení a konsolidaci paměti. L-arginin

zvyšuje koncentrace NO v mozku pokusných zvířat (Rajasekaran a Paul, 1999, Paul a Subramanian, 2002), čímž zvyšuje schopnost učení potkanů. Účinek na učení je závislý na dávce L-argininu. Studie Reddyho a spolupracovníků (Reddy a spol., 2002) také podporuje názor, že zvýšení hladiny NO v mozku pozitivně zasahuje do procesů učení a paměti. Telegdy a Kokavszky (1997) zaznamenali po podání L-argininu ivc potkanům prodloužení latence pasivní avoidance závislé na dávce, avšak nenalezli zlepšení paměti.

Naše výsledky podporují nálezy z prostorového učení potkanů. V Morrisově vodním bludišti bylo u potkanů pozorováno signifikantní zhoršení v hledání skrytého ostrůvku po podání nespecifického inhibitoru L-NAME (50mg/kg). Toto zhoršení lze vyrušit současným podáním L-argininu (32,3 mg/kg). Samotné podání L-argininu nemělo statisticky významné účinky na prostorové učení v Morrisově vodním bludišti (Majlessi a spol., 2003). Odlišné výsledky jednotlivých autorů mohou být dány dávkou, rozdílným druhem učení a v našem případě i druhem zvířete (myši kmene C3H oproti nejčastěji sledovaným potkanům kmene Wistar albino).

V metodice step through u **myši typu Lurcher** L-NAME signifikantně zhoršil průběh učení ve 4. dnu PŽ v dosažení 1. kritéria ($p < 0,001$) a na hranici statistické významnosti v dosažení 2. kritéria. Jde nejspíše o akutní působení na synaptické děje před nástupem degenerace. V metodice step down L-NAME naopak zlepšil retenci paměti u **myši typu Lurcher** v 16. a 21. dnu PŽ a učení ve 20. dnu PŽ v porovnání s fyziologickým roztokem (na hranici statistické významnosti), což může svědčit o zpomalení postupu degenerace.

U **myši typu wild** v metodice step through byly v dosažení 2. kritéria ve 4. dnu PŽ signifikantně úspěšnější myši ovlivňované L-NAME ve srovnání s kontrolami ($p < 0,001$). V metodice step down byli naopak úspěšnější jedinci s fyziologickým roztokem než kontroly (v 15. dnu PŽ $p < 0,05$, v 16. a 20. dnu PŽ na hranici statistické významnosti).

Naše nálezy tak jen částečně podporují zjištění Qianga a spol. (1997), že ivc injekce L-NAME 30 minut před každým tréninkem poškozuje učení a paměť laboratorních potkanů v testu pasivní avoidance a v Morrisově vodním bludišti. Další autoři také popisují zhoršení prostorového učení po podání inhibitorů NOS v Morrisově vodním bludišti (Chapman a spol., 1992, Mogensen a spol., 1995, Noda a spol., 1997, Prendergast a spol., 1997, Majlessi a spol., 2003) a v bludišti s radiálními rameny (Bohme a spol., 1993, Yamada a spol., 1995, Noda a spol., 1997).

K odlišným závěrům došli Prickaerts a spolupracovníci (1998), kteří podávali L-NAME 25 mg/kg s.c. ode dne narození až do 24. dne PŽ zdravým potkanům. Zjistili, že aplikace L-NAME neovlivnila chování zvířat ve volném poli ani prostorové učení a test aktivní avoidance oproti kontrolám s fyziologickým roztokem. Inhibice NO podle těchto autorů ovlivňuje během vývoje především krátkodobé nekognitivní chování, ale nemá vliv na chování a funkci mozku v dalším životě. Většina výzkumníků se shoduje na tom, že L-NAME má vliv na

zhoršení učení, avšak ne na dlouhodobou paměť (retenci) (Bannerman a spol., 1994, Noda a spol., 1997, Borowicz, 1998).

Du a Harvey (1996) sledovali zlepšení asociativního učení u králíků a to bez účinků na kardiovaskulární systém. Došli k opačným výsledkům než Chapman a spol., kteří např. srovnávali králíky s L-NAME s kontrolní skupinou zvířat užívajících D-NAME a podávali látky intravenózně, což zvíře stresuje a vede k nárůstu krevního tlaku. Du a Harvey (1996) používali jako kontrolní skupinu zvířat s fyziologickým roztokem a L-NAME i fyziologický roztok podávali intraperitoneálně. Toto šetrnější podání nevede k hypertenzi.

