

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Bc. Sylva Vachovcová

**Vliv perinatální hypoxie na motorický vývoj
laboratorního potkana a možnosti ovlivnění**

Diplomová práce

Praha 2014

Autor práce: **Bc. Sylva Vachovcová**

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

Oponent práce:

Datum obhajoby: **2014**

Bibliografický záznam

VACHOVCOVÁ, Sylva. *Vliv perinatální hypoxie na motorický vývoj laboratorního potkana a možnosti ovlivnění*. Praha, 2014. Diplomová práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství. 66 s. Vedoucí práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Anotace

Závažná perinatální hypoxie tvoří podstatnou příčinu mozkového poškození u narozených dětí. Rešeršní část této Diplomové práce pojednává o krátkodobých a dlouhodobých motorických projevech laboratorního potkana, o motorických testech, pomocí kterých se motorika potkanů hodnotí, o hypoxickém působení na nezralý centrální nervový systém a o působení látek na adenosinové A₁ receptory v mozku. Cílem experimentální části Diplomové práce bylo hodnocení pozdních motorických projevů u potkanů ovlivněných perinatální hypoxií. Perinatální hypoxie byla provedena tak, že březí samice potkana byly umístěny do normobarické hypoxické komory (10 % O₂) jedenáctý den březosti, kde porodily a expozice hypoxie byla ukončena 6. den po narození mlád'at. Pro hodnocení motorického vývoje byla využita baterie koordinačně náročných motorických testů vždy adekvátních pro příslušný vývojový stupeň potkana. Perinatální hypoxie a její následky dále byly ovlivněny jednorázovou aplikací látky 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosin (CCPA), agonistou adenosinového A₁ receptoru, 14. den po narození potkanů. Postižení potkani vykazovali motorické deficity a zpoždění v motorickém vývoji ve 3 ze 4 zvolených motorických testů v porovnání s potkany z kontrolní skupiny. Tyto motorické odchylky však již nebyly zaznamenány ve vývojovém stupni rané dospělosti. Postižení potkani s aplikací látky CCPA vykazovali signifikantně lepší motorický projev proti postiženým zvířatům bez aplikace látky. Výsledky našeho výzkumu prokázaly, že perinatální hypoxie naruší motorický vývoj potkana. Zesílení adenosinergní inhibice v postnatální fázi vývoje však může částečně zabránit tomuto poškození.

Klíčová slova

laboratorní potkan, perinatální hypoxie, neurologická porucha, motorický vývoj, motorická koordinace, behaviorální test, adenosin, agonista A₁ receptoru

Annotation

Severe perinatal hypoxia represents a substantial brain injury in human newborns. This Diploma thesis is focused on long-term motor outcome of laboratory rat after moderate perinatal hypoxia. We described some behavioral test for detection motor development and presented the influence of perinatal hypoxia on central nervous system. We also discussed an effect of agonists and antagonists of adenosine A₁ receptor in brain. The aim of an experimental part was an evaluation of long-term motor behavior in rats affected by perinatal hypoxia. To cause perinatal hypoxia we put pregnant female rats to a hypoxic (10% O₂) normobaric room in 11th day of their gestation. The pregnant female rats stayed in hypoxic room until they gave a birth and 6 more days after birth with their litters. For classification of motor development we used battery of tests of motor coordination. These tests correspond to the level of development of the rat. Then a group of rats with perinatal hypoxia was treated by a single administration of an agonist of adenosine A₁ receptor 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosin (CCPA) in postnatal day 14. The animals affected by perinatal hypoxia show motor deficits in 3 from 4 selected behavioral tests. Otherwise, this motor behavior was no longer detected in young adults. The rats affected by perinatal hypoxia treated by CCPA had notably better motor behavior than the hypoxic animals without treatment. The results of our experiment demonstrate that perinatal hypoxia affect motor development of the rat. But the reinforcement of adenosinergic inhibition in postnatal period can improve the changes.

Keywords

laboratory rat, perinatal hypoxia, neurologic impairment, locomotor development, motor coordination, behavioral test, adenosine, A₁ receptor agonist

Prohlášení

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 k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 27. 4. 2014

Sylva Vachovcová

Poděkování

Děkuji panu profesoru MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za cenné rady, připomínky, návrhy, pomoc se statistickým a grafickým zpracováním dat a také za oporu, kterou mi po celou dobu vedení diplomové práce poskytoval.

Dále děkuji paní RNDr. Anně Mikulecké, PhD. za pomoc při měření v behaviorální laboratoři. Mé díky patří i ostatním pracovníkům Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR, kteří mi pomohli s technickou stránkou měření.

