

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

**Bc. Šárka Vítová**

**Plavání jako ukazatel normálního a  
změněného vývoje laboratorního potkana**

*Diplomová práce*

Praha 2013

Autor práce: **Bc. Šárka Vítová**

Vedoucí práce: **Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.**

Oponent práce: **Mgr. Mariana Stehlíková**

Datum obhajoby: **2013**

## **Bibliografický záznam**

VÍTOVÁ, Šárka. *Plavání jako ukazatel normálního a změněného vývoje laboratorního potkana*. Praha, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství. 54 s. + přílohy. Vedoucí práce Pavel Mareš.

## **Abstrakt**

Plavání, vrozený reflex potkanů, představuje komplexní motorický projev, který se v průběhu postnatálního vývoje výrazně mění. Vývoj plavání jsme sledovali na skupině mláďat potkana ve věku P5 až P21. Na základě výsledků pozorování a poznatků o plavání z odborné literatury jsme navrhli protokol pro testování plavání u potkanů. Testování probíhá v nádrži o rozměrech 50x15x30cm, s vodou o teplotě 24°C, po dobu 1 minuty nebo do potopení mláďete. Plavání je hodnoceno pomocí několika vývojových znaků, kterými jsou: potopení, splývání, pozice čenichu a plovací pohyby končetin. Navržený protokol jsme využili v dalším pokusu, ve kterém jsme zjišťovali vliv látek působících na GABAB receptory (antagonisty CGP 46381 a agonisty baklofenu) na vývoj plavání u potkana. Výsledky pokusu ukázaly, že CGP 46381 ani baklofen, podávané mláďatům ve věku P7 až P11 každodenně v dávce 3 mg/kg, nemění průběh vývoje plavání ve srovnání s vývojem kontrolní skupiny.

## **Klíčová slova**

Plavání, laboratorní potkan, motorický vývoj, GABAB receptory, CGP 46381, baklofen

## **Abstract**

Swimming is an inborn reflex in rats. It represents a complex motor behaviour, which changes significantly throughout the postnatal developmental period. In the current study, development of swimming behaviour was studied using a group of rat pups aged between P5 - P21. A protocol for assessment of swimming in the rat was developed based on literature studies and the results of our own observation on rat swimming. The experiments were conducted using a tank 50x15x30cm, filled with water at 24°C, in which each pup is left for 1 minute or less, if it sinks to the bottom. Swimming was assessed using the following developmental markers: sinking, floating, nose position and swimming movements of the limbs. To study the effect of GABAB receptors ligands on the development of swimming behaviour, three groups of pups aged between P12 – P32 were injected intraperitoneally either physiological solution or 3 mg/kg GABAB receptors antagonist CGP 46381 or 3 mg/kg GABAB receptors agonist baclofen, daily between P7 and P11. Results showed that neither CGP 46381, nor baclofen, alters the development of swimming behaviour compared to a control group.

## **Keywords**

Swimming, laboratory rat, motor development, GABAB receptors, CGP 46381, baclofen

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením prof. MUDr. Pavla Mareše, DrSc., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky. Dále prohlašuji, že stejná práce nebyla použita pro získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 31. 7. 2013

Šárka Vítová

## **Poděkování**

Děkuji panu profesoru MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za vedení diplomové práce; velmi si vážím Vašeho přístupu.

Dále děkuji paní Irince Necheva za pomoc v praktické části práce a paní RNDr. Anně Mikulecké, PhD., za konzultace a návrh způsobu hodnocení plavání. Panu Mgr. Grygoriy Tsenovovi, PhD., a paní Mgr. Gabriele Hlaváčové děkuji za pomoc při zpracování grantového projektu.

Děkuji své rodině za všechnu myslitelnou podporu a trpělivost, svým přátelům především za trpělivost a Faisalovi za podporu a pomoc s anglickou verzí abstraktu.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>1. PŘEHLED POZNATKŮ</b> .....	<b>11</b>
1.1 Laboratorní potkan .....	11
1.2 Vývoj motoriky potkana .....	12
1.2.1 Vývoj senzomotoriky .....	12
1.2.2 Vývoj vzpřímené polohy .....	12
1.2.3 Raná rytmická aktivita (primitivní lokomoce) .....	14
1.2.4 Vývoj lokomoce .....	15
1.3 Plavání laboratorního potkana .....	16
1.3.1 Plovací pohyby končetin .....	17
1.3.2 Dospělý vzor plavání .....	17
1.3.3 Vývojové fáze předcházející dospělému vzoru .....	17
1.3.4 Vývoj plavání u potkana – kvantitativní hodnocení .....	21
1.4 GABAB receptory a látky na ně působící .....	23
1.4.1 GABAB receptory .....	23
1.4.2 CGP 46381 .....	24
1.4.3 Baklofen .....	24
<b>2. CÍLE A HYPOTÉZY</b> .....	<b>26</b>
<b>3. METODIKA</b> .....	<b>27</b>
3.1 Metodika rešeršní části práce .....	27
3.2 Metodika výzkumné části práce .....	27
3.2.1 Aplikace látek .....	28
3.2.2 Plavání .....	29
3.2.3 Hodnocení videozáznamů, sběr dat .....	29
3.2.4 Statistická analýza dat .....	31
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>32</b>
4.1 Vývojové změny plavání potkana – Soubor 1 .....	32
4.1.1 Plavání pětidenních mlád'at .....	32
4.1.2 Vývoj plavání v období P5 až P21 .....	32
4.2 Vliv látek působících na GABAB receptory na vývoj plavání – Soubor 2 .....	35
4.2.1 Vliv CGP 46381 na plavání mlád'at potkana .....	35

4.2.2 Vliv baklofenu na plavání mláďat potkana.....	36
4.2.3 Statistická analýza dat, testování hypotéz. ....	37
4.3 Protokol pro testování průběhu vývoje plavání u laboratorního potkana. ....	39
4.3.1 Materiály. ....	39
4.3.2 Postup testování. ....	39
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>41</b>
<b>ZÁVĚRY .....</b>	<b>49</b>
<b>REFERENČNÍ SEZNAM .....</b>	<b>50</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>55</b>
<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>56</b>



## SEZNAM ZKRATEK

AVČR = Akademie věd České republiky, v.v.i.

Bac = baklofen

CNS = centrální nervová soustava

GABA = kyselina  $\gamma$ -aminomáselná

LPK = levá přední končetina

LZK = levá zadní končetina

NS = nervová soustava

P = postnatální den, např. P1 = den, ve kterém mládě dosáhlo věku 1 den (postnatální den 1)

P0 = den narození (postnatální den 0)

PKK = přední končetiny

PPK = pravá přední končetina

PZK = pravá zadní končetina

ZKK = zadní končetiny

Poznámka: Různé způsoby označení dnů postnatálního vývoje, používané v citované literatuře, jsme pro větší přehlednost sjednotili v systému značení zkratkou  $P_x$ , kde P značí postnatální období a x den, ve kterém mládě dosáhlo věku x, přičemž den narození je označen jako P0. Autoři Schapiro et al. (1970) neuvádí, zda dnem 1 rozumí den narození či den následující po dni narození, jimi uváděné dny proto citujeme pomocí formulace „ $P_x$  či  $P_{x+1}$ “ (např. den 1 jako P0 či P1).

# ÚVOD

Tématu motoriky potkanů jsem se věnovala již ve své bakalářské práci „Vývoj motorických schopností laboratorního potkana“. Potkani patří v neurovědách mezi jedny z nejdéle a nejčastěji používaných modelových organismů. Díky tomu byl jejich motorický vývoj podrobně prozkoumán a popsán. Znalost motorického vývoje potkana není samoučelná, v praxi tvoří základ tvorby a interpretace motorických testů, jež nachází využití ve výzkumu farmakologických, toxikologických, genetických, environmentálních a jiných vlivů na živý organismus a jeho vývoj.

Pro účely diplomové práce jsem téma motoriky potkanů zúžila na plavání, které doposud stálo poněkud stranou zájmu neurověd, ač se vzhledem k přirozenému habitatu potkana jedná o významnou součást motorického repertoáru tohoto zvířete. Plavání, stejně jako chůze a jiné motorické projevy, může být využito jako ukazatel normálního či abnormálního motorického vývoje ve vývojových studiích. V odborné literatuře lze nalézt několik příkladů takového využití, není jich však mnoho a nevytváří jednotnou, ustálenou metodiku testování.

Tato diplomová práce je zároveň jedním z výstupů grantového projektu GAUK č. 92310, v jehož rámci byl zkoumán vliv látek působících na GABA receptory na anxieta, motoriku a chování mláďat laboratorních potkanů. Dílčím výzkumným záměrem tohoto projektu bylo zjištění ovlivnění vývoje plavání podáním látek působících na GABAB receptory, což je vedle samotného plavání další téma, kterému se věnuji v této diplomové práci.

# 1 PŘEHLED POZNATKŮ

## 1.1 Laboratorní potkan

Potkan je historicky prvním zvířecím druhem chovaným výhradně pro účely vědeckého výzkumu (Krinke, 2000). Tento chov dal vzniknout nové formě potkana (*Rattus norvegicus*) – potkanu laboratornímu (*Rattus norvegicus* var. *alba*).

Taxonomické zařazení potkana laboratorního je následující (převzato z BioLib, [online]):

říše: živočichové (Animalia)

kmen: strunatci (Chordata)

třída: savci (Mammalia)

řád: hlodavci (Rodentia)

čeleď: myšovití (Muridae)

rod: krysa (*Rattus*)

druh: potkan (*Rattus norvegicus*)

forma: potkan laboratorní (*Rattus norvegicus* var. *alba*)

Pro použití potkanů jako laboratorního zvířete v neurovědách mluví velké množství morfologických, fyziologických, farmakologických a biochemických údajů o těchto zvířatech (Clarac et al., 1998). Výhodou pro fyziologické, farmakologické a morfologické studie centrálního nervového systému je relativně konstantní velikost lebky a existence velmi podrobných atlasů mozku (např. Paxinos, Watson, 2007).

Laboratorní potkan je vhodným živočišným druhem pro vývojové studie. Březost trvá 22-23 dnů, samice rodí 10 i více mláďat. Při narození je organismus potkana, včetně nervové soustavy a fungování motorického systému, velmi nezralý (Bekoff, Trainer, 1979; Calamandrei, 2004; Clarac et al., 1998; Schapiro et al., 1970; Vinay et al., 2005); jinými slovy, potkani se rodí v brzkém stádiu neuroontogeneze. Díky tomu je možné na potkanech v prvních postnatálních dnech jejich života pozorovat a modelovat děje, které v lidské CNS probíhají v prenatalním období (Gramsbergen, 1998).

Zralosti centrální nervové soustavy (CNS) srovnatelné s donošeným lidským novorozencem dosahují potkani přibližně desátý den po narození. Další vývoj je

velmi rychlý, sexuální zrání probíhá průměrně od 35. do 50. dne, jako mladé dospělé je možno označit potkany ve věku 60 dnů, úplné pohlavní dospělosti dosahují potkani tři měsíce po narození. V příznivých životních podmínkách se mohou dožít až tři let (Nejedlý, 1965).

Vývoj motoriky laboratorního potkana je dobře prozkoumán, kromě klasických základních prací (Altman, Sudarshan, 1975; Bolles, Woods, 1964) se stále objevují práce nové (např. Gramsbergen et al., 1999). Vývojové práce se většinou věnují jednoduchým motorickým reflexům nebo lokomoci. Plavání jako komplexní motorický fenomén bylo ve vývoji zkoumáno poměrně málo (Schapiro et al., 1970, Salas, 1972), i když je tento jev vhodný pro studium pozmeněného vývoje (Schapiro et al., 1970).

## **1.2 Vývoj motoriky potkana**

### **1.2.1 Vývoj senzomotoriky**

Některé reflexy lze u mláďete potkana vyvolat již před narozením. Mezi 16. a 17. embryonálním dnem se objevuje reflexní odpověď na podráždění zadního kořenu míšního (Clarac et al., 1998), 1 až 2 dny před narozením lze vyvolat monosynaptický napínací reflex (Brocard et al., 1999). Proprioreceptory a tedy i napínací reflex se dále vyvíjí po narození, například svalová vřeténka zadních končetin (ZKK) morfologicky dozrávají 12. postnatální den (Bekoff, Trainer, 1979; Muir, 2000).

### **1.2.2 Vývoj vzpřímené polohy**

Novorozená mláďata, jsou-li izolována od matky, zauímají polohu na břicho s hlavou a extendovanými končetinami volně spočívajícími na podložce (Altman, Sudarshan, 1975; Clarac et al., 1998). Zcela chybí vzpřímení proti gravitaci i účinná lokomoce (Calamandrei, 2004).

Vzpřimování probíhá, stejně jako u člověka, postupně ve směru rostro-kaudálním a proximo-distálním (Altman, Sudarshan, 1975; Brocard et al., 1999; Clarac et al., 1998; Geisler et al., 1993; Lelard et al., 2006; Trojan et al., 2005; Vinay et al., 2005).

Vzpřimování na předních končetinách (PKK) začíná již v prvním týdnu života (Altman, Sudarshan, 1975; Clarac et al., 1998). Vývoj vzpřímené postury popsali ve své práci Altman a Sudarshan (1975). Uvádí zde, že šestidenní potkani strávili v poloze se vzpřímenými ramenními pletenci v průměru 50% z doby pozorování, která činila 3 minuty. Vzpřímení ramen souvisí s funkčním zráním PKK, které se stávají oporou pro přední část trupu. Opěrné body leží zpočátku na loktech a v distální části končetin, od postnatálního dne (P) 6 pak na akrech končetin. Dvanáctý den jsou již mláďata schopna zvednout z podložky jednu přední končetinu, aniž by při tom ztratila rovnováhu (Altman, Sudarshan, 1975). Lelard et al. (2006) uvádí, že PKK jsou schopny nést váhu přední části těla přibližně od devátého až jedenáctého dne.