Z našich výsledků vyplývá, že L-NAME u myši typu Lurcher zhoršuje průběh učení pouze v raném věku (4. den PŽ). Zlepšení v 16., 20. a 21. dnu PŽ lze vyložit jako zpomalení procesu degenerace působením L-NAME.

L-NAME tedy jak se zdá, odlišně působí na myši zdravé a na jedince s vrozenou degenerací cerebela.

Podávání MK-801 **myším typu Lurcher kmene C3H** nepřineslo statisticky významné rozdíly ve srovnání s kontrolami s aplikovaným fyziologickým roztokem. Zaznamenali jsme sice lepší výkony myši s podávaným MK-801 oproti kontrolám v dosahování 2. kritéria v 6. dnu PŽ v metodice step through ale jen na hranici statistické významnosti.

K ovlivnění chování podáváním MK-801 nedošlo ani u **myši typu wild kmene C3H**. Statisticky významné rozdíly mezi zvířaty ovlivňovanými MK-801 a kontrolami jsme nezaznamenali.

K odlišným výsledkům jsme došli při sledování **myši kmene C57B1/7**. U **myši typu Lurcher kmene C57B1/7** v metodice step through byla zvířata ovlivňovaná MK-801 úspěšnější v 6. dnu PŽ v dosahování 2. kritéria ($p < 0,05$) než kontroly s fyziologickým roztokem. Při sledování retence paměti v 7. dnu PŽ však myši s podávaným MK-801 dosahovaly horších výsledků než kontrolní zvířata ($p < 0,05$) v prvním i v druhém kritériu. Nekompetitivní antagonist NMDA MK-801 tedy výrazně zhoršil retenci paměti v 7. dnu PŽ, čímž částečně potvrdil nálezy Yamady a spolupracovníků (Yamada a spol., 1996 a), že MK-801 zhoršuje učení pasivního vyhnutí u myši. Toto zhoršení je přímo závislé na množství cyklického GMP. Podání S-nitorso-N-acetylpenicillaminu, zdroje NO vede k úplné inhibici zhoršení učení vyvolané MK-801. Postižení vyvolané MK-801 lze rovněž zmenšit přidáním dibutyryl cyklického GMP. N-metyl-D-aspartátové receptory tedy hrají důležitou úlohu v procesu učení a paměti. MK-801 však vede k snížení cyklického GMP pouze v mozečku a nikoli v hipokampu jako L-NAME (Yamada a spol., 1996 b).

V metodice step down jsme zaznamenali lepší výkony pouze v 16. dnu PŽ u myši ovlivňovaných MK-801 oproti kontrolním zvířatům ovšem jen na hranici statistické významnosti. Nezaznamenali jsme tudíž déletrvající vliv MK-801 na učení a paměť jako Gorter a de Bruin (1992) (v 120. až 140. dnu PŽ našli horší výkony ve vodním bludišti u potkanů kmene Wistar, kterým byl od 8. do 19. dne PŽ dvakrát denně podáván MK-801 v dávce 0,25 mg/kg s.c.). Potvrdili

jsme spíše nálezy autorů, kteří nenašli dlouhotrvající účinky MK-801 na paměť (Tandon a spol., 1996).

U **myši typu wild kmene C57B1/7** jsme v metodice step through nezachytili žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinou zvířat s podávaným MK-801 a skupinou kontrolní.

V metodice step down u **myši typu wild kmene C57B1/7** byla úspěšnější v 15. dnu PŽ zvířata ovlivňovaná MK-801 oproti kontrolám ($p < 0,05$). MK-801 tedy v pozdějším období (15., 16. den PŽ) má spíše pozitivní vliv na učení a to jak u myši Lurcher, tak u myši typu wild kmene C57B1/7.