Ráda bych poděkovala své rodině a partnerovi za jejich podporu nejen při psaní diplomové práce, ale během celého studia.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	8
ÚVOD.....	9
1 LABORATORNÍ POTKAN	10
1.1 OBECNÉ POZNATKY	10
1.2 EMBRYONÁLNÍ A POSTNATÁLNÍ VÝVOJ POTKANA	10
1.2.1 Vývoj senzorických systémů.....	12
1.2.2 Motorický vývoj potkana.....	13
1.2.2.1 Vývoj descendentních struktur	14
1.3 MOTORICKÝ VÝVOJ POTKANA VERSUS MOTORICKÝ VÝVOJ ČLOVĚKA	19
1.4 MOTORICKÉ TESTY PRO POTKANY	21
1.4.1 Neurologické reflexy	21
1.4.2 Testy na motorickou koordinaci.....	23
1.4.3 Hodnocení motorické aktivity:.....	25
2 HYPOXIE	26
2.1 KYSLÍK A JEHO VÝZNAM PRO MOZKOVOU TKÁŇ	26
2.1.1 Autoregulace mozku.....	26
2.2 PATOFYZIOLOGIE HYPOXIE	26
2.2.1 Příčiny hypoxie	27
2.2.2 Etiologie hypoxického stavu v perinatálním období.....	27
2.2.3 Důsledky hypoxie v oblasti buňky	28
2.2.4 Hypoxické poškození a porodní váha	29
2.2.5 Poškození bílé hmoty a aferentních struktur	29
2.2.6 Vliv hypokapnie.....	30
2.2.7 Následky perinatální hypoxie.....	30
2.3 PERINATÁLNÍ HYPOXIE U LABORATORNÍHO POTKANA	31
2.4 PLASTICITA CNS V KOJENECKÉM VĚKU	32
2.4.1 Aktivace neuroplasticity	33
3 MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ NÁSLEDKŮ PERINATÁLNÍ HYPOXIE	35
3.1 FYZIOLOGIE ADENOSINU A ADENOSINOVÝCH RECEPTŮ V MOZKU	35
3.1.1 Adenosinové receptory v mozku.....	36
3.1.2 Modulační schopnost adenosinu.....	38
3.2 MODIFIKACE ADENOSINOVÉHO METABOLISMU ZA STRESOVÝCH PODMÍNEK	39
3.3 AKTIVACE A ₁ RECEPTŮ PŘI AKUTNÍ NEURODEGENERACI	41
3.4 VÝZNAM A ₁ RECEPTŮ V MOZKU BĚHEM PRENATÁLNÍHO A ČASNÉHO POSTNATÁLNÍHO OBDOBÍ.....	42
3.4.1 A ₁ receptory a periventrikulární postižení bílé hmoty.....	43
4 CÍLE A HYPOTÉZY	46
5 METODIKA VÝZKUMNÉ ČÁSTI DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	48
5.1 PERINATÁLNÍ HYPOXIE	49
5.2 APLIKACE LÁTKY	49
5.3 TESTY MOTORICKÝCH DOVEDNOSTÍ.....	49
5.3.1 Balance beam test.....	50
5.3.2 Ascending ladder test.....	50
5.3.3 Horizontal ladder rung walking test.....	51
5.3.4 Rotarod test.....	51
5.3.5 Bar holding test.....	51
5.3.6 Statistické zpracování dat	52
6 VÝSLEDKY	53
6.1 HMOTNOST	53
6.2 BALANCE BEAM TEST	54
6.2.1 Čas.....	54

6.2.2	Chyby	55
6.2.3	Subjektivní hodnocení kvality pohybu	56
6.3	ASCENDING LADDER TEST.....	57
6.3.1	Čas.....	58
6.3.2	Chyby	58
6.3.3	Subjektivní hodnocení kvality pohybu	59
6.4	HORIZONTAL LADDER RUNG WALKING TEST - PRAVIDELNÝ TYP	60
6.4.1	Čas.....	60
6.4.2	Chyby	60
6.5	HORIZONTAL LADDER RUNG WALKING TEST – NEPRAVIDELNÝ TYP.....	61
6.5.1	Čas.....	62
6.5.2	Chyby	62
6.6	BAR HOLDING TEST	63
6.6.1	Subjektivní hodnocení kvality pohybu	64
6.7	ROTAROD TEST	66
6.7.1	Neonatální období od P15 do P21	66
6.7.2	Raná dospělost (P60).....	68
6.7.3	Subjektivní hodnocení kvality pohybu	69
6.8	TESTOVÁNÍ HYPOTÉZ	70
7	DISKUSE	71
	ZÁVĚRY	80
	REFERENCE.....	83
	SEZNAM PŘÍLOH..... CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	90
	PŘÍLOHY CHYBA! ZÁLOŽKA NENÍ DEFINOVÁNA.	91

SEZNAM ZKRATEK

ADAC – N⁶-[4-[[[(2-aminoethyl)-amino] carbonylmethyl]phenyl]adenosine

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosintrifosfát

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

C – kontrolní skupina

cAPM – cyklický adenosinmonofosfát

CCPA - 2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosin

CPA - N⁶-cyclopentyladenosin

CPGs - central pattern generators (generátory programového vzorce)

CNS – centrální nervový systém

DMO – dětská mozková obrna

DPCPX - 8-cyklopentyl-1,3-dipropyl xantine

GABA - kyselina γ -aminotmáselná

H – skupina ovlivněná perinatální hypoxií

HIE - hypoxicko-ischemická encefalopatie

HP – skupina ovlivněná perinatální hypoxií s aplikací CCPA

NMDA - N-methyl-D-aspartát

NS - nervový systém

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

P0 = den narození, postnatální den 0

PD 81,273 - 2-amino-3-benzoylthiophen

PK – přední končetina

PKK – přední končetiny

PVL – periventrikulární malacie

ZK – zadní končetina

ZKK – zadní končetiny

Poznámka: Pro označení dnů postnatálního vývoje jsme využili značení zkratkou Px, kde P značí postnatální období a x den, ve kterém mládě dosáhlo věku x, přičemž den narození je označen jako P0.

ÚVOD

Perinatální hypoxie představuje závažnou hrozbu poškození centrální nervové soustavy s výraznými neurologickými deficity u novorozených dětí. Nejvíce ohroženou skupinou jsou předčasně narozené děti s nízkou porodní váhou. Pomocí vyspělé neonatální péče se trvale snižuje věk předčasně narozených dětí, které přežívají. Je proto potřeba více věnovat pozornost i vývojově mladším modelům perinatální hypoxie a zkoumat specifika jejich neurobehaviorálních poruch.