Vzpřimování na ZKK začíná ve druhém týdnu života, kdy dochází dle Clarac et al. (1998) k náhlé akceleraci zrání ZKK, které jsou následně dostatečně funkčně zralé na to, aby nesly váhu zadní části trupu. Funkční zralost ZKK je podmíněna vývojem sestupných drah jdoucích z mozkového kmene do intumescencia lumbalis; toto rozšiřování probíhá v posledním prenatálním a prvních dvou postnatálních týdnech (Vinay et al., 2002). Oporu o akra ZKK lze pozorovat od desátého dne, počínaje dvanáctým dnem tráví potkani v poloze se vzpřímeným pánevním pletencem v průměru více než 50% z doby pozorování (Altman, Sudarshan, 1975). Lelard et al. (2006) uvádí schopnost ZKK nést váhu zadní části těla a vzpřímení pánve od třináctého dne.

Vzpřimování hlavy představuje výjimku v rámci rostrokaudálního směru vývoje. Probíhá ve druhém týdnu života, téměř současně se vzpřimováním pánve. Krátkodobé zdvižení hlavy nad podložku lze u 50 % mláďat pozorovat již první den (Geisler et al., 1993); pohyb probíhá v atlanto-okcipitálním skloubení (Lelard et al., 2006). Více než 50% času pozorování v poloze s hlavou vzpřímenou proti gravitaci tráví mláďata od dvanáctého dne (Altman, Sudarshan, 1975). Geisler et al. (1993) popsali vzpřímení hlavy během lokomoce také od jedenáctého až dvanáctého dne. Dlouhodobé zdvižení hlavy nad podložku se objevuje i u mláďat do dvou dní věku, to je však dáno specifickou polohou trupu, nejedná se tedy o aktivní vzpřímení (Altman, Sudarshan, 1975). Charakter pohybu hlavy se mění v druhém postnatálním týdnu v souvislosti s rozvojem zrakové orientace – zatímco slepá mláďata pohybují hlavou a páteří jako jedním celkem, po otevření očních štěrbin se objevují izolované pohyby v atlantookcipitálním skloubení (Lelard et al., 2006).

Vzpřimování je dokončeno počátkem třetího týdne. Ve své studii uvádí Altman a Sudarshan (1975) přítomnost vzpřímené polohy (tj. polohy s oporou o končetiny a hlavou zdviženou nad podložku) u všech zvířat po celou dobu pozorování počínaje patnáctým postnatálním dnem.

### **1.2.3 Raná rytmická aktivita (primitivní lokomoce)**

Lokomoční funkce lze rozdělit na ranou rytmickou aktivitu a kvadrupedální lokomoci s ventrální stranou těla vzpřímenou nad podložku, která se objevuje po nabytí vzpřímené postury (Clarac et al., 1998).

Rytmická aktivita je generována centrálními generátory motorických vzorců, které jsou v páteřní míše potkana přítomny již od embryonálního období. Tyto generátory jsou sice schopny produkovat střídavou rytmickou aktivitu samostatně, jak bylo prokázáno experimentálně na preparátech páteřní míchy potkanů, za normálních okolností jsou však aktivovány supraspinálními aferentními vstupy, které rovněž přizpůsobují lokomoční vzor daným podmínkám. Aferentaci přijímají centrální generátory motorických vzorců také na segmentální úrovni z proprioreceptorů a exteroceptorů (Muir, 2000).

Ve vývoji centrálních generátorů motorických vzorců zřejmě hrají důležitou roli periodické spontánní výboje míšních motoneuronů, zaznamenávané na předních míšních kořenech, které se objevují již v embryonálním stadiu vývoje potkana. Tyto výboje jsou pravděpodobně odpovědné za spontánní pohyby končetin pozorované in utero (Nakayama et al., 1999).

Střídavé pohyby končetin se u savců objevují již od narození (Gramsbergen, 1998; Muir, 2000). To svědčí pro přítomnost základních prvků lokomoce, tedy míšních okruhů schopných generovat rytmickou střídavou aktivitu, dostatečné supraspinální kontroly pro iniciaci pohybů a účinných výstupů do motorických jednotek, v době před objevením se zralého způsobu chůze (Muir, 2000).

CNS je tedy schopna v raném postnatálním období vyvolat lokomoční aktivitu. Protože však chybí korekce postury, nemůže být lokomoční vzor účinně realizován. Vodní prostředí a nepřítomnost kontaktu s podložkou posturální překážky do značné míry redukuje (Clarac et al., 1998). Při zavěšení potkana do vzduchu nebo ponoření do chladné vody lze vyvolat střídavé rytmické pohyby končetin, tzv. „air-stepping“,

respektive plovací pohyby (Clarac et al., 1998; Muir, 2000). Oba typy chování mají podobný motorický vzor i vývoj. O vývoji plavání podrobně pojednáváme v kapitole 1.3.

#### 1.2.4 Vývoj lokomoce

Uváděná chronologie vývoje lokomoce vychází z pozorování Altmana a Sudarshana (1975), není-li uvedeno jinak.

Novorozená mláďata potkana vykazují minimum známek svědčících pro to, že jsou schopna pohybu vpřed. Lokomoční vzory, jako je chůze a běh, totiž potřebují pro svou realizaci zralý vestibulární aparát, sestupné dráhy a regulaci cestou posturálních reflexů (Clarac et al., 1998).

Spontánní laterální pohyby hlavy lze pozorovat již u novorozených mláďat (Clarac et al., 1998; Altman, Sudarshan, 1975). Tyto pohyby umožňují čichovou orientaci a orientaci čenichu (Lelard et al., 2006). Od třetího dne jsou to pohyby rytmické, tzv. sací (Geisler et al., 1993). Časté pohyby hlavy ve vertikální rovině pozorovali Geisler et al. (1993) od sedmého dne. Od jedenáctého až dvanáctého dne popisují stejní autoři horizontální pohyby hlavy během lokomoce.

Teprve čtvrtý až pátý den po narození se objevují časté spontánní pohyby PKK, které jsou základem prvotního lokomočního projevu – tzv. pivotování (i když Gramsbergen (1998) uvádí pivotování již od narození). PKK při něm fungují jako pádla. Mláďata se odstrkují tlapami PKK, prsty PKK jsou addukovány, pánev a ZKK spočívají pasivně na podložce; výsledný pohyb těla je rotace kolem svislé osy se zanedbatelným podílem pohybu vpřed. V rámci pivotování lze rozlišit dvě formy – „odpichování“ („punting“) jako ranou formu pivotování s nekoordinovaným pohybem PKK, které je postupně nahrazováno „šlapáním“ („treading“), při kterém je již hlava zdvižena nad podložku, PKK se pohybují koordinovaně, stále však nedochází k pohybu vpřed. Pivotování lze pozorovat od P3 do P8, jeho výskyt vrcholí sedmý den.

Od sedmého až osmého dne se objevuje nový lokomoční vzor – plazení. Hlava zůstává zdvižena nad podložku po dobu několika vteřin. Prsty PKK jsou při kontaktu s podložkou abdukovány. ZKK jsou abdukovány a rotovány zevně (Geisler et al., 1993; Muir, 2000), chvílemi provádí pohyby připomínající veslování a účastní se tak lokomoce, často však zůstávají nataženy za tělem s chodidly směřujícími

vzhůru a jsou pouze pasivně vláčeny za tělem. K abdukci prstů ZKK dochází v polovině druhého týdne; abdukované prsty následně umožňují účinnější oporu i odraz. Plazení coby způsob lokomoce převažuje do čtrnáctého dne. Od většiny publikovaných prací se odlišují Clarac et al. (1998), kteří uvádějí, že spouštěli nedokonalé plazení ode dne 2, plazení s nataženými ZKK ode dne 5.

Od dvanáctého dne jsou mláďata schopna zaujmout vzpřímenou polohu na všech čtyřech končetinách a objevuje se chůze (Clarac et al., 1998, Lelard et al. 2006). Jako o převládajícím lokomočním vzoru lze o chůzi mluvit od čtrnáctého až patnáctého dne, kdy zároveň získává kvalitu chůze dospělého jedince – ZKK již nejsou ve stejné fázi abdukovány ani zevně rotovány (Geisler et al., 1993; Muir, 2000). Rychlost chůze a délka kroku se zvyšují (Clarac et al., 1998), od počátku třetího týdne se jedná spíše o běh.

U potkanů lze tedy rozlišit tři fáze vývoje lokomoce dle převažujícího lokomočního vzoru – fázi pivotování, plazení a chůze.

Lokomoční vývoj pokračuje i po třetím týdnu života potkana, kdy dochází např. k přizpůsobování chůze různým druhům povrchů a rozvoji tzv. komplexních pohybových dovedností, jako například skákání.

### **1.3 Plavání laboratorního potkana**

Plavání představuje adaptační odpověď na situaci ohrožující život mláďete. V této motorické odpovědi je integrována celá řada jednotlivých reflexních odpovědí, jako např. reflex vzpřimovací (Schapiro et al., 1970). Základem plavání jsou, stejně jako u suchozemské lokomoce, rytmické pohyby končetin generované z centrálních generátorů motorických vzorců (Nishimaru, Kudo, 2000).

Plavání ve smyslu motorické odpovědi na umístění zvířete do vodního prostředí (tedy plovacích pohybů) lze u potkanů pozorovat již záhy po narození. O efektivním plavání, při němž je zvíře schopno udržet čenich nad hladinou vody, lze však hovořit až přibližně od druhého týdne života mláďete (viz kapitola 1.3.3). Pojem efektivní plavání („effective swimming“) použili Schapiro et al. (1970), kteří pro stejný jev uvedli také označení schopnost plavat („swimming capability“).



V naší práci používáme pojem plavání jako synonymum plovacích pohybů; máme-li na mysli efektivní plavání, pak je toto označení výslovně uvedeno.

### **1.3.1 Plovací pohyby končetin**

Pro popis plovacích pohybů končetin je vhodné tyto rozdělit na úseky, kterými jsou jednotlivé plovací cykly („stroke cycle“). Plovací cyklus jedné končetiny se skládá ze dvou fází: (1) záběru („power stroke“) a (2) zpětného pohybu („return stroke“; Bekoff, Trainer, 1979; Nakajima et al., 1998).

Záběr je pohyb končetiny vzad (kaudálně), tedy z pozice maximální anteriorní flexe do pozice maximální posteriorní flexe. Zpětný pohyb je pak pohyb končetiny vpřed (rostrálně) do výchozí pozice pro následující záběr (Nakajima et al., 1998).

### **1.3.2 Dospělý vzor plavání**

Nejprve popíšeme plavání dospělého jedince, abychom následně charakterizovali jednotlivé vývojové fáze plavání, které dospělému vzoru předcházejí.

Dospělý vzor plavání – „adult pattern“ (Schapiro et al., 1970; Nakajima et al., 1998) – je charakterizován takto: zvíře používá pro pohyb vpřed pouze ZKK, PKK jsou drženy v extenzi tak, že jsou navzájem rovnoběžné a směřují rostrálně, tj. z hlediska směru pohybu zvířete vpřed. Pohyb PKK se objevuje pouze při změně směru pohybu zvířete (při otáčení), dále pak při pokusech o šplhání po stěně nádrže a pokusech o zachycení se za stěnu nádrže („pawing“; Schapiro et al., 1970); poslední dvě uvedené situace však nelze považovat za plavání.

Pohyb ZKK lze charakterizovat jako rytmické střídání flexe a extenze končetin, přičemž v okamžiku, kdy se pravá zadní končetina (PZK) nachází v pozici maximální extenze, se levá zadní končetina (LZK) nachází v pozici maximální flexe, a naopak (Nakajima et al., 1998).

Dospělý vzor je také některými autory nazýván pohybovým vzorem s převahou ZKK („dominant hindlimb pattern of movement“ (Nakajima et al., 1998)).

### **1.3.3 Vývojové fáze předcházející dospělému vzoru**

Vývoj plavání u mláďat laboratorního potkana byl poprvé systematicky popsán v práci autorů Schapiro et al. (1970).

Rozdělení vývoje do tří fází uvedené dále vychází v základu z práce autorů Nakajima et al. (1998). Jejich rozdělení a popis jednotlivých fází jsou doplněny o poznatky některých dalších autorů (konkrétně viz citace).

Fáze vývoje plavání jsou následující:

### **1) fáze převažujících pohybů PKK – primitivní vzor plavání**

Mláďata potkana jsou schopna provádět plovací pohyby končetin již v den narození (P0). Nakajima et al. (1998) pozorovali tyto pohyby u poloviny z celkem 16 sledovaných zvířat. Druhá polovina mláďat v jejich pokusu plovací pohyby nevykazovala, zvířata se v nádrži pouze nehybně vznášela (splývala), zcela nebo částečně ponořená ve vodě. Splývání pozorovali u většiny mláďat mladších 6 dní také Schapiro et al. (1970).