Naše výsledky nás vedou k hypotéze, že myši typu Lurcher kmene C57B1/7 jsou citlivější v raném období k vlivu MK-801 na paměť, což lze vysvětlit méněcenností mozečkových buněk, které v průběhu života zanikají apoptózou. Po podání 3-acetylpyridinu dochází k zániku neuronů dolní olivy mláďat i mladých dospělých myši typu Lurcher, na myši typu wild 3-acetylpyridin vliv nemá (Caddy a Vožeh, 1997, Vožeh a spol., 1998). Rovněž u MK-801 byl prokázán vliv na programovanou smrt buněk ve smyslu urychlení apoptózy (Pohl a spol., 1999, Takadara a spol., 1999, Ikonamidou a spol., 2000). Ikonamidou se spolupracovníky (1996) podával mláďatům potkanů sedm dní po narození intraperitoneálně MK-801 v dávce 1mg/kg nebo 5 mg/kg 30 nebo 60 min před mozkovou kontuzí vyvolanou ocelovým válcem (délka 40 cm). Oproti kontrolám byl rozsah poškození mozku u potkanů s podávaným MK-801 menší. Při excitotoxickém poškození buněk má tedy MK-801 naopak neuroprotektivní účinky.

Z našich výsledků jasně vyplývají rozdílné účinky MK-801 na oba kmene (C3H a C57B1/7). Myši kmene C3H se v dávkách námi podávaných (0,25 mg/kg) jeví jako necitlivé k MK-801. Zkoušeli jsme zvířatům kmene C3H podávat vyšší dávky MK-801, ale sledovaní jedinci pak byli velmi spaví, málo přijímali potravu a jejich hmotnost se snižovala. Tato zvířata pak nebylo možno zařadit do experimentů.

Myši typu Lurcher kmene C57B1/7 se ukázaly k podávanému nekompetitivnímu inhibitoru NMDA MK-801 citlivé v raném učení v metodice step through, kde jsme zaznamenali zhoršení retence paměti v 7. dnu PŽ. U myši typu wild kmene C57B1/7 jsme zjistili statisticky významné rozdíly pouze v metodice step down v 15. dnu PŽ a to ve prospěch zvířat ovlivňovaných MK-801 oproti kontrolám. Zdali šlo o pozitivní účinek MK-801 ve smyslu neuroprotektce zdravých buněk před případnými negativními vlivy okolí je otázkou.

Srovnáváním výkonů kontrolních myši kmenů C3H a C57B1/7 se ukázalo, že myši kmene C57B1/7 mají výrazně lepší výsledky v retenci paměti v metodice step through (7. den PŽ). U myši typu wild byl tento rozdíl v dosahování 1. kritéria na hladině statistické významnosti $p < 0,01$ a 2. kritéria $p < 0,001$. U myši typu Lurcher byl tento rozdíl dokonce $p < 0,001$ u 1. i 2. kritéria.

V metodice step down nebyly dosažené výsledky tak jednoznačné. U myši typu Lurcher nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi oběma kmeny. U myši typu wild dosáhla lepších výsledků v retenci paměti (16. den PŽ) zvířata kmene C3H ($p < 0,01$).

Myši kmene C57B1/7 jsou tedy mnohem úspěšnější v raném učení metodice step through, což můžeme vysvětlit patrně rychlejším rozvojem nervového systému u zvířat tohoto kmene. Rychle se rozvíjející nervový systém je však v raném období také zranitelnější – citlivější k subkutánnímu podávání MK-801. V období 15. a 16. dne jsme již pozorovali zmenšování rozdílů mezi oběma kmeny. U myši typu wild v 16. dnu PŽ se dokonce jeví jako jedinci s lepší pamětí zvířata kmene C3H než kmene C57B1/7.

Závěry

Snaha o ovlivnění nervových funkcí u animálního modelu OPCA v raném postnatálním období tréninkem či podáváním přesně definovaných neuroaktivních látek lze charakterizovat takto:

1. Motorický trénink je schopen pozitivně ovlivnit vývoj motorických dovedností jak u zdravých jedinců, tak překvapivě výrazně u zvířat s vrozeným neurodefektem a to i přes jejich trvalý hendikep.
2. Látkové ovlivnění v dávkách námi sledovaných není jednoznačné a v případě, kdy může jít o ovlivnění rozvoje neurodegenerace je patrný odlišný účinek u zvířat zdravých a postižených.
3. Vedle rozdílů, které jsou důsledkem neurodegenerace, je třeba vzít v úvahu i kmen zvířat. Kmenové charakteristiky mohou být tak rozdílné, že významně modifikují i důsledky stejného neurodefektu.