Mezi nejčastěji využívané laboratorní zvíře patří laboratorní potkan. A to nejen pro množství fyziologických, biochemických, morfologických údajů o tomto druhu a člověku obdobné fyziologii cerebrovaskulární cirkulace, ale i proto, že potkan je vhodným živočišným druhem pro vývojové studie (relativně krátká březost a velký počet mláďat v jednom vrhu). Navíc mládě potkana má při narození ještě nezralejší nervový a motorický systém než lidský novorozenec. Proto na novorozených potkanech lze sledovat v několika prvních dnech života vývojový proces, jenž u lidské nervové soustavy probíhá v prenatální fázi života. Pro posouzení neurologických poruch a behaviorálních nedostatků se využívá znalostí motorického vývoje potkana, což vytváří bázi pro vznik a výklad motorických testů.

Tématem o vlivu perinatální hypoxie na motorický vývoj laboratorního potkana jsem se zabývala v mé bakalářské práci „Vliv perinatální hypoxie na motorický vývoj laboratorního potkana“ (Vachovcová, 2012). Tyto poznatky jsem ve své diplomové práci rozšířila o praktickou část, jež se zabývala motorickým výstupem perinatální hypoxií ovlivněných mláďat potkanů v různých fázích jejich motorického vývoje. Dalším cílem praktické části bylo zkoumání vlivu jednorázové aplikace 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosinu (CCPA), agonisty A_1 receptoru, na vývojové změny v motorickém chování mláďat laboratorních potkanů ovlivněných perinatální hypoxií.

Obor fyzioterapie se může zdát vzdálený od zkoumání přímého působení perinatální hypoxie na zvířecí organismus. Tento dojem je však relativní, neboť fyzioterapie je nedílnou součástí multidisciplinárního týmu, který se snaží o pacienty po hypoxicko-ischemickém inzultu pečovat. Častými pacienty fyzioterapeuta jsou právě pacienti s následky perinatální hypoxie, kvůli kterým je stále více důležité zvířecí modely perinatální hypoxie zkoumat.

1 Laboratorní potkan

1.1 Obecné poznatky

Laboratorní potkan je nejvíce užívaným zvířetem pro výzkumné práce (Baker et al., 1980). Řadí se k velmi dobře fyziologicky, anatomicky i farmakologicky prostudovaným savcům (Clarac et al., 1998). Potkan je i vhodným zvířetem z hlediska manipulace a chovu (Baker et al., 1980). Na pracovišti Fyziologického ústavu Akademie věd ČR se nejčastěji využívá albinotický kmen Wistar.

Potkan je vhodným živočichem také ve vývojových biomedicínských studiích (Clarac et al., 1998), neboť potkani se mohou množit během celého roku. K tomu přispívá i fakt, že samice potkana je březí 22-23 dní a v jednom vrhu se rodí 10 a více mláďat (Franěk et al., 2009, s. 16). Důležité vývojové fáze probíhají cca ve 3 týdnech gestace a cca ve 3 týdnech po narození (Clarack et al., 1998). Pro vývojové studie se oproti např. morčeti laboratorní potkan hodí i z důvodů nezralého centrálního nervového systému (CNS), se kterým se mláďata potkana rodí (Calamandrei, 2004; Clarac et al., 1998; Vinay et al., 2005). Nezralost CNS je typická i pro lidského novorozence a zkoumání motorického vývoje potkana může být přínosné pro poznání neurofyziologie a patofyziologie motoriky člověka (Vinay et al., 2005). Nervový systém potkana je v době jeho narození méně vyzářlý než u člověka (Stadlin et al., 2003, Gramsbergen, 1998). Lze tak vytvořit zvířecí modely, které reprezentují stupeň zralosti CNS i v prenatalním období člověka (Gramsbergen, 1998).

Ve výzkumu na zvířatech je potřeba počítat s tím, že každý věk zvířete obnáší různou neurovývojovou zralost. Je nutné myslet na rozdíly mezi vývojově nezralou a zralou populací, kde dochází ke změnám neurofyziologických procesů v průběhu zrání (McCuthceon et Marinelli, 2009). Tím, že poznáme proces motorického vývoje, můžeme zhodnotit jednotlivé vnitřní či vnější vlivy (např. podání léčiva) na další neuronální vývoj (Calamandrei, 2004).

1.2 Embryonální a postnatální vývoj potkana

Vývoj motorického chování je výsledkem působení prostředí a genetických faktorů. V ontogenezi se vyskytuje několik kritických úseků, při nichž dochází k postupnému zrání CNS. Změny lze především sledovat na vývoji axonálních a dendritických větví, na formaci synapsí, na vývoji receptorů, iontových kanálů, na

chemickém složení mozkomíšního moku, na změnách v hormonálním působení (Clarac et al., 1998).

V prenatalní fázi vývoje se vytvářejí a diferencují progenitorové buňky, které migrují do míst, kde přetrvávají. Větvení dendritů a axonů, které tvoří mezi sebou synaptické spoje, vytváří síť, jež v sobě udržují zakódované informace po celý život. Nadměrný počet neuronů a synapsí se redukuje (apoptózou) přibližně na polovinu krátce před narozením. Další stádium eliminací buněčných spojů, které následuje po výrazném přesahu synaptických spojů a receptorových jednotek, probíhá v pubertě (Andersen, 2003).

Když se potkan narodí (den narození se označuje jako P0), je slepý, hluchý (Clarac et al., 1998), holý (Jamon et al., 2006) a nedokáže regulovat svou tělesnou teplotu (Calamandrei, 2004). Důležitým smyslovým orgánem, podle kterého se potkan v prvních dnech života orientuje, je čich a vestibulární aparát (Clarac et al., 1998).