Bekoff a Trainer (1979) ve své práci uvádí, že již mláďata stará jeden den, tedy v P1, jsou schopna používat pro plavání všechny čtyři končetiny. Tato schopnost sice přetrvává po celý život potkana, nicméně počet končetin, které se při plavání skutečně zapojují do pohybu, vykazuje proměnlivost v závislosti na věku zvířete. Jak již bylo uvedeno výše, pro dospělý vzor plavání je charakteristické zapojení pouze ZKK (viz kapitola 1.3.2). Naproti tomu u mláďat v prvních dnech po narození převažuje při plavání aktivita PKK. Nakajima et al. (1998) zaznamenali v P1 plovací pohyby PKK u 8 z 16 mláďat, pohyby ZKK se u těchto mláďat objevovaly pouze zřídka. Převahu plovacích pohybů PKK v počátečním období postnatálního vývoje potvrzují i poznatky autorů Bekoff a Trainer (1979), kteří v období od P1 do P9 zaznamenali u mláďat kromě časových úseků, kdy se plavání účastnily všechny čtyři končetiny, také časté úseky, kdy byly aktivní pouze PKK, pouze jeden pár stejnostranných končetin, případně pouze tři končetiny (vždy obě PKK a jedna zadní končetina).

Plovací pohyby PKK v této fázi vývoje plavání lze charakterizovat jako pohyb převážně plynulý, pravidelný, rytmický (Nakajima et al., 1998). Co se týče vzájemné koordinovanosti pohybů PKK, údaje v literatuře se liší. Schapiro et al. (1970) uvádí, že mláďata mladší šesti dní obvykle vykazovala nekoordinované pohyby PKK. Početně však převažují práce, jejichž autoři shledali pohyby PKK navzájem koordinovanými, a to již u novorozenečných mláďat (Cazalets et al., 1990, pro P0; Nakajima et al., 1998, pro P0; Bekoff, Trainer, 1979, pro P1). Koordinace pohybu PKK spočívá v provázanosti fází plovacího cyklu mezi pravou přední končetinou

(PPK) a levou přední končetinou (LPK) - záběr PPK je doprovázen zpětným pohybem LPK, a naopak (Nakajima et al., 1998).

Výše charakterizované plovací pohyby, objevující se u potkanů v první fázi vývoje plavání, lze označit jako primitivní vzory plavání („primitive swimming patterns“; Nakajima et al., 1998).

První fázi vývoje plavání ohraničují autoři Nakajima et al. (1998) dny P0 a P1, kdy mláďata používají k plavání téměř výhradně PKK. Primitivní vzor plavání však může mít podobu kombinace aktivity PKK a ZKK, přičemž aktivita PKK převažuje, proto lze o první fázi vývoje hovořit až do okamžiku, kdy zvířata začnou používat stejnou měrou PKK i ZKK (viz popis následující fáze), tedy v období mezi P0 a P9 (Bekoff, Trainer 1979).

Plavání v první fázi není efektivní, tj. zvířata nejsou schopna při plavání držet čenich nad hladinou vody (Schapiro et al., 1970; Bekoff, Trainer 1979; Nakajima et al., 1998). Některá zvířata nejsou schopna se ani držet u hladiny a klesají ke dnu nádrže; tento jev se vyskytuje u mláďat v období P0 až P10 (Bekoff, Trainer 1979; Nakajima et al., 1998).

V souhrnu je první fáze vývoje plavání charakterizována primitivním vzorem plavání, při němž převažuje aktivita PKK. Plavání není ještě efektivní. Kromě plovacích pohybů se u mláďat objevuje i nehybné splývání, při kterém jsou částečně nebo zcela ponořena ve vodě. Některá mláďata se neudrží u hladiny vody a klesají ke dnu nádrže.

## **2) fáze pohybů PKK i ZKK – juvenilní vzor plavání**

Ve druhé fázi vývoje používají potkani při plavání pravidelně všechny čtyři končetiny, charakteristická je pro tuto fázi koordinace pohybů PKK s pohyby ZKK (Nakajima et al., 1998). Podobu koordinace všech čtyř končetin ve svých pracích podrobně popsali Bekoff a Trainer (1979) a Nakajima et al. (1998): v okamžiku, kdy se PPK nachází ve fázi záběru, se LPK nachází ve fázi zpětného pohybu, a naopak, a zároveň diagonální končetiny (tj. PPK s LZK nebo LPK s PZK) zahajují fázi záběru téměř současně. Jinými slovy, při plavání se rytmicky střídá fáze, kdy je PPK a LZK v záběru a zároveň LPK a PZK ve zpětném pohybu, s fází, kdy je LPK a PZK v záběru a zároveň PPK s LZK ve zpětném pohybu. Tento diagonální vzor

koordinace končetin („diagonal swimming pattern of interlimb co-ordination“) je kromě druhé vývojové fáze plavání typický také pro klus, a to nejen potkanů, ale kvadrupedálních obratlovců obecně (Bekoff, Trainer, 1979).

Plovací pohyby končetin typické pro druhou fázi vývoje plavání označují Schapiro et al. (1970) jako juvenilní vzor plavání („juvenile swimming behavior“, v doslovném překladu tedy juvenilní plovací chování).

Věková hranice mezi první a druhou vývojovou fází je literaturou uváděna značně nejednotně. Přestože za milník mezi těmito dvěma fázemi je shodně považován okamžik, kdy převládne koordinovaná aktivita všech čtyř končetin, časové vymezení této události je velmi rozdílné. Nakajima et al. (1998) uvádí, že koordinovanou aktivitu všech čtyř končetin zaznamenali u 10 z 16 mláďat již v P2, u všech mláďat pak v P5. Naproti tomu Schapiro et al. (1970) pozorovali v P5 či P6 ještě nekoordinované pohyby končetin, jejichž koordinace se s vývojem mláděte postupně zlepšovala, až se konečně v P14 či P15 objevil plně koordinovaný pohyb všech čtyř končetin. V pokusu autorů Bekoff a Trainer (1979) začala mláďata pravidelně používat všechny čtyři končetiny v P9.

Relativní shoda naopak panuje ve stanovení věku přechodu z druhé fáze do fáze třetí. Nakajima et al. (1998) uvádí P13 (z P12 nejsou data k dispozici, P13 řadí již do třetí fáze); Schapiro et al. (1970) P14 či 15 až P15 či 16; Bekoff a Trainer (1979) P16.

Během druhé vývojové fáze se plavání stává efektivním. Věk mláďat, ve kterém se objevuje schopnost efektivního plavání, je v literatuře uváděn různě. Nakajima et al. (1998) pozorovali schopnost držet čenich nad hladinou již u některých mláďat v P5. Naproti tomu Bekoff a Trainer (1979) tuto schopnost zaznamenali až od P8 nebo P9, Schapiro et al. (1970) dokonce až od P11 či P12.

V souhrnu je druhá vývojová fáze plavání charakterizována přechodem k juvenilnímu vzoru plavání, při kterém se pohybují koordinovaně všechny čtyři končetiny. Plavání se stává efektivním. Druhá fáze začíná okamžikem, kdy je převažující aktivita PKK nahrazena pohybem všech čtyř končetin, a končí na přelomu druhého a třetího postnatálního týdne.

### **3) fáze převažujících pohybů ZKK**

Třetí fáze vývoje je fází přechodu od juvenilního vzoru plavání ke vzoru dospělému, při němž převažuje aktivita ZKK (podrobně viz kapitola 1.3.2).

Fáze převažujících pohybů ZKK začíná u mláďat přibližně ve věku dvou týdnů (viz konec druhé fáze výše). Trvání této fáze ohraničují Nakajima et al. (1998) dny P13 až P21. Schapiro et al. (1970) udávají P15 či 16 až P21 či 22. Bekoff a Trainer (1979) zmiňují pouze začátek třetí fáze v rozmezí P16 až P18.

Přechod mezi druhou a třetí vývojovou fází probíhá postupně. V P13 zvířata při plavání používají stále koordinovaně všechny čtyři končetiny, nicméně pohyb PKK probíhá již pouze v jejich distálních částech. Kromě popsané změny plovacích pohybů se mění také výchozí pozice končetin vůči trupu – z pozice mírné abdukce v kořenových kloubech jsou končetiny přitaženy tak, že směřují rovnoběžně pod trup zvířete; plovací pohyby tak nyní probíhají v sagitální rovině (Nakajima et al., 1998).

Od P15 až P16 se pohyby PKK stávají nepravidelnými, činnost PKK postupně ustává. Mláďata stále poměrně často využívají jejich pohyby pro několik úvodních záběrů, po nichž však PKK uvedou do polohy charakteristické pro dospělý vzor a jako zdroj pohybu vpřed následně využívají aktivitu ZKK (Schapiro et al., 1970; Bekoff, Trainer, 1979).

Dnem P21 či P22 plovací pohyby PKK ustávají, respektive vyskytují se pouze sporadické pohyby distálních částí končetin, převážně jsou však PKK drženy nehybně v extenzi. Dospělý vzor plavání je plně vyvinut (Schapiro et al., 1970; Nakajima et al., 1998).

V souhrnu je třetí fáze vývoje plavání charakterizována přechodem od juvenilního k dospělému vzoru plavání, vyznačujícím se zejména vymizením plovacích pohybů PKK. Dochází také ke změně výchozí polohy všech končetin vůči trupu. Tato fáze probíhá od přelomu druhého a třetího postnatálního týdne do P21. Vývoj plavání je přechodem k dospělému vzoru dokončen.

#### **1.3.4 Vývoj plavání u potkana – kvantitativní hodnocení**

Část prací věnovaných vývoji plavání u potkanů nabízí kromě popisu kvalitativních změn plavání také analýzu některých jeho kvantitativních znaků. Tak například Bekoff a Trainer (1979) zjistili, že doba trvání plovacího cyklu jedné

končetiny, tedy čas od započetí záběru končetiny do započetí následujícího záběru téže končetiny, se s věkem zkracuje. To ve své práci potvrdili i Cazalets et al. (1990), kteří dále zjistili, že s věkem se také snižuje variabilita doby trvání jednotlivých plovacích cyklů stejné končetiny, tedy její pohyby se stávají pravidelnějšími.

Frekvence plovacích pohybů jedné končetiny, která je převrácenou hodnotou doby trvání plovacího cyklu, se během vývoje zvyšuje (Bekoff a Trainer, 1979); pro LZK z hodnoty  $0,6 \pm 0,2 \text{ Hz}$  v P0 na  $4,6 \pm 0,1 \text{ Hz}$  v P21 (Nakajima et al., 1998). Zatímco u ZKK se frekvence pohybů zvyšuje v průběhu celého vývoje plavání, u PKK pouze do doby, než jejich pohyby začínají v průběhu třetí vývojové fáze ustávat.

Stejně jako doba trvání plovacího cyklu se během vývoje zkracuje také latence, což je čas od započetí záběru jedné končetiny do započetí záběru druhé (homolaterální či kontralaterální) končetiny (Bekoff a Trainer, 1979). Latence i trvání plovacího cyklu se během vývoje zkracují přibližně o polovinu (Bekoff a Trainer, 1979; Cazalets et al., 1990).

Vzájemnou koordinaci končetin lze kromě slovního popisu hodnotit také pomocí veličiny fáze, která se vypočítá jako poměr latence končetiny A a B ku době trvání plovacího cyklu končetiny B (Bekoff a Trainer, 1979). Hodnota fáze 0,5 tedy odpovídá situaci, kdy končetina B zahajuje fázi záběru v okamžiku, kdy končetina A zahajuje fázi zpětného pohybu, a naopak. Fáze o velikosti přibližně 0,5 se objevuje již u mláďat v P1 (Bekoff a Trainer, 1979). Cazalets et al. (1990) uvádí, že zatímco hodnota fáze pro ZKK se v průběhu vývoje stává méně variabilní, tj. lze pozorovat čím dál méně plovacích cyklů s hodnotou fáze výrazně nižší či vyšší než 0,5, pro PKK zůstává hodnota fáze variabilní po celou dobu, kdy se PKK účastní plovacích pohybů.

Kromě časových parametrů plavání byly zkoumány i parametry délkové, příkladem je měření rozsahu plovacích pohybů končetin autory Nakajima et al. (1998). Dle jejich zjištění se rozsah pohybů s věkem zvyšuje, např. v P0 je maximální exkurze PKK přibližně 25mm, v P13 přibližně 40mm pro PKK i ZKK, v P21 přibližně 55mm pro ZKK.

Měření hodnot uvedených kvantitativních znaků plavání lze provést z videonahrávek, jak učinili Bekoff a Trainer (1979) a Nakajima et al. (1998), nebo

také z elektromyografických záznamů končetinových svalů, jak popsali Cazalets et al. (1990).

## **1.4 GABAB receptory a látky na ně působící**

### **1.4.1 GABAB receptory**

GABA receptory jsou receptory pro kyselinu  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA), hlavní inhibiční neurotransmitter v savčím mozku. Existují dvě hlavní třídy GABA receptorů: (1) ionotropní GABAA receptory a (2) metabotropní GABAB receptory, spřažené s G-proteinem (Lüllmann et al., 2007). Popsána byla i třída ionotropních GABAC receptorů (Johnston, 1996). GABAA receptory se nacházejí hlavně v postsynaptických membránách GABAergních synapsí. GABAB receptory nalzáme jak presynapticky, tak i postsynapticky, někdy ve stejné lokalizaci jako GABAA receptory (Waxham, 2008). GABAB receptory se vyskytují nejen v CNS, ale také v periferních autonomních nervech (Bowery et al., 1981).

Aktivace postsynaptického GABAB receptoru způsobuje charakteristickou pomalou hyperpolarizaci (pomalý inhibiční postsynaptický potenciál) zvýšením vodivosti postsynaptické membrány pro  $K^+$  (Silbernagl, Despopoulos, 2004; Waxham, 2008). Presynaptické GABAB receptory fungují jako autoreceptory GABAergních neuronů, přes něž je regulováno uvolňování GABA. GABA uvolněná do synaptické štěrbiny presynaptickým GABAergním neuronem se naváže na autoreceptory tohoto neuronu, což způsobí snížení dalšího uvolňování GABA z presynaptického neuronu (Sperk et al., 2004).