Souhrn

Motorické a kognitivní důsledky vrozené mozečkové degenerace a některé možnosti jejího ovlivnění

Mozečku je tradičně připisována úloha koordinátora pohybů, rovnováhy a regulátoru svalového tonu. Později byla odhalena i účast mozečku na motorickém učení. V posledních letech navíc roste počet experimentálních a klinických důkazů o participaci cerebela na kognitivních funkcích obecně.

Z experimentálních prací zejména pokusy na zvířatech prokazují vliv mozečku na různé typy učení a paměti. Vhodným modelem pro výzkum degenerace mozečku jsou myši typu Lurcher, u nichž v průběhu života dochází k progresivnímu zániku Purkyňových buněk s následným úbytkem granulárních buněk a neuronů dolní olivy.

V této práci jsme sledovali:

- vývoj motorického učení a aktuálních motorických dovedností v průběhu 1. měsíce po narození,
- pozitivní a negativní ovlivnění syntézy NO a jeho dopadu na diskriminační učení,
- účinek podávání MK-801 (nekompetitivního antagonisty NMDA receptoru) na diskriminační učení myši typu Lurcher a wild odvozených od dvou kmenů.

Myši typu Lurcher a wild byly podrobeny testům motorické dovednosti ve 4 metodikách jednorázově v 15., 20., 25. nebo 30. dnu postnatálního života (PŽ) a jejich výkony porovnány s výsledky zvířat obou typů (Lurcher a wild) ve stejných dnech s tím, že tato zvířata byla ve stejných metodikách opakovaně trénována již v 3., 6., 9. a 12. dnu PŽ.

Zvířatům typu wild a Lurcher byl od 2. do 12. dne PŽ každý druhý den podáván buď nespecifický inhibitor NOS L-NAME nebo donor NO L-arginin v dávce 20 mg/kg subkutánně. Kontrolám byl obdobně podáván fyziologický roztok. U všech zvířat bylo sledováno diskriminační učení typu inhibiční reakce pasivní avoidance – ve 3., 4., 6. a 7. dnu PŽ metodou „step through“ a v 15., 16., 20. a 21. dnu PŽ metodou „step down“.

Myším typu wild a Lurcher odvozených od kmenů C3H a C57B1/7 byl každý druhý den, počínaje 2. a konče 14. dnem aplikován subkutánně buď nekompetitivní antagonist NMDA MK-801 (0,25 mg/kg) a nebo fyziologický roztok. Zvířata byla podrobena metodikám diskriminačního učení typu „step through“ (v 6. a 7. dni PŽ) a „step down“ (v 15. a 16. dnu PŽ).

Ze získaných výsledků lze shrnout:

- motorický trénink je schopen pozitivně ovlivnit vývoj pohybových dovedností jak u zdravých jedinců, tak překvapivě výrazně i u zvířat s vrozeným neurodefektem a to i přes jejich trvalý hendikep,
- látkové ovlivnění v dávkách námi sledovaných není jednoznačné a v případě, kdy může jít o ovlivnění rozvoje neurodegenerace je patrný odlišný účinek u zvířat zdravých a postižených,
- vedle rozdílů, které jsou důsledkem neurodegenerace, je třeba vzít v úvahu i kmen zvířat. Kmenové charakteristiky mohou být tak rozdílné, že významně modifikují i důsledky stejného neurodefektu.

Summary

The motor and cognitive consequences of inborn cerebellar degeneration and some possibilities how to influence it

The cerebellum is traditionally considered to be a coordinator of movements and equilibrium and a regulator of muscular tone. Participation of the cerebellum on the motor learning has been discovered later. Besides that, there is increasing experimental and clinical evidence supporting the idea of an important role of the cerebellum in common cognitive functions.

Increasing number of experimental works - especially those on animals - demonstrate an effect of the the cerebellum on the memory and different types of learning. A suitable model to study the cerebellar degeneration are Lurcher mutant mice. During their lives, there is a progressive loss of Purkinje cells followed by a loss of granular cells and inferior oliva neurons.