Ve dvou prvních týdnech života je aktivita mláďat omezena na krmení (Calamandrei, 2004) a spánek (Clarac et al., 1998). Následkem limitované lokomoční schopnosti se mláďata nacházejí ve shluku svých sourozenců v teplé zóně pod matkou (Calamandrei, 2004). Potkan začne vidět kolem 13-14. postnatálního dne (P13-14). Předtím je už schopný chůze (Altman et Sudarshan, 1975).

Zvířata po 2 týdnech života začínají objevovat okolí. Po 21. postnatálním dni (P21) dochází k ukončení kojeneckého období. S vývojem zraku a sluchu se v tomto období zvyšuje rozmanitost chování a zvyrazňuje se hyperaktivita. Objevuje se chování více podobné dospělým potkanům (Calamandrei, 2004). V této době probíhá myelinizace vláken šedé hmoty a primárních motorických a senzoryckých částí mozku (Counotte et al., 2011).

Krátce nato začíná sexuální zrání (McCuthceon a Marinelli, 2009). V této fázi vývoje dochází k další redukci synaptických spojů (Andersen, 2003). Počátek adolescence u potkana nastává kolem 25. postnatálního dne (P25) a končí okolo 50. dne po narození (P50). Primární senzomotorické oblasti, důležité pro základní přežití, se vytvářejí dříve, než asociační oblasti kůry jako je prefrontální oblast, jež uchovává složitější senzomotorické děje. Nižší motorické a senzorycké části kůry jsou určující pro vznik vyšších asociačních oblastí. Jejich propojenost je během maturace proměnlivá, což se zrcadlí ve změnách chování zvířete. V adolescenci potkana probíhá myelinizace corpus calosum, která se datuje od 21. dne do 56. dne života (P21-56), (Counotte et al., 2011).

Věk sexuální zralosti, počátek adolescence, má interindividuální odchylky. Sexuální zralost u samic je datována přibližně na 32-34. den po narození, u samců je to skoro o 14 dní později, kolem 45-48. dne po narození (McCuthceon et Marinelli, 2009). V tomto období lze sledovat další změnu chování v podobě sociální hry a riskantnějšího vystupování. To zůstává až do rané dospělosti, která se popisuje v 8. postnatálním týdnu (McCuthceon et Marinelli, 2009).

1.2.1 Vývoj senzorických systémů

Čich se výrazně vyvíjí prenatálně (Clarac 1998, Calamadre 2004). Přestože je při narození stále nezralý, je hlavním senzorickým smyslem, podle kterého se mláďata v prvních dnech po narození orientují. Oproti dospělým potkanům nejsou mláďata schopná rozlišit jemné odchylky ve vůních z důvodů nedostatečného počtu synaptických spojů mezi granulózními a mitrálními buňkami, což může být příčinou nepoznání jiné matky v hnízdě (Clarac, 1998).

Vývoj vestibulárního systému včetně vestibulospinálních drah je nezbytný pro pohybovou maturaci a efektivní lokomoci. Vestibulární systém napomáhá zvířatům udržet rovnováhu během pohybu. Což v tomto případě znamená, že jsou schopna udržet vzpřímenou polohu pomocí posturálních svalů trupu a končetin během lokomoce (Muir, 2000). Vývoj vestibulárního aparátu je datován od 8., 9. dne embryonálního vývoje potkana. Při narození je vestibulární aparát také nevyvinutý, přesto patří spolu s čichem mezi senzorické smysly, jež napomáhají slepému a hluchému mláděti dostat se ke zdroji obživy, k matce (Clarac et al., 1998). Vestibulospinální neurony dosahují horní lumbální části míchy před narozením a jejich projekce pokračuje během dalších 2 postnatálních týdnů. Ve 3. postnatálním týdnu se vytváří finální anatomie receptoro-aférentního-eférentního komplexu (Brocard et al., 1999, Clarac 1998).

Všechny důležité kožní typy receptorů s projekcí jejich primárních aferentních jednotek do zadních míšních rohů jsou vyvinuty během narození. Synaptické spoje mezi kožními aferentními dráhami a buňkami v CNS jsou nezralé v prvních dnech života potkana (Brocard et al., 1999).

Vývoj propriocepce a tedy senzomotorické reakce v podobě některých reflexů lze vidět již v embryonálním stádiu potkana. V embryonálním vývoji se v 16,5. dni objevuje monosynaptický reflex, avšak s dlouhou latencí v motorické odpovědi. V 18,5. dni embryonálního vývoje je motorická odpověď rychlejší vlivem vyšší rychlosti vedení vzruchu axony a lepším monosynaptickým přenosem (Clarac et al., 1998).

Pravý monosynaptický reflex je možno vyvolat až krátce před narozením. 18. den fetálního období lze proto sledovat odpověď plantární oblasti na centrální stimul. Svalová vřetýnka jsou zaznamenána od 19,5. dne gestace, zralost intrafuzálních vláken se však datuje až na 12. den po narození (P12). Proprioceptivní systém se tedy prvně vyvíjí centrálně během embryonální fáze a až později periferně – v úrovni svalových vřetýnek. Vlákná zadních kořenů začínají dosahovat zadního rohu míšního v oblasti lumbální míchy v 15,5. embryonálním dni, intermediální oblasti o jeden den později a motorických jader o dva dny později. Aferentní vstupy jsou důležité pro posílení a zjemnění výstupů míšního lokomočního generátoru (Clarac et al., 2004).