Další možností výskytu je GABAB receptor jako receptor heterosynaptický, nacházející se na presynaptických zakončeních glutamátergních neuronů, jehož aktivace potlačuje uvolňování excitačního neurotransmiteru glutamátu (Pinard et al., 2010).

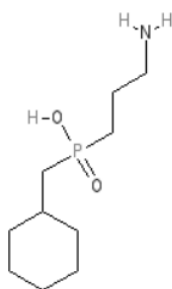
V závislosti na lokalizaci GABAB receptoru může mít jeho aktivace excitační nebo inhibiční účinek na synaptický přenos. GABAB receptory hrají zřejmě roli v etiologii některých psychiatrických poruch, jsou proto považovány za atraktivní cíle pro nově vyvíjené léky (Pinard et al., 2010). Bylo prokázáno, že agonisté GABAB receptorů působí v organismu analgeticky a snižují bažení při závislosti na kokainu.

Antagonisté GABAB receptorů, dle výsledků preklinických studií, mohou zlepšovat výkon v kognitivních činnostech a mají antidepresivní a antiepileptický potenciál u záchvatů epileptických absencí (Bowery, Enna, 2000).

Ze všech těchto důvodů jsou v současné době GABAB receptory a látky je ovlivňující předmětem výzkumu v různých odvětvích neurověd.

#### 1.4.2 CGP 46381

CGP 46381 (3-aminopropyl-(cyclohexylmethyl)phosphinic acid) je ligand působící jako antagonist GABAB receptorů. Je to látka experimentální, v klinice se nepoužívá. V této studii byl použit jako látka, která má opačný účinek na GABAB receptory než baklofen a může bránit fyziologickému využití těchto receptorů v časném stadiu vývoje. Chemická struktura CGP 46381 je znázorněna na Obrázku 1.



Obrázek 1. Struktura CGP 46381 (převzato z IUPHAR [online])

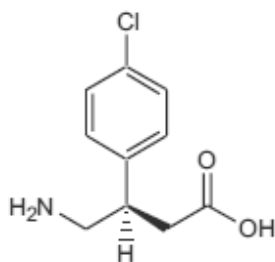
#### 1.4.3 Baklofen

Baklofen (4-amino-3-(4-chlorophenyl) butanoic acid) je derivát kyseliny  $\gamma$ -aminomáselné. Na GABAB receptorech působí jako agonista GABA (Slíva, Votava, 2010), GABAA ani GABAC receptory neaktivuje (Hill, Bowery, 1981; Johnston, 1996). Chemická struktura aktivního izomeru (R)-baklofenu je znázorněna na obrázku 2.

Klinicky se používá v léčbě spastických stavů jako centrální myorelaxancium, kdy působí na úrovni páteřní míchy (Lüllmann et al., 2007; Slíva, Votava, 2010). Zároveň však může při terapeutickém užívání působit i na receptory v mozku, což se projevuje jako nežádoucí účinky léku, jako např. sedace a somnolence, u epileptických pacientů snížení konvulzivního prahu a konvulze (Rush, Gibberd, 1990; SÚKL [online]).



V preklinickém výzkumu zůstává baklofen nejpoužívanějším agonistou pro aktivaci GABAB receptorů (Waxham, 2008). V naší studii byl baklofen použit jako modelová látka ovlivňující motoriku nejen u dospělých, ale i nezralých laboratorních zvířat. Podání v časně fázi postnatálního vývoje potkanů může změnit další dozrávání inhibičního systému využívajícího GABAB receptory.



**Obrázek 2. Struktura (R)-baklofenu, aktivního izomeru baklofenu (převzato z Martin, Dunn, 2002)**

## 2 CÍLE A HYPOTÉZY

### Hlavní cíle

Hlavní cíle práce jsou:

- 1) navrhnout protokol pro testování průběhu vývoje plavání u laboratorního potkana;
- 2) stanovit vývojové změny v plavání laboratorního potkana na základě (1) poznatků získaných rešerší odborné literatury a (2) vlastního pozorování skupiny mláďat, a srovnat výsledky rešerše s výsledky vlastního pozorování, dále stanovit možnosti využití vývojových změn plavání jako kvantifikovatelných ukazatelů motorického vývoje;
- 3) pomocí námi navrženého protokolu zjistit vliv látek působících na GABAB receptory (antagonisty CGP 46381 a agonisty baklofenu) na plavání jako komplexní motorický děj u mláďat laboratorního potkana.

### Hypotézy

#### Hypotéza 1

$H_0$ : Vývoj plavání mláďat po aplikaci CGP 46381 se ve srovnání s vývojem plavání kontrolní skupiny mláďat signifikantně neliší.

$H_A$ : Vývoj plavání mláďat po aplikaci CGP 46381 se ve srovnání s kontrolní skupinou signifikantně liší nejméně v jednom popisném znaku.

#### Hypotéza 2

$H_0$ : Vývoj plavání mláďat po aplikaci baklofenu se ve srovnání s vývojem plavání kontrolní skupiny mláďat signifikantně neliší.

$H_A$ : Vývoj mláďat po aplikaci baklofenu se ve srovnání s kontrolní skupinou signifikantně liší nejméně v jednom popisném znaku.

## **3 METODIKA**

Vypracování této diplomové práce probíhalo ve dvou fázích. První fáze byla fází rešeršní, při níž jsme shromáždili poznatky o vývoji plavání potkanů dostupné v odborné literatuře. Druhá fáze pak byla fází výzkumnou, kdy jsme experimentálně ověřili vývojové změny v plavání popisované v literatuře, a dále zjišťovali vliv látek působících na GABAB receptory na plavání mláďat potkana. Výzkumná část práce byla součástí projektu GAUK č. 92310 „Vliv agonistů GABAA a GABAB na anxieta, motoriku a chování mláďat laboratorních potkanů“.

### **3.1 Metodika rešeršní části práce**

Provedli jsme rešerši odborné literatury zabývající se vývojem plavání u mláďat laboratorního potkana. Poznatky o vývojových změnách plavání, získané rešerší, jsme zařadili do kapitoly 1.3 této práce.

Předmětem rešerše byly zejména původní experimentální práce (research reports). Syntézou informací o materiálech a metodách použitých v těchto pracích jsme získali podklady pro vytvoření vlastního protokolu pro testování průběhu vývoje plavání u laboratorního potkana. Výstupy rešerše byly při tvorbě protokolu dále doplněny o výstupy vlastních pokusů, jejichž metodiku uvádíme v následující kapitole.

Základem pro sestavení hodnoticího formuláře plavání, který tvoří součást našeho protokolu, byl formulář navržený RNDr. Annou Mikuleckou, PhD., působící ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

### **3.2 Metodika výzkumné části práce**

Výzkum vývoje plavání u laboratorního potkana byl proveden na celkem 82 mláďatech outbredního kmene Wistar, ve věku P5 až P32, pocházejících z chovu AVČR.

Z 82 mláďat jsme 32 jedinců použili pro předběžné testování a 50 mláďat zařadili do dvou různých experimentů.

Předběžné testování mělo za cíl získat praktických zkušeností s testováním plavání potkanů, nutných pro další výzkumnou práci. Testování proběhlo na samcích ve věku P8 až P18.

První experiment byl proveden na souboru 20 mláďat ve věku P5 až P21 (dále Soubor 1), pocházejících ze dvou vrhů. V každém vrhu bylo po 5 samicích a 5 samcích. Cílem prvního experimentu byla objektivizace vývojových změn plavání.

Druhý, kontrolovaný experiment byl proveden na souboru 30 samců ve věku P5 až P32 (dále Soubor 2), pocházejících ze tří vrhů. Soubor 2 byl rozdělen na tři skupiny: (1) skupinu 10 mláďat, kterým byl aplikován antagonist GABAB receptorů CGP 46381 (dále Skupina CGP), (2) skupinu 10 mláďat, kterým byl aplikován agonista GABAB receptorů baklofen (dále Skupina Bac) a (3) kontrolní skupinu 10 mláďat, kterým byl aplikován fyziologický roztok. Mláďata byla do skupin rozdělena tak, že v každém ze tří vrhů byly zastoupeny všechny tři uvedené skupiny. Mláďata ze Souboru 2 byla označena, aby nedošlo k záměně zvířat z různých vrhů či skupin.

Zvířata byla v průběhu výzkumu umístěna ve zvěřinci ve standardní kleci spolu s matkou a sourozenci z vrhu (mláďata ve věku P21 a mladší), nebo pouze se sourozenci (starší P21), v místnosti o teplotě  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  a relativní vlhkosti  $60\pm 5\%$ , s režimem střídání tmy a světla po 12 hodinách. Potravu měla k dispozici ad libitum, s výjimkou doby testování.

Pokusy byly projektovány v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, a jejich projekt schválen odbornou komisí Fyziologického ústavu AV ČR.

### **3.2.1 Aplikace látek**

Mláďatům ze Skupiny CGP jsme každý den v rozmezí P7 až P11, tedy celkem pětkrát, podali intraperitoneálně CGP 46381 v dávce 3 mg/kg.

Stejně schéma aplikace jsme použili u Skupiny Bac pro baklofen (Bac) v dávce 3 mg/kg a u kontrolní skupiny pro fyziologický roztok v objemu 1 ml/kg, odpovídajícím objemu, ve kterém byla rozpuštěna dávka CGP i Bac. Obě použité látky jsou rozpustné ve vodě.

### **3.2.2 Plavání**

Plavání Souboru 1 probíhalo v dny P5, P7, P9, P12, P15, P18 a P21, plavání Souboru 2 v dny P12, P15, P18, P21, P25 a P32, vždy v přibližně stejnou denní dobu. Každé mládě bylo testováno v každý z uvedených dnů, příslušných pro daný soubor.

Na dobu testování byla mláďata odebrána matce a umístěna do přenosné klece. Plavání probíhalo v laboratoři s tlumeným umělým osvětlením. Přenosná klec zde byla umístěna na elektricky vytápěnou podložku pro zajištění tepelného komfortu mláďat.

Pro testování jsme používali dvě nádrže zhotovené na zakázku z průhledného plastu, menší o rozměrech 35x10x20cm (šířka x hloubka x výška) a větší o rozměrech 50x15x30cm. Zadní strana obou nádrží byla z vnější strany pokryta černou papírovou tapetou. Nádrž jsme naplnili vodou o teplotě  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  do takové hloubky, aby mláďata nedosáhla na dno.

Mládě jsme umístili do nádrže s vodou a ponechali ho zde po dobu 2 minut (Soubor 2) či několika vteřin (méně než 60s; Soubor 1). Plavání zvířete bylo snímáno videokamerou, umístěnou před nezakrytou delší stěnou nádrže.

Po uplynutí času testování bylo mládě z nádrže vyjmuto, osušeno pomocí papírového ručníku a navraceno do přenosné klece. Po skončení testování všech mláďat z jednoho vrhu byla tato zvířata společně přemístěna z přenosné klece zpět do zvěřince k matce.

Testování i následné hodnocení videozáznamů prováděla vždy stejná osoba.

Před vlastním plaváním jsme u každého zvířete zaznamenali, zda jsou jeho oční štěrbiny zavřené či otevřené; mláďata ze Souboru 2 jsme navíc každý den testování vážili (kromě P21).

### **3.2.3 Hodnocení videozáznamů, sběr dat**

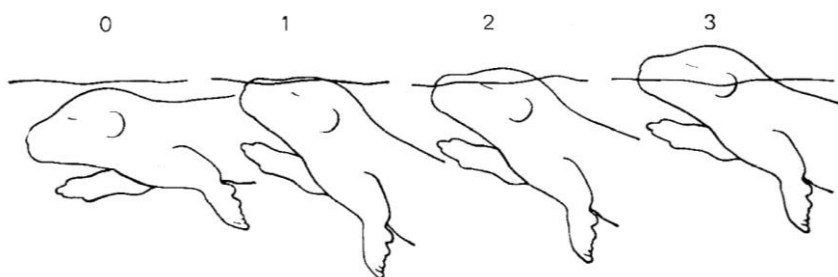
Videozáznamy jsme digitalizovali v programu Vision Brain Application (© AV ČR) a posléze vyhodnocovali v programu KMPlayer (© KMP Media).

Záznamy Souboru 1 byly hodnoceny v celé délce, u záznamů Souboru 2 jsme se zaměřili pouze na první minutu záznamu každého zvířete z daného dne.

Hodnocena byla přítomnost či nepřítomnost předem zvolených vývojových znaků plavání, kterými byly: potopení, pozice čenichu, splývání a plovací pohyby končetin.

Jako potopení bylo hodnoceno, pokud mládě kleslo ke dnu nádrže.

Pozice čenichu byla hodnocena na modifikované verzi škály představené autory Schapiro, Salas a Vukovich (1970; Obrázek 3). Pozice 0 označuje situaci, kdy je celá hlava zvířete ponořena pod vodou a hlava flektována tak, že čenich směřuje šikmo ke dnu nádrže. V pozici 1 je čenich držen těsně pod vodní hladinou, hlava je stále kompletně ponořena, zvíře není schopno při plavání dýchat. V pozici 3 jsou čenich a část hlavy drženy nad vodní hladinou (oční štěrbinu a část ušního boltce se při bočním pohledu promítají nad hladinu). V případě, že zvířata během plavání v rámci jediného dne vystřídala více uvedených pozice, zaznamenali jsme každou pozici, kterou jsme u zvířete pozorovali.