We concentrated on the following problems in this work:

- development of motor learning and topical motor skills during the first month of life
- positive and negative changes in NO synthesis and subsequent effect on discriminative learning
- effect of administration of MK-801 (non-competitive antagonist of NMDA receptors) on discriminative learning of Lurcher mutants and wild mice derived from two strains (C3H and C57B1/7).

Lurcher mutants and wild mice were put in motor skill tests using four methods once only – in the 15th, 20th, 25th or 30th days of their postnatal lives (PL). The results were compared with those of the animals of both types (Lurcher and wild) in the same days but the latter animals were repeatedly trained in the same methods already in the 3rd, 6th, 9th and 12th days of PL.

Lurcher mutants and wild mice were given every other day (from 2nd to 12th days of PL) either non-specific inhibitor NOS L-NAME or donor of NO L-arginin (20 mg/kg subcutaneously). The controls obtained the saline solution similarly. We followed discriminative learning type inhibition reaction of passive avoidance – in the 3rd, 4th, 6th, and 7th days of PL using the “step through method“ and in the 15th, 16th, 20th and 21st days of PL using the “step down“ method in all animals.

Lurcher mutants and wild mice derived from two strains were administered (from 2nd to 14th days of PL) every other day subcutaneously either non-competitive antagonist NMDA MK-801 (0.25 mg/kg) or the saline physiologic solution. The animals underwent methods of discriminative learning of type “step through“ (in the 6th and 7th days of PL) and of type “step down“ (in the 15th and 16th days of PL).

We can summarize our results:

- motor training is able to influence positively development of the motor skills in both – the healthy animals as well as (surprisingly markedly) in the animals suffering from inborn neurodeficiency, in spite of their permanent handicaps,
- effect of the drugs in doses used in the experiment is not unambiguous. If it may influence the development of neurodegeneration in some cases, there is a different effect on the healthy animals and the handicaped ones,
- besides the differences caused by neurodegeneration, it is necessary also to know the animals strain. The characteristics of the strains may be so different that significantly same modify the after-effects of the same neurodeficiencies.

Přehled vybrané literatury

1. Albus J.S.: A theory of cerebellar function. *Mathemat. Biosci.* 1971, 10: 25-61.
2. Bannerman D.M., Chapman P.F., Kelly P.A., Butcher S.P., Morris R.G.: Inhibition of nitric oxide synthase does not impair spatial learning. *J. Neurosci.* 1994, 14: 7404-14.
3. Barnett S.A.: *The rat, a study in behaviour.* Chicago, Aldine 1964.
4. Bohme G.A., Bon C., Lemaire M., Reibaud M., Piot O., Stutzmann J.M., Doble A., Blanchard J.C.: Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1993, 90: 9191-4.
5. Borowicz K.K., Starownik R., Kleinrok Z., Czuczwar S.J.: The influence of L-NG- nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthase, upon the anticonvulsive activity of conventional antiepileptic drugs against maximal electroshock in mice. *J. Neural. Transm.* 1998, 105: 1-12.
6. Braintenberg V., Heck D., Sultan I.: The detection and generation of sequences as a key to cerebellar function: Experiments and theory. *Behav. Brain Sel.* 1997, 20: 229-37.
7. Caddy K.W.T., Biscoe T.J.: Structural and quantitative studies on the normal C3H and Lurcher mutant mice. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1979, 287: 167-201.
8. Caddy K.W.T., Vožeh F.: The effect of 3-acetylpyridine on inferior olivary neuron degeneration in Lurcher mutant and wild-type mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1997, 330: 139-42.
9. Carpenter M.B.: Anatomy of basal ganglia. In Vinken P.J., Bruyn G.W., Klawans H.L. (Ed.). *Handbook of clinical neurology*, Vol. 49. New York, Elsevier 1986, 1-18.
10. Caston J., Jones N., Stelz T.: Role of preoperative and postoperative sensorimotor training on restoration of the equilibrium behavior in adult mice following cerebellectomy. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1995 a, 64: 195-202.