Funkčnost sluchu se vyskytuje v P12, ve kterém dochází k otvírání zevních zvukovodů (Clarac et al., 1998).

Jako další sensorický smysl využívaný k orientaci přichází zrak, jenž se do funkce plně zapojí až při otevření očních štěrbin mezi 12-15. dnem života (P12-15) potkana (Altman, Sudarshan, 1975; Clarac et al., 1998; Lelard et al. 2006). Integrace vestibulárních informací s vizuálními a proprioceptivními informacemi budují trojdimenzionální zpodobnění pohybu hlavy a těla v prostoru (Clarac, 1998).

1.2.2 Motorický vývoj potkana

Motorický vývoj je závislý na dozrávání mnoha systémů (muskulo-skeletální systém, senzomotorický systém, vyšší mozková centra, dráhy sestupující do spinální míchy a vzestupné dráhy přinášející informace), (Clarac et al., 2004). Rozvoj motorických schopností však neprobíhá paralelně s neuroanatomickými změnami. Během narození nejsou zralé všechny struktury, jež jsou základem pro lokomoci a vyvíjejí se dále i po té, co zvířata dosáhnou dospělého vzoru chůze. Naopak základní části lokomoce jsou přítomny krátce po narození, přesto nejsou reflektovány ve spontánní motorice mláďat (Jamon, 2006). Vyzrání lokomoce potkana má nelineární obraz, který může být rozdělen do 3 stádií před dovršením dospělosti (Clarac et al., 2004).

Fetální stádium se objevuje kolem 15. dne gestace, kdy se motoneurony stávají dráždivými a začínají fungovat spinální okruhy. Nezralé stádium začíná narozením mláďete, kdy spinální okruhy umí produkovat střídavou rytmickou aktivitu, přestože je přítomná nedostačující posturální kontrola. Maturace postury výrazně probíhá v prvním 1,5 týdnu života potkana (P0-10) a v této vývojové fázi lze sledovat nekomplexní posturální chování. Přechodová fáze je datována od P10-15, během níž dochází

k otevření očí a zvíře vymění nezralé motorické chování za dospělé. Další vývoj však není ještě ukončen (Clarac et al., 2004).

1.2.2.1 Vývoj descendentních struktur

Jak už bylo výše zmíněno, mláďata potkana stejně jako člověk se rodí motoricky nezralá (Vinay et al., 2005). První descendentní dráhy mezi mozkovým kmenem a míchou jsou evidentní týden před narozením. Příchod GABAergních (dráhy kyseliny γ -aminomáselné), serotoninergních a noradrenergických retikulospinálních drah do lumbální oblasti je datován mezi 15-18. embryonálním dnem. V podobný čas dorůstá i vestibulospinální dráha, kdežto rubrospinální dráha se vyvíjí až kolem narození. Během 1. postnatálního týdne dozrávají dráhy ve ventrálním funikulu, které jsou zahrnuty do posturální kontroly a lokomoce. Kortikospinální dráha dosahuje krční míchy 3. den, lumbální míchy až 6. den po narození. Postupný příchod descendentních struktur do lumbální intumescence naznačuje, že supraspinální kontrola v období narození se uplatňuje primárně na proximální svaly, místo toho kontrola distálních částí svalů se zvyšuje během prvních dnů po narození. Posturální mechanismy zrají v proximodistálním gradientu (Clarac et al., 2004) a antero-posteriorním gradientu (Jamon, 2006).

1.2.2.2 Vývoj dráždivosti motoneuronů

Lumbální motoneurony se stávají dráždivými od 15. embryonálního dne, kdy lze pozorovat aktivaci sodíkových kanálů s prahovou úrovní -31 mV, jež se postupně zlepšuje na -47 mV v 1-3. postnatálním dni. Progresivní vývoj draselného toku, jenž zkrátí vápenatý tok, začíná před narozením a pokračuje první týden po narození. Během této doby se zkracuje akční potenciál a motoneuronová repolarizace se stává výraznější (Clarac et al., 2004).

Maturace neuromuskulárních spojů je také důležitý faktor ve vyjádření jemných lokomočních pohybů. Svalová vlákna jsou během 2. postnatálního týdne stále inervovaná z více motoneuronů (Clarac et al., 2004), což může být zdrojem trupové nestability během chůze (Jamon, 2006). Během dalšího týdne nastává progresivní změna v podobě unimodální inervace a v podobě separace svalových vláken do relativně odlišných typů (slow-oxidative, fast-glycolytic, fast-oxidative-glycolytic). Konverze v inervaci a diferenciaci svalových vláken se vyskytují dříve ve flexorových později v extenzorových svalových skupinách. Postnatální zrání je jeden z limitujících

faktorů, jenž zabraňuje expresi plného rozsahu lokomočních projevů (Clarac et al., 2004).

1.2.2.3 Vývoj postury

Po narození se mláďata nacházejí v pronační pozici (Vinay et al., 2005, Lelard 2006), a jsou-li izolována od matky, nachází se v pozici s hlavou na podložce, kde mají extendované všechny 4 končetiny od hlavní osy těla. Potkan však v této fázi vývoje je schopný využít laterální pohyby těla a při jeho umístění na záda se dokáže narovnat (Clarac et al., 1998). Není však schopný se napřímit a pohybovat se (Altman et Sudarshan, 1975).

Posturální kontrola je značně nezralá u novorozených potkanů a pozvolně vyzrává během prvních týdnů života (Lelard et al., 2006) Nejvýraznější vývoj můžeme zaznamenat v 1. týdnu života (Vinay et al., 2005). Vzpřimovací mechanismy maturují v rostrokaudálním a proximodistálním směru (Altman a Sudarshan, 1975; Brocard et al., 1999; Clarac et al., 1998; Lelard et al., 2006; Vinay et al., 2005).