**Obrázek 3. Škála pro hodnocení pozice čenichu (převzato z Schapiro, Salas a Vukovich, 1970)**

Jako plovací pohyby končetin jsme označili všechny pohyby končetin potkana umístěného do vody, při nichž nedocházelo ke kontaktu žádné končetiny se stěnou nádrže. Účelem takovéto definice bylo vyloučit z hodnocení pohyby končetin při pokusech o šplhání po stěně nádrže či zachycení se za ni, neboť takovýto motorický projev nelze považovat za plavání. U plovacích pohybů končetin jsme dále rozlišovali pohyby všech čtyř končetin a pohyby pouze ZKK (odpovídající dospělému vzoru plavání).

Za splývání jsme považovali úplnou absenci plovacích pohybů končetin při vznášení se mláděte na hladině. Končetiny zvířete musely volně spočívat ve vodě (Obrázek 4), mládě se nesmělo přidržovat stěny nádrže (Obrázek 5).

Vyhodnocením záznamů jsme získali nominální data (znak přítomen/ znak nepřítomen).



Obrázek 4. Splývání – končetiny spočívají volně ve vodě (osmnáctidenní mládě)



Obrázek 5. Pawing – mládě se předními končetinami přidržuje stěny nádrže (pěťadvacetidenní mládě)

### 3.2.4 Statistická analýza dat

Data Souboru 2 byla podrobena statistické analýze. Soubor 2 představoval pro účely této analýzy dvě dvojice nezávislých výběrů, analyzované zvlášť (Skupina CGP – kontrolní skupina a Skupina Bac – kontrolní skupina). Četnost výskytu jednotlivých vývojových znaků plavání byla testována chí kvadrát testem 2x2. Hypotézy chí kvadrát testů 2x2 byly následující:

$H_{10}$ : Vývojový znak se ve Skupině CGP a v kontrolní skupině vyskytuje se stejnou četností.

$H_{1A}$ : Vývojový znak se ve Skupině CGP a v kontrolní skupině vyskytuje s různou četností.

$H_{20}$ : Vývojový znak se ve Skupině Bac a v kontrolní skupině vyskytuje se stejnou četností.

$H_{2A}$ : Vývojový znak se ve Skupině CGP a v kontrolní skupině vyskytuje s různou četností.

Hladina významnosti byla stanovena na 5% ( $P < 0,05$ ).

## 4 VÝSLEDKY

Nejprve popíšeme výsledky experimentální části práce a následně uvedeme návrh protokolu pro testování vývoje plavání, který je syntézou výsledků rešeršní a experimentální části práce.

### 4.1 Vývojové změny plavání potkana - Souboru 1

#### 4.1.1 Plavání pětidenních mláďat

Plavání nejmladších, tj. pětidenních mláďat Souboru 1 bylo charakterizováno pozicí čenichu 0, kterou jsme pozorovali u 18 z 20 mláďat. U většiny zvířat (16 z 20) jsme zaznamenali rovněž pozici čenichu 1, a to jak krátkodobě u mláďat, která jinak držela čenich v pozici 0, tak i po celou dobu plavání (2 zvířata). Zbylá 4 mláďata držela čenich trvale v pozici 0.

Mláďata byla schopna provádět plovací pohyby všech čtyř končetin, s výjimkou 2 mláďat, u kterých se současně pohybovaly nejvýše tři končetiny (obě PKK a jedna zadní končetina).

Splývání se objevilo u 11 jedinců, našli jsme statisticky významný ( $P < 0,05$ ) rozdíl četnosti výskytu mezi pohlavími – výskyt pouze u 3 samic ve srovnání s 8 samci. Toto byl jediný významný rozdíl mezi samci a samicemi, který jsme v tomto experimentu našli.

Potopení bylo pozorováno u 7 mláďat, u všech k potopení došlo navzdory plovacím pohybům končetin, tj. mláďata nikdy nezačala klesat ke dnu během splývání. Potopení jsme zaznamenali pouze v této věkové skupině, u starších zvířat se již nevyskytlo.

#### 4.1.2 Vývoj plavání v období P5 až P21

Vývoj plavání jsme znázornili v Tabulce 2 pomocí četnosti výskytu jednotlivých vývojových znaků v různých věkových kategoriích potkanů.

Změny pozice čenichu, odrážející vývoj polohy hlavy při plavání, probíhaly u mláďat v období P5 až P12. Poloha hlavy u pětidenních mláďat byla popsána výše, další vývoj tohoto znaku ilustruje Tabulka 1.



V P7 jsme zaznamenali převažující výskyt pozice čenichu 1 (19 mláďat), u 7 z těchto mláďat se kromě pozice 1 vyskytovala také pozice 0. Jedno mládě plavalo celou dobu testování s čenichem v pozici 0.

Věk	Pozice čenichu		
	0	1	3
P5	18	16	0
P7	7	20	0
P9	2	20	0
P12	0	2	20

**Tabulka 1. Četnost výskytu pozice čenichu 0, 1 a 3, jak byla zaznamenána v dny P5, P7, P9 a P12. Číslo udává, u kolika z celkem 20 mláďat Souboru 1 byl v daný den pozorován výskyt dané pozice. V každé věkové skupině vystřídala některá mláďata během testování více než jednu pozici čenichu, součet četností výskytu je proto pro každý řádek tabulky vyšší než je počet mláďat Souboru 1**

Všechna devítidenní mláďata plavala s čenichem v pozici 1, pouze 2 z nich změnila v průběhu testování tuto pozici na pozici 0.

V den P9 bylo již všech 20 zvířat schopno zaujmout pozici 3, a tedy plavat efektivně. Většina zvířat (18) tuto pozici držela po celou dobu plavání, pouze ve 2 případech se v určitém úseku testování objevila pozice 1. Pozici 0 jsme již nepozorovali u žádného zvířete.

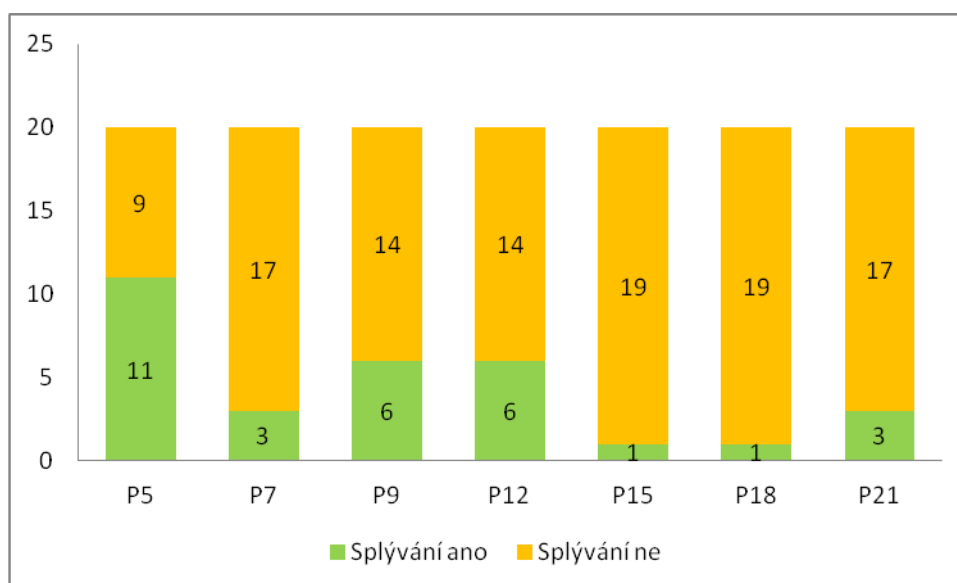
Počínaje dnem P15 držela všechna mláďata při plavání čenich stabilně po celou dobu testování v pozici 3; tyto věkové kategorie proto v Tabulce 1 opomíjíme.

Vzorec aktivity končetin při plavání se v průběhu našeho pokusu (tj. u mláďat do P21 včetně) zásadně nezměnil. Jak bylo řečeno výše, již pětidenní mláďata byla schopna provádět plovací pohyby všech čtyř končetin. Aktivita všech čtyř končetin byla dále přítomna u všech mláďat v každý den testování. Podoba plovacích pohybů končetin se však s věkem měnila. V P5 a P7 byl rozsah (dráha) pohybu PKK větší než ZKK a pohyby PKK působily více razantně. V P12 a P15 nebyly tyto rozdíly již patrné. V P18 a P21 se naopak staly razantnějšími pohyby ZKK, které se také pohybovaly po delší dráze; držení PKK odpovídalo poloze PKK charakteristické pro dospělý vzor plavání, nicméně PKK se z této polohy střídavě rytmicky pohybovaly směrem kaudálně. Plně vyvinutý dospělý vzor plavání jsme zaznamenali až u mláďat pětadvacetidenních v pokusu na Souboru 2.

Věk	Vývojový znak						
	potopení	pozice čenichu 0	pozice čenichu 1	pozice čenichu 3	splývání	pohyby všech 4 končetin	pohyby pouze ZKK
P5							
P7							
P9							
P12							
P15							
P18							
P21							

**Tabulka 2. Znárodnění vývoje plavání mezi dny P5 a P21 pomocí četnosti výskytu sady vývojových znaků v jednotlivých dnech. Bílá barva pole značí absolutní nepřítomnost daného vývojového znaku v daném dni, světle zelená barva výskyt znaku u 1 až 9 mláďat, tmavě zelená barva výskyt u 10 a více mláďat. Maximální četnost výskytu znaku v jednom testovacím dni byla 20, tzn. výskyt u všech mláďat Souboru 1**

Splývání se vyskytlo v každý den testování vždy alespoň u jednoho mláďete. Nejvyšší četnost výskytu (11/20) jsme zaznamenali u pětidenních mláďat. Četnost výskytu v ostatních věkových kategoriích již nepřesáhla číslo 6, jak ukazuje graf na obrázku 6.



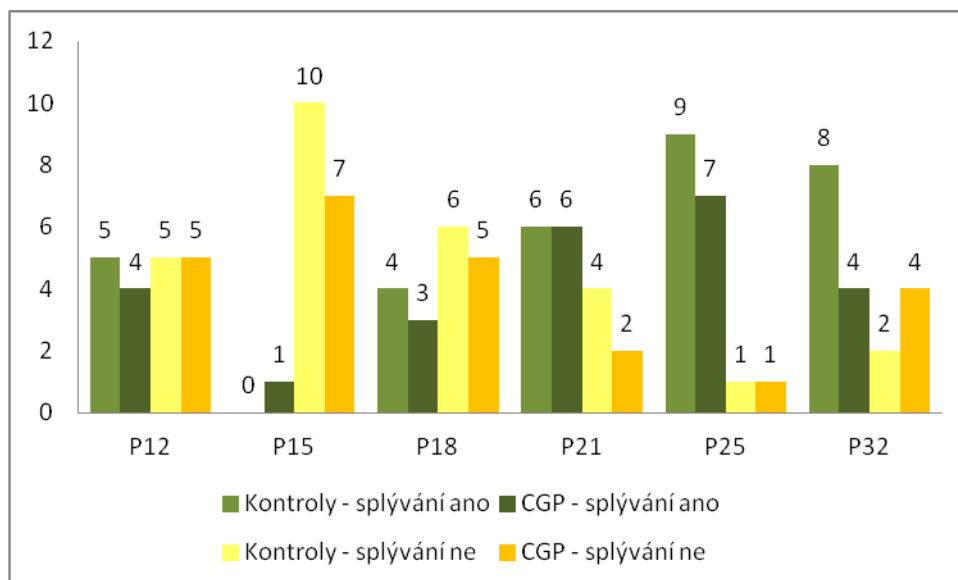
**Obrázek 6. Výskyt splývání v jednotlivých testovacích dnech. Počet mláďat, u kterých bylo splývání v daný den přítomno, je uveden ve spodní, zelené části sloupce, počet mláďat, která v daný den při plavání nesplývala, v horní, žluté části sloupce. Součet četností v každém sloupci odpovídá počtu zvířat v Souboru 1, tj. číslu 20**

## 4.2 Vliv látek působících na GABAB receptory na vývoj plavání - Soubor 2

### 4.2.1 Vliv CGP 46381 na plavání mláďat potkana

V plavání mláďat Skupiny CGP, hodnoceném pomocí zvolené série vývojových znaků, jsme neshledali zásadní rozdíly oproti plavání kontrolní skupiny. Některé vývojové znaky jsme během pokusu nezaznamenali u žádného z testovaných zvířat. Jednalo se o potopení, pozici čenichu 0 a pozici čenichu 1. Uvedené znaky byly nepřítomné v obou porovnávaných skupinách, nelze z nich tedy usuzovat na odlišnosti motorického projevu plavání mezi porovnávanými skupinami.

Pozici čenichu 3 jsme naopak pozorovali u všech jedinců obou skupin po všechny dny testování, v tomto znaku se tedy plavání Skupiny CGP a kontrol nelišilo. Obdobně všechna mláďata ve věku P12 až P21 včetně vykazovala plovací pohyby všech čtyř končetin, dokud nedošlo k přechodu na dospělý vzor plavání tak, že ve dny P25 a P32 již všechna mláďata shodně používala pro plavání pouze ZKK. Rozdíl v aktivitě končetin byl tedy pozorován mezi různými věkovými skupinami mláďat, nikoliv mezi Skupinou CGP a skupinou kontrolní.