11. Caston J., Vasseur F., Stelz T., Chianale C., Delhay-Bouchaud N., Mariani J.: Differential roles of cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei in the learning of the equilibrium behavior: studies in intact and cerebellectomized Lurcher mutant mice. *Brain. Res. Dev. Brain Res.* 1995 b, 86: 311-6.
12. Cendelín J., Vožeh F.: Comparison of the effect of the D1 dopamine receptor influencing on spatial learning in two different strains of Lurcher mutant mice. *Homeostasis* 2001, 41:73-5.
13. Du W., Harvey J.A.: The nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME facilitates associative learning. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 1996, 20: 1183-95.
14. Fin C., da Cunha C., Bromberg E., Schmitz P.K., Bianchin M., Medina J.H., Izquierdo I.: Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1995, 63: 113-5.
15. Fortier P.A., Smith A.M., Rossignol S.: Locomotor deficits in the mutant mouse, Lurcher. *Exp. Brain. Res.* 1987, 66: 271-86.
16. Gorter J.A., de Bruin J.P.: Chronic neonatal MK-801 treatment results in an impairment of spatial learning in the adult rat. *Brain Res.* 1992, 580: 12-7.
17. Griesbach G.S., Amsel A.: Immediate and long-term effects of neonatal MK-801 treatment on nonspatial learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, 95: 11435-9.
18. Houk J.G., Buckingham J.T., Barto A.: Models of the cerebellum and motor learning. *Behav. Brain Sci.* 1996, 19: 368-83.
19. Chapman P.F., Atkins C.M., Allen M.T., Haley J.E., Steinmetz J.E.: Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *Neuroreport.* 1992, 3: 567-70.
20. Ikonomidou C., Qin Y., Labruyere J., Kirby C., Olney J.W.: Prevention of trauma-induced neurodegeneration in infant rat brain. *Pediatr. Res.* 1996, 39: 1020-7.
21. Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vockler J., Dikranian K., Tenkova T.I., Stefovská V., Turski L., Olney J.W.: Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Sci.* 1999, 283: 70-4.

22. Ikonomidou C., Stefovská V., Turski L.: Neuronal death enhanced by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000, 97: 12885-90.
23. Joyal C.C., Meyer C., Jacquart G., Mahler P., Caston J., Lalonde R.: Effects of midline and lateral cerebellar lesions on motor coordinations and spatial orientation. *Brain Res.* 1996, 739: 1-11.
24. Knowles R.G., Palacios M., Palmer R.M., Moncada S.: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989, 86: 5159-62.
25. Křížková A., Vožeh F.: Development of early motor learning and topical motor skills in a model of cerebellar degeneration. *Behav. Brain Res.* 2004, 150: 65-72.
26. Lalonde R., Botez M.I., Joyal C.C., Caumartin M.: Motor abnormalities in Lurcher mutant mice. *Physiol. Behav.* 1992, 51: 523-5.
27. Lalonde R.: Cerebellar contributions to instrumental learning. *Neurosci. Biobehav.* 1994 a, 18: 161-70.
28. Lalonde R.: Motor learning in Lurcher mutant mice. *Brain Res.* 1994 b, 639: 351-3.
29. Lalonde R., Bensoula N., Filali M.: Rotorod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice. *Neurosci. Res.* 1995, 22: 423-26.
30. Lalonde R., Joyal C.C., Thifault S.: Beam sensorimotor learning and habituation to motor activity in Lurcher mutant mice. *Behav. Brain Res.* 1996 a, 74: 213-6.
31. Lalonde R., Filali M., Bensoula A.N., Lestienne F.: Sensorimotor learning in three cerebellar mutant mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1996 b, 65: 113-20.
32. Lalonde R.: Immobility responses in Lurcher mutant mice. *Behav. Genet.* 1998, 28: 309-14.
33. Majlessi N., Kadkhodae M., Parviz M., Naghdi N.: Serotonin depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. *Brain Res.* 2003, 963: 244-51.