Dřívější vývoj předních končetin souvisí s udržení sací pozice při kojení (Altman, Sudarshan, 1975). Od 2. dne života je potkan občas schopný na krátkou dobu nadzvednout hlavu (Vinay et al., 2005). Dlouhodoběji hlavu nad zemí udrží teprve od 8. dne po narození (Lelard et al., 2006). Více než polovinu času s hlavou nad podložkou potkani tráví až od 12. dne života (Altman, Sudarshan, 1975). Ke změně způsobu držení a pohybu hlavy dochází v závislosti na rozvoji orientace pomocí zraku. Ještě slepý potkan není schopný izolovat pohyb hlavy vůči páteři (Lelard et al., 2006).

K napřímení a zdvižení hlavy je však zapotřebí vývoj stabilní opory o přední končetiny (PKK). Koncem prvního postnatálního týdne (P5) potkan udrží ramena nad zemí díky zapojení funkce předních končetin. Opora o intermediální klouby a více distální část PKK se objevuje 7. den (P7) a opora o tlapky a prsty o den později (Altman et Sudarshan, 1975). 8. den potkan udrží vzpřímená ramena nad podložkou většinu času a končetiny posune blíže k ose těla (Lelard et al., 2006). Od 9. dne života (P9) potkan zvedá přední část trupu za podpory celých PKK a hlava může být vytažená vysoko do tzv. větrící polohy (sniffing). 12. den po narození mohou mláďata nadlehčit jednu přední končetinu od podložky bez ztráty rovnováhy. V rámci vývoje opory o PKK nejdřív objevuje koordinace trupu, pak přichází fázická odpověď PKK, a v poslední řadě se vyskytuje funkční zapojení prstů PKK (Altman, Sudarshan, 1975).

Posturální funkce zadních končetin potkana se vyvíjí již první postnatální týden a souvisí s příchodem supraspinálních sestupných drah do lumbální části míchy (Brocard et al., 2004, Vinay et al., 2006). Vzpřimování pomocí zadních končetin (ZKK) však začíná až ve druhém postnatálním týdnu, ve kterém akceleruje vyžívání funkce ZKK, které jsou schopné nést váhu zadní části trupu (Clarac et al. 1998). Oporu o akrální část ZKK lze sledovat od 10. dne života. 12. den je zvíře schopné kontrolovat selektivní pohyb prstů ZKK (Altman, Sudarshan, 1975). 13. den (P13) jsou do podpěry trupu plně zapojeny ZKK, pánev je elevována nad podložku (Lelard et al., 2006).

Altman a Sudarshan (1975) se ve své studii zabývali vývojem dynamické postury v prvních týdnech života potkana. Při jejím zkoumání byli potkani pasivně umístěni do určité polohy, která je donutila posturálně reagovat. K testování posturální dynamiky využili: surface lifting test, mid-air righting test, test pozitivní geotaxe, cliff avoidance test, Bar holding test. O této části vývoje se dále více zmíníme v kapitole 1.4.1.

Gramsbergen (1998) ve své práci s využitím EMG registrace částečně popírá hypotézu, že v souvislosti s výskytem plynulého vzoru chůze (P15-16) se objevuje i kvalitní posturální kontrola. Autor popisuje, že do 11. dne života (P11) potkana lze sledovat nedostatečně vyvinutou koordinovanou posturální kontrolu trupu během lokomoce. Od P15 se pravidelněji objevuje aktivita trupových svalů. Nicméně, dokončený vývoj posturální kontroly se objevuje až v P21, což pozorujeme 5-6 dní po výskytu dospělého typu chůze (Gramsbergen, 1998). Lelard et al. (2006) ve své studii založené na výzkumu posturální kontroly pomocí rentgenového snímání v jednotlivých fázích posturálního vývoje uvádějí, že klidová poloha zvířete se vývojově mění. Naopak konfigurace skeletu se během vývoje nemění a potkan se rodí s dospělou skeletální posturou v oblasti hlavy i páteře. Překvapivě ani deprivace vestibulárních, proprioceptivních a vizuálních informací nemění skeletální konfiguraci během vývoje, působí však na zpožděný výskyt komplexních motorických dovedností. Autoři se domnívají, že zralá skeletální konfigurace v době narození potkana je nezbytná pro prvotní motorický repertoár (napřímení, získání matčiny bradavky), (Lelard et al., 2006).

1.2.2.4 Vývoj lokomoce

Různé části mozku zahajují a kontrolují typ pohybu (rychlost, chůze atd.) pomocí descendentních drah, které nejsou při lokomoci rovnocenně využívány.

Retikulospinální dráha nastavuje posturální svaly a produkuje základní motorickou aktivitu. Vestibulospinální dráha udržuje rovnováhu. Rubrospinální dráha je zodpovědná za přesné a automatické pohyby. A kortikospinální dráhy jsou důležité pro jemnou a přesnou úpravu volního pohybu (Jamon, 2006).