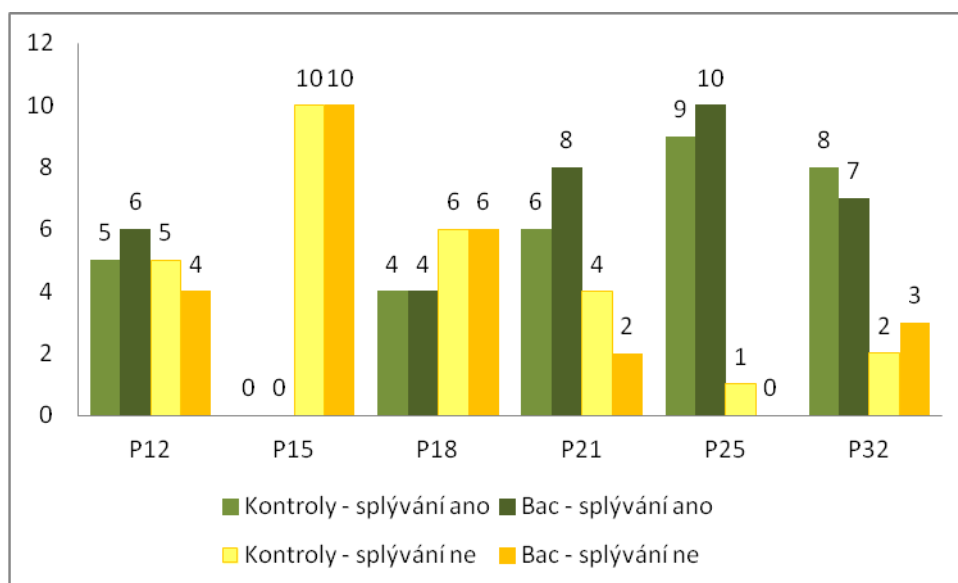


Obrázek 7. Četnost výskytu splývání ve Skupině CGP (v legendě grafu jako CGP) a kontrolní skupině (v legendě grafu jako Kontroly), jak byla zaznamenána v jednotlivé dny testování

Jediným znakem plavání, který vykazoval odlišnou četnost v obou porovnávaných skupinách, bylo splývání. Jak je patrné z grafu na Obrázku 7, četnost výskytu splývání se lišila nejen mezi Skupinou CGP a kontrolní skupinou, ale v obou skupinách také mezi jednotlivými testovacími dny navzájem. Statistické analýze rozdílů četnosti splývání se věnujeme v kapitole 4.2.3.

#### 4.2.2 Vliv baklofenu na plavání mláďat potkana

V plavání mláďat Skupiny Bac nebyly shledány zásadní odlišnosti ve srovnání s plaváním kontrol. Ze sledovaných vývojových znaků plavání pouze splývání vykazovalo odlišnou četnost výskytu v obou porovnávaných skupinách, kromě dnů P15 a P18, kdy byla četnost v obou skupinách stejná. Konkrétní hodnoty četnosti splývání ve Skupině Bac a v kontrolní skupině v jednotlivých dnech pokusu lze vyčíst z grafu na Obrázku 8.



**Obrázek 8. Četnost výskytu splývání ve Skupině Bac (v legendě grafu jako Bac) a kontrolní skupině (v legendě grafu jako Kontroly), jak byla zaznamenána v jednotlivé dny testování**

Při testování plavání Souboru 2 jsme zaznamenali neočekávaný motorický projev mláďat, kterým bylo potápění. Stejně jako při potopení, které se vyskytlo u pětidenních mláďat Souboru 1, klesala mláďata při potápění na dno nádrže. Zatímco však při potopení potkani klesali zadní polovinou těla napřed a dna se dotkli nejprve ZKK, při potápění směřovali ke dnu předními končetinami a přední polovinou těla. Jak je patrné z obrázku 9, oční štěrbinu potkana byly při potápění zavřené, přestože

při samotném plavání zůstávaly otevřené. Domníváme se, že narozdíl od potopení bylo potápění prováděno záměrně, s cílem nalézt únikovou cestu z nádrže. Potápění jsme pozorovali při testování Souboru 2 v P21, P25 a P32, u mláďat ze všech tří skupin souboru. Potápění literatura při popisu plavání mláďat potkana neuvádí, proto jsme považovali za důležité tento jev zmínit, přestože nepatřil mezi znaky sledované v našem experimentu.



Obrázek 9. Potápění (dvaatřicetidenní mláďě)

#### 4.2.3 Statistická analýza dat, testování hypotéz

Pro zjištění platnosti stanovených hypotéz (viz kapitola 2) jsme provedli statistickou analýzu dat, získaných ze Souboru 2, pomocí chí-kvadrát testu 2x2. Hypotézy chí-kvadrát testu 2x2 uvádíme v kapitole 3.2.4.

Pro Skupinu CGP jsme testovali rozložení četnosti výskytu vývojového znaku splývání ve Skupině CGP a v kontrolní skupině pro jednotlivé věkové skupiny mláďat. Hodnoty četností výskytu splývání jsme již uvedli výše (viz Obrázek 7). Hodnoty testové statistiky chí-kvadrát ( $X^2$ ) pro zjištění četnosti uvádíme v následující tabulce (Tabulka 3).

Věk mláďat	$X^2$
P12	0,06
P15	1,32
P18	0,01
P21	0,45
P25	0,03
P32	0,18

Tabulka 3. Statistická analýza rozložení četnosti splývání ve Skupině CGP a kontrolní skupině - hodnoty testové statistiky  $X^2$  pro jednotlivé dny testování. Hodnoty byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa

Pro 1 stupeň volnosti a hladinu významnosti  $P < 0,05$  je kritická hodnota testové statistiky  $X^2$  rovna 3,84. Z Tabulky 3 je zřejmé, že hodnota testové statistiky  $X^2$  nebyla pro žádnou věkovou skupinu mláďat větší nebo rovna hodnotě kritické, proto hypotézu  $H_{10}$  (Vývojový znak se ve Skupině CGP a v kontrolní skupině vyskytuje se stejnou četností) nelze zamítnout.

Stejnou četnost výskytu ostatních hodnocených vývojových znaků plavání jsme již konstatovali v kapitole 4.2.1.

Z výše uvedeného plyne, že plavání mláďat Skupiny CGP a mláďat kontrolní skupiny bylo ve všechny dny testování charakterizováno stejnou četností výskytu sledovaných vývojových znaků, proto pro Hypotézu 1 platí nulová varianta  $H_0$ : Vývoj plavání mláďat po aplikaci CGP 46381 se ve srovnání s vývojem plavání kontrolní skupiny mláďat signifikantně neliší.

Pro Skupinu Bac jsme testovali rovněž rozložení četnosti vývojového znaku splývání v této skupině a ve skupině kontrolní. Zbylé vývojové znaky nebylo nutné statisticky testovat, neboť četnost jejich výskytu byla v obou porovnávaných skupinách stejná. Přehled četnosti výskytu splývání jsme uvedli v Obrázku 8. Pro zjištěné četnosti jsme vypočítali hodnoty testové statistiky chí-kvadrát ( $X^2$ ), které uvádíme v Tabulce 4.

Věk mláďat	$X^2$
P12	0,20
P15	0,00
P18	0,00
P21	0,95
P25	1,05
P32	0,27

**Tabulka 4. Statistická analýza rozložení četnosti splývání ve Skupině Bac a kontrolní skupině - hodnoty testové statistiky  $X^2$  pro jednotlivé dny testování. Hodnoty byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa**

Z Tabulky 4 je patrné, že hodnota testové statistiky  $X^2$  nebyla pro žádnou věkovou skupinu větší nebo rovna kritické hodnotě 3,84 (pro 1 stupeň volnosti a hladinu významnosti  $P < 0,05$ ), tudíž nelze zamítnout hypotézu  $H_{20}$  (Vývojový znak se ve Skupině Bac a v kontrolní skupině vyskytuje se stejnou četností).

Na základě zjištěné stejné četnosti výskytu sledovaných vývojových znaků plavání ve všechny dny testování lze považovat průběh vývoje plavání Skupiny Bac za stejný s vývojem kontrolní skupiny, platí tedy nulová varianta  $H_0$  Hypotézy 2: Vývoj plavání mláďat po aplikaci baklofenu se ve srovnání s vývojem plavání kontrolní skupiny mláďat signifikantně neliší.

### **4.3 Protokol pro testování průběhu vývoje plavání u laboratorního potkana**

Na základě rešerše literatury a provedených experimentů navrhujeme níže uvedený protokol pro testování vývoje plavání u mláďat laboratorního potkana. Protokol se skládá z popisu materiálů potřebných pro testování, postupu testování a formuláře pro zaznamenání hodnocení plavání.

#### **4.3.1 Materiály**

K testování použijeme nádrž zhotovenou z průhledného materiálu o rozměrech 50x15x30cm (d x h x v). Dále potřebujeme teploměr, stopky, akvarijní síťku a techniku pro pořízení a hodnocení videozáznamu.

Zvířata v průběhu pokusu ustájíme v přenosné kleci umístěné na ohřívací podložce pro zajištění jejich tepelného komfortu.

#### **4.3.2 Postup testování**

Nádrž naplníme vodou o teplotě 24°C do takové výšky, aby zvířata nedosáhla žádnou částí těla na dno nádrže. Kolmo na delší stěnu nádrže umístíme videokameru tak, aby hladina vody nebyla snímána ani z nadhledu, ani z podhledu, čímž eliminujeme nežádoucí odrazy na vodní hladině.

Vlastní testování zahájíme umístěním mláďete do středu nádrže, ve které jej poté ponecháme po dobu jedné minuty, nebo do okamžiku, kdy klesne ke dnu nádrže. Poté zvíře vyjmeme z vody, osušíme a vrátíme zpět do přenosné klece. Případné nečistoty odstraníme z nádrže pomocí akvarijní sítě.

Hodnocení vývojových znaků plavání lze provádět v průběhu testování, či po skončení testování z videozáznamu. Seznam sledovaných vývojových znaků je

součástí hodnoticího formuláře (viz Obrázek 10), do něhož zaznamenáme, zda byl daný znak v plavání mláděte přítomen či nepřítomen. Pro popis jednotlivých vývojových znaků odkazujeme na kapitolu 3.2.3 této práce.

Datum:	Vývojový znak plavání						Poznámky k průběhu testování jednotlivých mlád'at
Věk mlád'at:							
Číslo mláděte	potopení	pozice čenicu			splývání	plovací pohyby končetin	
		0	1	3		všechny 4 končetiny	pouze ZKK
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
Poznámky k průběhu pokusu							

**Obrázek 10. Formulář pro hodnocení plavání mlád'at laboratorního potkana**

Zpracováním dat z hodnoticího formuláře získáme údaje o četnosti výskytu jednotlivých vývojových znaků plavání v dané věkové skupině mlád'at. Porovnáním četnosti znaků mezi různými věkovými skupinami získáme obraz vývoje plavání, probíhajícího jako součást celkového vývoje mlád'at potkanů, v čase.



## 5 DISKUSE

### Vývoj plavání - srovnání výsledků řešerše s výsledky vlastního pozorování

Poznatky o vývoji plavání u laboratorního potkana, získané literární řešerší, jsme ověřili provedením pokusu na Souboru 1. Ze tří fází vývoje, popisovaných v literatuře, jsme v našem pokusu zaznamenali převážně fázi druhou a třetí. Primitivní vzor plavání, charakteristický pro první vývojovou fázi, jsme pozorovali u dvou mláďat nejmladší skupiny (P5), která při plavání používala nejvýše tři končetiny, z toho vždy dvě přední. Toto minimální zastoupení projevů první fáze vývoje plavání v souboru není vzhledem k věku mláďat v pokusu (5-21 dnů) příliš překvapivé. Trvání první fáze v nejširším pojetí, charakterizované výskytem plovacích pohybů méně než čtyř končetin, bylo v literatuře ohraničeno dny P0 až P9 (Bekoff, Trainer, 1979). Dalo by se proto předpokládat, že primitivní vzor plavání se v našem pokusu objeví ve skupinách P5, P7 a P9. Je nicméně třeba brát v úvahu možnost rozdílné rychlosti vývoje u potkanů z různých kmenů (Long-Evans hooded v pokusu Bekoff a Trainer, 1979, Wistar v našem pokusu), a především velkou variabilitu průběhu vývoje obecně. Variabilitu časového průběhu vývoje lze demonstrovat na příkladu otevření očních štěrbin. Fyziologický věk mláďat, ve kterém se objevuje tento vývojový milník, je v literatuře uváděn v rozmezí 7 až 17 dnů věku (Heyser, 2003).

V pokusu na Souboru 1 jsme nezaznamenali vyvinutý dospělý vzor plavání, a to ani v P21, kdy by již teoreticky měl být vyvinut plně (Nakajima et al., 1998; Schapiro et al., 1970). Vysvětlení se nabízí stejné jako v předchozím odstavci. O vyvinutém dospělém vzoru plavání ve čtvrtém postnatálním týdnu jsme se přesvědčili u mláďat Souboru 2 při testování v P25 a P32.

Splývání, v literatuře zmiňované v souvislosti s plaváním potkanů v prvních dnech jejich života (Nakajima et al., 1998; Schapiro et al., 1970), jsme pozorovali ve všech věkových skupinách. Domníváme se, že se ve vývoji vyskytují dva typy splývání. Prvním je nepřítomnost plovacích pohybů v čase bezprostředně následujícím po vložení do vody, která se objevuje u velmi mladých mláďat; toto splývání je zřejmě popisováno v citované literatuře a v našem pokusu jsme jej pozorovali téměř výhradně u nejmladších mláďat v P5. Druhým typem je splývání

jako způsob šetření sil při nemožnosti uniknout z nádrže, ať už plaváním či vyšplháním se po stěně. Takovéto splývání se objevuje v průběhu plavání po počáteční aktivitě mláděte; v našem pokusu jsme jej zaznamenali ve všech věkových skupinách kromě P5. Druhý typ splývání je v literatuře popsán rovněž, neboť tvoří základ „testu bezradnosti“ („behavioural despair test“) neboli „testu nuceného plavání“ („forced swim test“), využívaného pro testování účinků antidepressiv (Porsolt et al., 1977).