34. Marec L., Lalonde R.: Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res.* 1997, 768: 310-6.
35. Marletta M.A.: Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994, 78: 927-30.
36. Marr D.: A theory of cerebellar cortex. *J. Physiol.* 1969, 202: 437-70.
37. McLamb R.L., Williams L.R., Nanry K.P., Wilson W.A., Tilson H.A.: MK-801 impedes the acquisition of a spatial memory task in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1990, 37: 41-5.
38. Medina J.H., Izquierdo I.: Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1995, 21: 185-94.
39. Mogensen J., Wortwein G., Hasman A., Nielsen P., Wang Q.: Functional and neurochemical profile of place learning after L-nitro-arginine in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1995, 63: 54-65.
40. Mysliveček J.: Changes of memory-trace retrieval within 3 hours after learning in newborn rats. *Activ. Nerv. Super.* 1990, 32: 202-3.
41. Mysliveček J., Hassmannová J.: Early inhibitory learning in the rat. I. Learning and memory development. *Dev. Psychobiol.* 1990, 23: 119-28.
42. Mysliveček J., Hassmannová J.: Step down passive avoidance in the rat ontogeny. *Acta Neurobiol. Exp.* 1991, 51: 89-96.
43. Noda Y., Yamada K., Nabeshima T.: Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behav. Brain Res.* 1997, 83: 153-8.
44. Paul V., Subramanian E.H.: Evidence for an involvement of nitric oxide and gamma aminobutyric acid in the anticonvulsant action of L-arginine on picrotoxin-induced convulsions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2002, 72: 515-9.
45. Paul V., Reddy L., Ekambaram P.: Prevention of picrotoxin convulsions-induced learning and memory impairment by nitric oxide increasing dose of L-arginine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003, 75: 329-34.
46. Plech A., Klimkiewicz T., Maksym B.: Effect of L-arginine on memory in rats. *Pol. J. Pharmacol.* 2003, 55: 987-92.

47. Pohl D., Bittigau P., Ishimaru M.J., Stadthaus D., Hubner C., Olney J.W., Turski L., Ikonomidou C.: N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999, 96: 2508-13.
48. Prendergast M.A., Buccafusco J.J., Terry A.V. Jr.: Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997, 57: 347-52.
49. Prickaerts J., De Vente J., Markerink-Van Ittersum M., Steinbusch H.W.: Behavioural, neurochemical and neuroanatomical effects of chronic postnatal N-nitro-L-arginine methyl ester treatment in neonatal and adult rats. *Neurosci.* 1998, 87: 181-95.
50. Qiang M., Chen Y.C., Wang R., Wu F.M., Qiao J.T.: Nitric oxide is involved in the formation of learning and memory in rats: studies using passive avoidance response and Morris water maze task. *Behav. Pharmacol.* 1997, 8: 183-7.
51. Rajasekaran K., Paul V.: Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis on motor behavioral in rats. *Med. Sci. Res.* 1999, 27: 609-12.
52. Reddy P.L., Rajasekaran K., Paul V.: Evidence for an involvement of nitric oxide in memory of shock avoidance task in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 2002, 46: 119-22.
53. Reid L.S.: The development of noncontinuity behavior throughout continuity learning. *J. Exp. Psychol.* 1953, 46: 107-12.
54. Richman C.L., Knoblock K., Coussens W.: The overtraining reversal effects in rats: a function of task difficulty. *Q. J. Exp. Psychol.* 1972, 24: 291-8.
55. Takadera T., Matsuda I., Ohyashiki T.: Apoptotic cell death and caspase-3 activation induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and their prevention by insulin-like growth factor I. *J. Neurochem.* 1999, 73: 548-56.
56. Tandon P., Liu Z., Stafstrom C.E., Sarkisian M., Werner S.J., Mikati M., Yang Y., Holmes GL.: Long-term effects of excitatory amino acid antagonists NBQX and MK-801 on the developing brain. *Dev. Brain Res.* 1996, 95: 256-62.
57. Telegdy G., Kokavszky R.: The role of nitric oxide in passive avoidance learning. *Neuropharmacol.* 1997, 36: 1583-7.