První motorické projevy lze u potkana sledovat již intrauterině. Plod potkana dokáže udělat laterální pohyby trupu a intermitentně je schopný vykonat izolované pohyby končetinou. První koordinační schopnost lze zaznamenat 20. den gestace (Gramsbergen, 1998). Motorické projevy po narození lze zaznamenat v podobě rytmických střídavých pohybů (Clarac et al. 1998), které lze vygenerovat v rámci spinálních okruhů (Muir, 2000). Tyto centrální okruhy nižšího stupně, často nazývané jako generátory programového vzorce (central pattern generators – CPGs), produkují změny mezi funkčně antagonistickými svaly (Clarac et al., 2004). CPG lokalizované v C7-T1 kontrolují PKK a CPG lokalizované v L1-L5 podmiňují ZKK. CPGs jsou tvořeny ze 2 laterálních hemineurálních sítí, které rytmicky stimulují motoneurony prostřednictvím glutaminergních synapsí a inhibují motoneurony ipsilaterálních antagonistických a kontralaterálních agonistických svalů přes glycinergní komisurální interneurony (Jamon, 2006). CPG je spouštěn vnitřními stimuly vyšších nervových struktur a/nebo vnějšími senzory vstupy. Tyto okruhy jsou tedy neustále koordinovány podle centrálních a periferních zpětnovazebných okruhů, které jsou nezbytné pro adaptaci organismu na vnější prostředí. Tuto lokomoční aktivitu přítomnou ihned po narození můžeme sledovat u narozeného potkana při plavání anebo v krokovém automatismu, když je potkan zavěšený ve vzduchu (air stepping). Tento lokomoční vzor je přítomný, přestože posturální kontrola není zralá. Plavání i air stepping jsou varianty pohybu, kterým nebrání posturální překážky. To dokazuje, že v této době jsou míšní okruhy schopné generovat střídavé pohyby a je přítomná supraspinální kontrola (Muir et al., 2000). Protože však nejsou přítomny posturální mechanismy, lokomoce se nemůže dosud efektivně uskutečnit (Clarac et al., 1998). Lokomoční pohyb blízký primitivním rytmickým pohybům lze vyvolat, když je zvíře vystavené silné čichové stimulaci (vůni matky), (Clarac et al., 2004). Čichová stimulace je schopná u mláďat vyvolat air stepping i dokonce chůzi po zemi. Ve věku P3-P9 lze podmínit lokomoční aktivitu s došlápnutím celých chodidel (Clarac et al., 2004). Mláďata vykazují silné tendence se pohybovat k vůni hnízda již 3. den po narození. Tato motorická reakce podobná chůzi je charakterizovaná zvednutím břicha a silným

koordinovaným odstrkováním končetin, což dokazuje, že mláďata jsou schopná pohybu daleko předtím, než to ukazují ve spontánní motorice (Jamon, 2006).

Po narození je hlavní aktivita potkana zaměřena na spaní, příjem potravy a hledání matčiny bradavky, kde se nachází jediný zdroj obživy (Clarac et al. 1998). Mládě se orientuje pomocí čichu, hmatu a tepelných receptorů (Calamandrei, 2004).

V tomto období lze sledovat jemné laterální pohyby hlavy (Clarac et al., 1998). Do P15 je potkan schopný hýbat hlavou pouze ve chvílích, kdy nechodí (Gramsbergen, 1998). Po otevření očí lze pozorovat selektivní hybnost v atlantookcipitálním skloubení (Lelard et al., 2006).

První spontánní pohyby PKK se častěji objevují až 4-5. den po narození (P4-5). V těchto raných pohybech, které se označují jako pivotování, se ještě nevyskytuje diferencovaný pohyb segmentů PKK a ty v tomto případě fungují jako pádla. ZKK s pánví se koordinovaně pohybu neúčastní, jsou pasivně taženy a fungují jako kotva, která zabraňuje sklouznutí nazad. Propulze PKK v tomto pohybu je minimální a směr pohybu je otáčivý. Pivotování se vyvíjí od primitivního „odpichování“ po více diferencované „šlapání“ se zdviženou hlavou. Pivotování lze nejvíce sledovat na konci prvního týdne (Altman et Sudarshan, 1975).

Po pivotování následuje schopnost plazení, které se objevuje v P8 (Altman et Sudarshan, 1975). Clarac et al. (2004) však ve své práci popisují nekoordinované plazení již od narození a Muir (2000) udává tuto schopnost od P4. V P8 je již hlava zdvižena nad zemí na několik vteřin. Prsty PKK jsou od sebe odděleny a flektovány, když jsou v opoře. ZKK zůstávají někdy neaktivní, což je příčina pohybové změny na pivotování, chvílemi však provádějí pohyby podobné veslování a mládě se tak může plazit. Často však ZKK nestíhají udržet krok s PKK a jsou pasivně taženy za tělem. K diferenciaci prstů ZKK dochází v P10-11. Prsty poskytují lepší oporu i odraz (Altman et Sudarshan, 1975).

V P12 můžeme u mláďat vidět vzpřímenou polohu na všech čtyřech končetinách a vyskytuje se chůze (Altman a Sudarshan, 1975; Clarac et al., 2004; Lelard et al. 2006). Pohyby končetin jsou však ještě pomalé s nedostatečnou kontrolou trupu (Clarac et al., 1998), ZKK často uklouznou. Až po otevření očí (P14-15) lze pozorovat zralý typ chůze. V P16 chůzi nahrazuje běh (Altman et Sudarshan, 1975).

Od P14 lze také pozorovat začátek vertikálních pohybů. Tzv. rearing, kdy zvíře sedí na ZKK a využívá PKK k manipulaci (Altman et Sudarshan, 1975, Clarac et al., 2004). Tyto nové motorické dovednosti jsou více komplexní, ladnější a ekonomičtější.

Zkracuje se čas krokového cyklu z více než 1400 ms mezi P11-14 na 600 ms v P15-16. Poté dochází ke komplexnímu motorickému vzoru, který zahrnuje chůzi v Rotarod testu, bar walking testu, či ladder walking testu (viz kapitola 1.4.2), (Clarac et al., 2004).