Potopení jsme pozorovali pouze u nejmladších mláďat (P5), počínaje dnem P7 se již nevyskytlo. Literatura popisuje výskyt potopení v období P0 až P10 (Bekoff, Trainer, 1979; Nakajima et al., 1998), žádná z prací nicméně neuvádí, jak frekventované bylo potopení v jednotlivých věkových kategoriích. V našem pokusu na Souboru 1 nebyla doba, kterou potkan při testování stráví ve vodě, stanovena předem. Také v literatuře, na kterou odkazujeme výše, nebyl čas plavání jednotný, autoři ani neuvádí, v jakém časovém odstupu od vložení mláděte do vody se potopení obvykle odehrálo. Je proto možné se domnívat, že v našem pokusu by se potopení při delším trvání testování objevilo i ve vyšších věkových kategoriích, v rámci literaturou udávaného rozmezí. Zřejmě by se neobjevilo od P12 dále, neboť k němu nedošlo v Souboru 2 ani při plavání v délce dvě minuty, což odpovídá nejdelší době plavání v pokusu kolektivu Nakajima et al. (1998).

Vývoj polohy hlavy probíhal ve shodě s vývojem popisovaným v literatuře. V P5 byla hlava při plavání zcela ponořena pod vodou, většina mláďat však byla schopna držet čenich po určitou dobu těsně pod hladinou vody v pozici 1. V P7 a P9 byl čenich držen převážně v pozici 1. Bekoff a Trainer (1979) uvádí, že v jejich pokusu držela zvířata ode dne P8 nebo P9 již čenich nad vodou, v našem pokusu jsme však v P9 stále pozorovali bublinky unikající z nozder mláďat, svědčící o tom, že byl čenich držen pod úroveň vodní hladiny. Ve shodě s prací Schapiro et al. (1970) jsme pozici čenichu 3 (tedy efektivní plavání) zaznamenali u všech potkanů ode dne P12 dále.

Zcela nečekaným projevem bylo potápění, o kterém se nezmiňuje žádný ze studovaných článků. Potápění se objevilo poprvé u jediného mláděte Souboru 2 v den P21 a následně v dny P25 a P32 vždy u několika mláďat. Vývojové studie v referenčních člancích končí nejpozději dnem P22 či P23, tedy těsně po námi

zaznamenaném věku prvního výskytu potápění. To může být důvodem, proč potápění nebylo v žádné ze studií zaznamenáno.

V souhrnu lze říci, že jsme se vlastním pozorováním přesvědčili o změně pohybového obsahu plavání, ke které dochází v průběhu prvních čtyř týdnů života mláďat laboratorního potkana. Změnu plavání lze sledovat na několika vývojových znacích, které jsou dostatečně zřetelné a proměnlivé na to, aby mohly být používány jako ukazatele normálního či změněného vývoje plavání ve vývojových studiích.

### **Vliv látek působících na GABAB receptory na vývoj plavání**

GABA receptory fungují odlišně ve zralé a nezralé CNS. Jak zjistili ve svém experimentu Gaiarsa et al. (1995), zatímco ve zralé CNS má aktivace GABAA receptorů inhibiční účinek na šíření vzruchu, v mozku potkana v prvním postnatálním týdnu způsobuje jejich aktivace naopak depolarizaci a excitaci nezralých neuronů. Ve stejném období je také slabě vyvinuta inhibice cestou postsynaptických GABAB receptorů. Naproti tomu inhibice prostřednictvím presynaptických GABAB autoreceptorů je dobře vyvinuta již při narození. GABAB autoreceptory tak v raném období postnatálního vývoje plní roli důležitého inhibičního systému.

Systém inhibice tak, jak funguje u dospělých potkanů, se u mláďat začíná vyvíjet od druhého postnatálního týdne. V tomto kritickém období jsme mláďatům aplikovali látky působící na GABAB receptory, abychom zjistili, jaký vliv bude mít zásah do přirozeného vývoje GABAB receptorů na pozdější motorický vývoj mláďat. V pokusu jsme použili antagonistu GABAB receptorů CGP 46381 a agonistu baklofen.

Výsledky pokusu ukázaly, že aplikace CGP 46381 ani aplikace baklofenu ve dnech P7 až P11 neměla za následek změnu vývoje plavání oproti vývoji v kontrolní skupině.

V odborné literatuře jsme nenalezli dostatek zdrojů, které by referovaly o výsledcích podobných experimentů a umožňovaly tak srovnání a diskusi výsledků našeho pokusu. Jediným nalezeným záznamem je výsledek experimentu na myších autorů Ishige et al. (2001), kteří zjistili, že aplikace CGP 46381 v extrémně vysoké dávce 60 mg/kg dvakrát denně po dobu pěti dní neovlivnila normální chování zvířat.

Z výsledků pokusu na Souboru 2 nelze činit striktní závěry o vlivu látek působících na GABAB receptory na plavání a motorický vývoj obecně, jsou však dobrým východiskem pro další práci. Po provedení pokusu na Souboru 2 lze také konstatovat, že námi sestavený protokol pro testování motorického vývoje pomocí plavání je použitelný jak k testování vývoje mláďat potkana vystavených perinatálně působení různých inzultů, tak i k pokusům farmakologickým.

## **Využití plavání ve vývojových studiích**

Vývojové studie se v biomedicínském výzkumu provádí pro ozřejmění dopadu vybrané skutečnosti, např. genetické, environmentální či farmakologické intervence (Heyser, 2003), na nezralý organismus a jeho vývoj. V neurovědách se pozornost soustředí samozřejmě na vývoj nervové soustavy. Protože existují významné rozdíly v reaktivitě a vulnerabilitě nezralé nervové soustavy ve srovnání s nervovou soustavou zralou (Krinke, 2000), nelze poznatky o vlivu vybraného faktoru na dospělý organismus vždy aplikovat na organismus nezralý, nýbrž je nutné provést zvláštní vývojovou studii.

Vývoj nezralé nervové soustavy lze hodnotit různými metodami, např. anatomickými a farmakologickými, ale také prostým klinickým pozorováním chování experimentálního subjektu v rámci behaviorálních studií (Krinke, 2000). Jedním z typů těchto studií jsou testy motorického chování. Motorické chování je velmi komplexním dějem, na kterém se podílejí senzorní systémy, systém nervosvalový a CNS coby řídicí centrum. Porucha fungování kterékoliv z těchto složek se projevuje změnou motorického chování experimentálního subjektu (Krinke, 2000), na jejíž odhalení se zaměřují právě motorické testy.

Podstatou behaviorálního (tedy i motorického) testování je sledování chování zvířete ve standardizovaném prostředí testu (Krinke, 2000), jímž je v námi navrženém protokolu prostředí vodní nádrže daných rozměrů o dané teplotě vody. Chování experimentálního subjektu může být kvantifikováno například tak, že jsou, buď po celou dobu testování, nebo v pravidelných intervalech, zaznamenávány činnosti, kterým se subjekt věnuje, případně je měřena délka trvání jednotlivých činností (Krinke, 2000). Pro náš protokol jsme zvolili kvantifikaci pomocí kontinuálního sledování chování potkana se záznamem výskytu předem

definovaných činností – znaků plavání. Výběr znaků vycházel z metodik článků, které jsme studovali v rámci rešerše, a z návrhu hodnoticího formuláře RNDr. Anny Mikulecké, PhD., která se v rámci svého výzkumného programu věnuje i vývoji behaviorálních testů.

Motivací pro sestavení protokolu pro testování motorického vývoje pomocí plavání nám byly výhody, které plavání nabízí oproti běžně používaným testům, prováděným na souši (např. pozorování spontánní motorické aktivity v open field, poprvé popsané Hall, 1934, a senzomotorické testy, navržené autory Altman a Sudarshan, 1975).

První výhodou vodního prostředí je silná motivace zvířat k motorické aktivitě. Umístění zvířete do vody, na rozdíl například od umístění do open field arény, představuje situaci ohrožující život potkana, a tudíž silný stimul pro pohybovou aktivitu.

Další výhodou, v literatuře často zmiňovanou, je nepřítomnost některých překážek pohybu, které při testování na souši omezují pohybový projev mláďat. Těmito překážkami jsou působení tíhové síly (proti které ve vodě působí síla vztlaková) a nutnost posturálního zajištění pohybu (Cazalets et al., 1990; Nakajima et al., 1998). Tyto překážky omezují lokomoci hlavně u velmi mladých zvířat. Základem suchozemské lokomoce i plavání jsou rytmické pohyby končetin, generované z centrálních generátorů motorických vzorců (Nishimaru, Kudo, 2000). Tyto generátory pohybu jsou u potkanů funkční již při narození (Kudo, Yamada, 1987), přesto se u mláďat v prvních dnech po narození lokomoční pohyby nevyskytují (Nakajima et al., 1998). Chůze se objevuje až od P12, kdy jsou již mláďata schopna zaujmout a zajistit vzpřímenou polohu na všech čtyřech končetinách (Clarac et al., 1998, Lelard et al. 2006). Nutnost vzpřímení a posturálního zajištění však do značné míry odpadá, umístíme-li zvíře do vodního prostředí, a tak je možné ve vodě vyvolat lokomoční pohyby již ode dne narození mláďete (Cazalets et al., 1990; Nakajima et al., 1998).

Poslední výhodou, kterou zde zmíníme, je komplexní povaha plavání, které v sobě integruje celou řadu jednotlivých reflexních odpovědí. Tyto reflexy jsou obvykle zkoumány izolovaně, tj. mimo rámec celkového motorického chování mláďete. Plavání z tohoto pohledu prezentuje komplexnější model motorického

chování, s jehož pomocí lze analyzovat stav vývoje nervové soustavy zvířete (Schapiro et al., 1970).

Plavání má ale i své nevýhody. Lze se domnívat, že umístění do vody vyvolává u zvířete stresovou reakci, jejíž pochody mohou interagovat s faktorem, který je předmětem zájmu daného výzkumu, a podílet se tak na výsledném ovlivnění motorického chování ve chvíli, kdy je žádoucí, aby byla motorika ovlivněna pouze působením zvoleného faktoru (Morris, 1984). Další nevýhodou je subjektivita hodnocení chování zvířete, daná osobou hodnotitele; ta je však obecným rysem všech behaviorálních studií založených na kvalitativní analýze chování (Krinke, 2000). Subjektivitu hodnocení lze omezit přesným definováním podoby sledovaného chování a tréninkem v interpretaci chování, případně také zavedením nezávislého hodnocení více hodnotiteli.

Další nevýhody testování plavání jsou technického rázu. Hodnocení záznamů z pokusu je poměrně časově náročné, především ve srovnání s jinými testy, které umožňují automatické hodnocení pokusu softwarem, např. testování v open field (Krinke, 2000; Morris, 1984). Při interpretaci výsledků pokusu nejsou pro plavání k dispozici referenční meze, z nichž by bylo možné jednoduše usuzovat na normalitu či abnormalitu motorického vývoje daného jedince. Tato skutečnost však při vývojových studiích nepředstavuje zásadní problém, neboť referenční údaje jsou pro každý pokus získávány od kontrolní skupiny.

Plavání bylo doposud pro testování motoriky potkanů využíváno spíše ojediněle, ovšem i z těchto ojedinělých případů je patrná pestrost jevů, které lze takto zkoumat. Doposud se jednalo například o výzkum vlivu hormonů tyroxinu a kortizolu na motorický vývoj (Schapiro et al., 1970), kineziologickou studii vývoje koordinace končetin (Bekoff, Trainer, 1979), výzkum vývoje rytmické aktivity centrálních generátorů motorických vzorců (Cazalets et al., 1990) a výzkum vlivu sníženého množství serotoninu v CNS na motorický vývoj (Nakajima et al., 1998). Uvedené studie probíhaly každá podle vlastní metodiky, jejímž základem bylo vždy umístění zvířete do vodní nádrže a následné hodnocení jeho plavání, nicméně parametry testu, jako například teplota vody, velikost nádrže či délka testování, byly v každé studii jiné. Metodika testování motorického vývoje pomocí plavání nebyla dosud sjednocena, přestože některé parametry, zejména teplota vody, mají na motorický

projev potkanů značný vliv (Wever, 1932), takže jejich rozdílné nastavení v různých studiích téměř znemožňuje vzájemně porovnat výsledky.

Existují testy založené na plavání, u kterých byla stanovena jednotná metodika provádění, například test nuceného plavání (viz výše) a Morrisovo vodní bludiště (navrženo Morrisem, 1984). Tyto testy však používají plavání pouze jako „prostředníka“ pro zjištění vlivu vybraného faktoru na projevy deprese (test nuceného plavání) či prostorovou paměť a učení (Morrisovo vodní bludiště), nehodnotí tedy motorický vývoj.

Metodika testování v námi navrženém protokolu je pokusem o sjednocení parametrů testu pro budoucí experimenty prováděné na půdě Fyziologického ústavu AVČR. Nelze však vyloučit, že při používání protokolu vyvstane potřeba některé parametry změnit (viz dále).

## **Východiska pro další práci**

V návaznosti na tuto práci bychom rádi pokračovali ve vývoji protokolu pro testování plavání mláďat laboratorního potkana provedením dalších studií. Vhodná by byla například studie plavání mláďat ve věku P0 až P4, která by umožnila ověřit použitelnost navrženého protokolu u nejmladších mláďat, u kterých je dle literatury plavání dosti specifické.