58. Thullier F., Lalonde R., Cousin X., Lestienne F.: Neurobehavioral evaluation of Lurcher mutant mice during ontogeny. *Dev. Brain Res.* 1997, 100: 22-8.
59. Thullier F., Lalonde R., Lestienne F.: Effects of dopaminergic agents and of an NMDA receptor antagonist on motor coordination in Lurcher mutant mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999, 63: 213-9.
60. Van Golf Racht-Delatour B., Massioui E.L.: Alleviation of overtraining reversal effect by transient inactivation of the dorsal striatum. *Eur. J. Neurosci.* 2000, 12: 3343-50.
61. Vožeh F., Caddy K.W., Mysliveček J.: Některé morfologické a funkční charakteristiky animálního modelu mozečkové degenerace (Lurcher mutantní myši). *Cesk Fysiol.* 1998, 47: 74-9.
62. Wetts R., Herrup K.: Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in Lurcher chimeric mice. I. Quantitative studies. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1982 a, 68: 87-98.
63. Wetts R., Herrup K.: Interaction of granule, Purkinje and inferior olivary neurons in Lurcher chimeric mice. II. Granule cell death. *Brain Res.* 1982 b, 250: 358-62.
64. Yamada K., Noda Y., Nakayama S., Komori Y., Sugihara H., Hasegawa T., Nabeshima T.: Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 1995, 115: 852-8.
65. Yamada K., Noda Y., Hasegawa T., Komori Y., Nikai T., Sugihara H., Nabeshima T.: The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996 a, 276: 460-6.
66. Yamada K., Hiramatsu M., Noda Y., Mamiya T., Murai M., Kameyama T., Komori Y., Nikai T., Sugihara H., Nabeshima T.: Role of nitric oxide and cyclic GMP in the dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behavior in mice. *Neurosci.* 1996 b, 74: 365-74.
67. Zou L.B., Yamada K., Tanaka T., Kameyama T., Nabeshima T.: Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacol.* 1998, 37: 323-30.

68. Zuo J., De Jager P.L., Takahashi K.A., Jiang W., Linden D.J., Heintz N.: Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 1997, 388: 769-73.

Práce autorky (MUDr. Aleny Křížkové rozené Motáňové) bezprostředně se vztahující k problematice:

1. Vožeh F., Caddy K.W.T., Mysliveček J., Motáňová A.: Some characteristics of early learning in cerebellar degeneration model. *Studia Psychologica* 1997, 39: 279 – 281.
2. Vožeh F., Caddy K.W.T., Mysliveček J., Motáňová A.: Some morphological and functional characteristics of the cerebellar degeneration - animal model (Lurcher mutant mice). *J. Physiol.* 1999, 511: 69.
3. Vožeh F., Beranová M., Caddy K.W.T., Motáňová A., Slípka J., Šíma J.: Morfologické a funkční projevy cerebelární degenerace animálního modelu (Lurcher mutantní myši). *Plzeňský lékařský sborník* 1999, Suppl. 72, 199: 167-170.
4. Vožeh F., Cendelín J., Motáňová A.: The development of different types of learning in cerebellar degeneration model. *Homeostasis* 1999, 39: 248-250.
5. Vožeh F., Motáňová A., Cendelín J.: Functional impact of affecting some mediator systems in cerebellar degeneration. *Homeostasis* 2000, 40: 129-131.
6. Vožeh F., Cendelín J., Jelínková D., Křížková A., Štenglová V.: The effect of a diet supplemented with nucleotides on functional parameters of the brain in neurodefective and healthy mice. *Homeostasis* 2001, 41: 69-72.
7. Vožeh F., Barcal J., Cendelín J., Křížková A., Jelínková D., Štenglová V., Žalud V.: Příspěvek k vývoji kognitivních funkcí u modelu olivocerebelární degenerace. *Čs. Fyziol.* 2002, 51: 136-137.
8. Vožeh F., Barcal J., Cendelín J., Jelínková D., Křížková A., Štenglová V.: Functional expressions of activity dependent plasticity in a model of cerebellar degeneration. *Acta Physiol Hungarica* 2002, 89: 186.
9. Křížková A.: Experimentální výzkum a nové pojetí úlohy mozečku. *Čs. Fyziol.* 2002, 51: 169-175.
10. Křížková A., Vožeh F.: Development of early learning and topical motor skills in a model cerebellar degeneration. *Behav. Brain Res.* 2003, 150: 65-72.

11. Vožeh F., Barcal J., Cendelín J., Jelínková D., Křížková A., Štenglová V.: Functional manifestations of activity dependent plasticity in a model of cerebellar degeneration. *Homeostasis* 2004, 43: 67-70.