Další možností je provedení vývojové studie, při které bychom hodnotili plavání různě starých mláďat, přičemž v den testování by mláďata neměla žádnou předchozí zkušenost s plaváním, tj. všechna mláďata by plavala poprvé v životě. Tím bychom vyloučili možný vliv učení na podobu plavání, který při opakovaném testování nelze vyloučit.

Studie, ve které by byl motorický vývoj mláďat hodnocen na základě námi navrženého protokolu a současně pomocí standardně používaných motorických testů, by umožnila ověřit předpokládané výhody testování formou plavání oproti testování na souši. Dalším přínosem takové studie by byla možnost určit senzitivitu plavání na známky abnormálního vývoje, což by umožnilo lepší interpretaci negativních výsledků testování. Například u výsledků našeho pokusu na Souboru 2 nelze zcela vyloučit možnost, že zjištěná nepřítomnost změn ve vývoji plavání ve

Skupině CGP a Skupině Bac oproti kontrolní skupině nebyla dána pouze nevhodným výběrem hodnocených znaků, a v důsledku toho přehlédnutím projevů abnormálního vývoje. V kombinované vývojové studii by testování plavání mohlo být doplněno například pozorováním spontánní motoriky v open field a testováním senzomotoriky pomocí testů negative geotaxis, wire mesh ascending, bar holding a Rotarodu, což jsou standardní součásti testování motoriky při pokusech prováděných nejenom ve Fyziologickém ústavu AVČR.



## ZÁVĚRY

Cílem práce bylo provést studii vývoje plavání laboratorního potkana a dále na základě této studie a poznatků dostupných z literatury navrhnout protokol pro testování plavání jako způsob testování motorického vývoje laboratorního potkana. Dalším cílem práce bylo zjistit vliv látek působících na GABAB receptory na vývoj plavání u potkana.

V rešeršní části práce jsme shromáždili poznatky o vývoji plavání potkana, publikované v odborné literatuře, a to včetně použitých materiálů a metod testování.

V experimentální části práce jsme provedli předběžné pozorování vývoje plavání na souboru 32 mláďat potkana a dva různé experimenty na celkem 50 mláďatech.

V prvním experimentu jsme pozorovali vývoj plavání u mláďat ve věku P5 až P21. Na základě poznatků z tohoto experimentu, literární rešerše a návrhu hodnoticího formuláře RNDr. Anny Mikulecké, PhD., jsme sestavili protokol pro testování vývoje plavání u potkana. Tento protokol jsme využili při provádění druhého experimentu.

Z prvního experimentu vyplynulo, že vývoj plavání mláďat v pokusu odpovídal literárním údajům, co se týče povahy změn plavání a sledu, ve kterém se tyto změny odehrály. Časové vymezení změn neodpovídalo přesně údajům v literatuře, možné důvody jsme uvedli v diskusi. Popsali jsme také aktivní potápění mláďat ve 4. týdnu.

V druhém experimentu jsme sledovali vliv látek působících na GABAB receptory (antagonisty CGP46381 a agonisty baklofenu) na vývoj plavání mláďat.

Z druhého experimentu vyplynulo, že vývoj plavání u mláďat, kterým byla aplikována některá z látek působících na GABAB receptory, se nelišil od vývoje kontrolní skupiny mláďat. V literatuře jsme nenalezli dostatek informací, které by potvrzovaly či vyvracely tento závěr.

Provedením druhého experimentu jsme ověřili praktickou použitelnost námi navrženého protokolu pro testování vývoje plavání potkanů. Výchozí podmínky pro další vývoj a vylepšení tohoto protokolu jsme uvedli v diskusi. V diskusi jsme rovněž uvedli obecné výhody a nevýhody testování motorického vývoje formou plavání.

## SEZNAM LITERATURY

- ALTMAN, J. a K. SUDARSHAN, 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*. **23**(4), 896-920. ISSN 0003-3472.
- AVČR [Akademie věd České republiky, v. v. i.]. *Vision Brain Application 1.0.2.6* [software]. Dostupné na Fyziologickém ústavu AVČR.
- BEKOFF, A. a W. TRAINER, 1979. The Development of Interlimb Co-ordination During Swimming In Postnatal Rats. *The Journal of Experimental Biology*. **83**, 1-11. ISSN 0022-0949.
- BIOLIB [Biological Library]. *Rattus norvegicus var. alba* (potkan laboratorní). *BioLib.cz* [online]. © 1999-2013 [cit. 2013-07-10]. Dostupné z: <http://www.biolib.cz/cz/taxon/id61237/>.
- BOLLES, R. C. a P. J. WOODS, 1964. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Animal Behaviour*. **12**(4), 427-441. ISSN 0003-3472.
- BOWERY, N. G. a S. J. ENNA, 2000. Gamma-Aminobutyric Acid<sub>B</sub> Receptors: First of the Functional Metabotropic Heterodimers. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **292**(1), 2-7. ISSN 0022-3565.
- BOWERY, N. G., A. DOBLE, D. R. HILL, A. L. HUDSON, J. S. SHAW, M. J. TURNBULL a R. WARRINGTON, 1981. Bicuculline-insensitive gaba receptors on peripheral autonomic nerve terminals. *European Journal of Pharmacology*. **71**(1), 53-70. ISSN 0014-2999.
- BROCARD, F., L. VINAY a F. CLARAC, 1999. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Brain research. Developmental Brain Research*, **117**(1), 81-89. ISSN 0165-3806.
- CALAMANDREI, G., 2004. Ethological and methodological considerations in the use of newborn rodents in biomedical research. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. **40**(2), 195-200. ISSN 0021-2571.
- CAZALETS, J. R., I. MENARD, J. CRÉMIEUX a F. CLARAC, 1990. Variability as a characteristic of immature motor systems: an electromyographic study of swimming in the newborn rat. *Behavioural Brain Research*. **40**(3), 215-225. ISSN 0166-4328.

- CLARAC, F., L. VINAY, J.-R. CAZALETS, J.-C. FADY a M. JAMON, 1998. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews*. **28**(1-2), 35-43. ISSN 0165-0173.
- DEUTCH, A. Y. a R. H. ROTH, 2008. Neurotransmitters. In SQUIRE, L. R., D. BERG, F. E. BLOOM, S. DU LAC, A. GHOSH a N. C. SPITZER, eds. *Fundamental Neuroscience*. 3rd ed. Burlington: Academic Press, s. 133-155. ISBN 978-0-12374019-9.
- GAIARSA J. L., H. MCLEAN, P. CONGAR, X. LEINEKUGEL, R. KHAZIPOV, V. TSEEB, Y. BEN-ARI, 1995. Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acidA and B-mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat. *Journal of neurobiology*. **26**(3), 339-49. ISSN 0022-3034.
- GEISLER, H. C., J. WESTERGA a A. GRAMSBERGEN, 1993. Development of posture in the rat. *Acta neurobiologiae experimentalis*. **53**(4), 517-523. ISSN 0065-1400.
- GRAMSBERGEN, A., 1998. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. **22**(4), 547-553. ISSN 0149-7634.
- GRAMSBERGEN, A., H. C. GEISLER, H. TAEKEMA a L. A. VAN EYKERN, 1999. The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Brain research. Developmental brain research*. **112**(2), 217-228, ISSN 0165-0173.
- HALL, C. S., 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*. **18**(3), 385-403. ISSN 0093-4127.
- HEYSER, C. J., 2003. Assesment of Developmental Milestones in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*. Supplement 25, unit 8.18, 8.18.1-8.18.15. ISSN 1934-8584.
- HILL, D. R. a N. G. BOWERY, 1981. 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABA B sites in rat brain. *Nature*. **290**(5802), 149-52. ISSN 0028-0836.
- ISHIGE K., H. ENDO, H. SAITO, Y. ITO, 2001. Repeated administration of CGP 46381, a gamma-aminobutyric acidB antagonist, and ethosuximide suppresses seizure-associated cyclic adenosine 3'5' monophosphate response element- and

- activator protein-1 DNA-binding activities in lethargic (lh/lh) mice. *Neuroscience letters*. **297**(3), 207-10. ISSN 0304-3940.
- IUPHAR [International Union of Basic and Clinical Pharmacology]. IUPHAR Database. Ligand Summary. CGP 46381. *IUPHAR Database of Receptors and Ion Channels* [online]. © IUPHAR [cit. 2013-07-11]. Dostupné z: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/LigandDisplayForward?tab=summary&ligandId=1086>.
- JOHNSTON, G. A. R., 1996. GABA<sub>C</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends in Pharmacological Sciences*. **17**(9), 319-323. ISSN 0165-6147.
- KMP MEDIA. *KMPlayer 3.0.0.1438* [software]. Dostupné z: <http://www.kmpmedia.net/>.
- KRINKE, G. J., 2000. *The Laboratory Rat*. London: Academic Press. ISBN 0-12-426400-X.
- KUDO, N. a T. YAMADA, 1987. N-methyl-D,L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied in vitro. *Neuroscience letters*. **75**(1), 43-48. ISSN 0304-3940.
- LELARD, T.; JAMON, M.; GASC, J. P.; VIDAL, P. P., 2006. Postural development in rats. *Experimental Neurology*. **202**(1), 112-124. ISSN 0014-4886.
- LÜLLMANN, H., K. MOHR a L. HEIN, 2007. *Barevný atlas farmakologie*. Překlad 5., přepracovaného a rozšířeného vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-1672-5.
- MARTIN, I. L. a S. M. J. DUNN, 2002. GABA Receptors. *Tocris Reviews*. **20**, 1-7.
- MORRIS, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spacial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*. **11**(1), 47-60. ISSN 0165-0270.
- MUIR, G. D., 2000. Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. *Brain Research Bulletin*. **53**(5), 719-726. ISSN 0361-9230.
- NAKAJIMA, K., K. MATSUYAMA a S. MORI, 1998. Prenatal administration of para-chlorophenylalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance

of swimming movements in newborn rats. *Neuroscience Research*. **31**(2), 155-169. ISSN 0168-0102.

NAKAYAMA, K., H. NISHIMARU, M. IIZUKA, S. OZAKI a N. KUDO, 1999. Rostrocaudal progression in the development of periodic spontaneous activity in fetal rat spinal motor circuits in vitro. *Journal of Neurophysiology*. **81**(5), 2592-2595. ISSN 0022-3077.

NEJEDLÝ, K., 1965. *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.

NISHIMARU, H. a N. KUDO, 2000. Formation of the central pattern generator for locomotion in the rat and mouse. *Brain Research Bulletin*. **53**(5), 661-669. ISSN 0361-9230.

PAXINOS, G. a C. WATSON, 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. London: Academic Press. ISBN 9780125476126.

PINARD, A., R. SEDDIK a B. BETTLER, 2010. GABAB receptors. Physiological functions and mechanisms of diversity. *Advances in pharmacology*. **58**, 231-255. ISSN 1054-3589.

PORSOLT, R. D., M. LE PICHON a M. JALFRE, 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. **266**(5604), 730-732. ISSN 0028-0836.

RUSH, J. M. a F. B. GIBBERD, 1990. Baclofen-induced epilepsy. *Journal of the Royal Society of Medicine*. **83**(2), 115-116. ISSN 0141-0768.

SALAS, M., 1972. Effects of early malnutrition on the development of swimming ability in the rat. *Physiology & Behavior*. **8**(1), 119-122. ISSN 0031-9384.

SCHAPIRO, S., M. SALAS a K. VUKOVICH, 1970. Hormonal Effects on Ontogeny of Swimming Ability in the Rat: Assessment of Central Nervous Development. *Science*. **168**(3927), 147-151. ISSN 0036-8075.

SILBERNAGL, S., A. DESPOPOULOS, 2004. *Atlas fyziologie člověka*. Vydání 3. české. Praha: Grada. ISBN 80-247-0630-X.

SLÍVA, J., M. VOTAVA, 2010. *Farmakologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-424-7.

- SPERK, G., S. FURTINGER, C. SCHWARZER a S. PIRKER, 2004. GABA and its receptors in epilepsy. *Advances in experimental medicine and biology*. 548, 92-103. ISSN 0065-2598.
- SÚKL [Státní ústav pro kontrolu léčiv]. BACLOFEN-POLPHARMA 10MG, POR TBL NOB 50X10MG, Státní ústav pro kontrolu léčiv. *SUKL.cz* [online]. ]. 2010 © SÚKL [cit. 2013-07-11]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0040274&tab=texts>
- TROJAN, S., R. DRUGA, J. PFEIFFER a J. VOTAVA, 2005. *Fyziologie a léčebná rehabilitace motoriky člověka*. 3. vydání. Praha: Grada. ISBN 80-247-1296-2.
- VINAY, L., F. BEN-MABROUK, F. BROCARD, F. CLARAC, C. JEAN-XAVIER, E. PEARLSTEIN a J.- F. PFLIEGER, 2005. Perinatal Development of the Motor Systems Involved in Postural Control. *Neural Plasticity*. **12**(2-3), 131-139. ISSN 2090-5904.
- WAXHAM, M. N., 2008. Neurotransmitter Receptors. In: SQUIRE, L. R., D. BERG, F. E. BLOOM, S. DU LAC, A. GHOSH a N. C. SPITZER, eds. *Fundamental Neuroscience*. 3rd ed. Burlington: Academic Press, s. 181-203. ISBN 978-0-12374019-9.
- WEVER, E. G., 1932. Water temperature as an incentive to swimming activity in the rat. *Journal of Comparative Psychology*. **14**(2), 219-224. ISSN 0093-4127.