U primitivního plavání jsou aktivní pouze PKK a rytmický cyklický pohyb trvá 1 ms. Za 24 hodin jsou při plavání aktivní všechny 4 končetiny se střídavým zapojením ipsilaterálních a kontralaterálních končetin v synchronizovaném zkříženém vzoru. Dospělý vzor plavání, jenž je omezen na propulzní aktivitu ZKK, zatímco PKK fungují jako kormidla, se objevuje mezi P12-15. Ve 3. týdnu je čas rytmického pohybu ZKK redukován na 300 ms (Clarac et al., 2004).

S vývojem lokomoce souvisí rozvoj spontánní aktivity v testu open field. První postnatální týden zvířata nebyla schopná urazit prakticky žádnou vzdálenost. 2. týden se jejich hybnost při možnosti plazení lehce zvýšila. Nejvýraznější aktivita však přišla až s chůzí, s během a při zrakové kontrole, čili počátkem 3. týdne, kdy lze u zvířat sledovat větší potřebu prozkoumávat okolí. Zajímavé je i to, že zvýšené motorické chování se ukázalo jen u potkanů, kteří se mohli pohybovat po jistém povrchu. Naopak na kluzké zemi se spontánní hybnost zvyšovala jen nepatrně z důvodů balančně náročnějších podmínek. Aktivita narůstala až do 21. dne života. Tato skutečnost je důkazem stále dozrávajících lokomočních dovedností (Altman et Sudarshan, 1975). Bez plně funkčního motorického výstupu, motorické kontroly a posturální kontroly nemůže vzniknout dospělý vzor lokomoce (Jamon, 2006).

Není pochyb o tom, že reorganizace a upřesňování počátečně založených nervových spojů (neúčinně zvládajících posturální požadavky) jsou limitujícími faktory, které způsobují zpožděný motorický výstup u neonatálních potkanů (Jamon, 2006). Pozoruhodné je však to, že se tím nevysvětluje, proč určité motorické schopnosti lze při změněných podmínkách vyvolat dříve (čichový stimul, test negativní geotaxe viz kap. 1.4.1), než se objevují v přirozeném prostředí. Z toho lze jen usuzovat, že určité neurální okruhy jsou zralé daleko předtím, než vidíme v samovolné hybnosti mladých potkanů (Altman et Sudarshan, 1975).

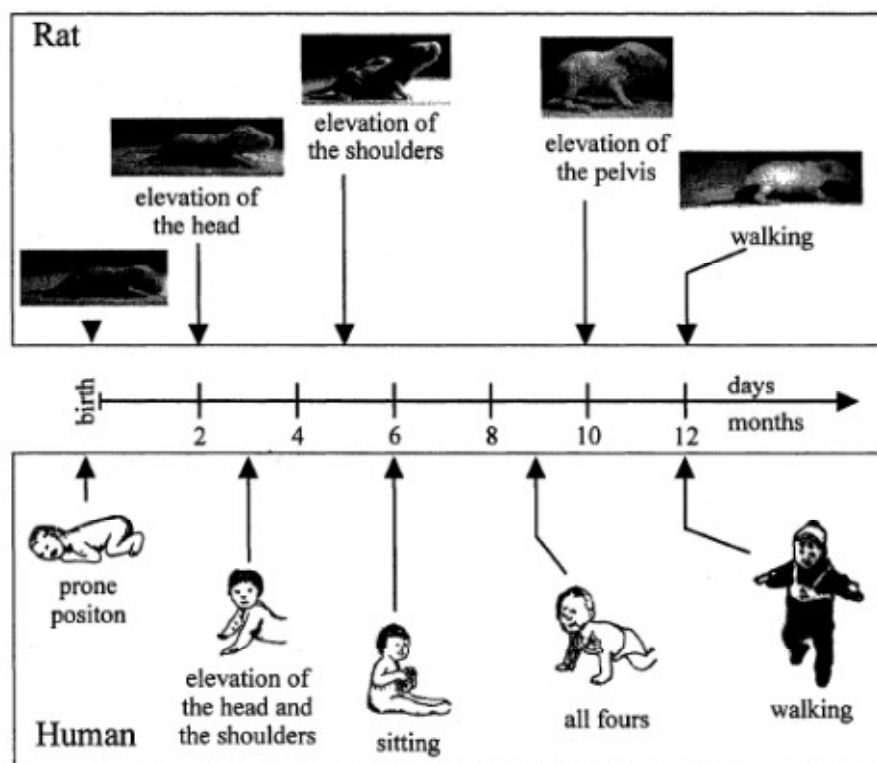
1.3 Motorický vývoj potkana versus motorický vývoj člověka

Jeden den starý potkan dosahuje stupně centrální zralosti, která odpovídá 18-20 týdnům gestačního věku u člověka. V tomto stupni zralosti člověk nepřežívá (Stadlin et al., 2003). Tři dny starý potkan reprezentuje období, ve kterém se vytváří bílá hmota s axonálním sproutingem. U člověka se tato zralost nervové soustavy objevuje ve 24-28

týdnech gestace. 7. postnatální den potkana v CNS člověka pozorujeme ve 30. – 34. týdnu. Tento model je nejvíce používaný pro studium neonatální hypoxie (Tai et al., 2009). Do stupně zralosti CNS, jenž je srovnatelný s lidským jedincem narozeným v termínu (36. – 40. gestační týden), se potkani dostávají okolo desátého dne po narození (Yager et Thornhill, 1997).

Přestože se motorický vývoj potkana různí od toho lidského a to zejména vlivem rozličné délky prenatální a postnatální fáze vývoje, lze mezi nimi najít určité podobnosti. Dítě se rodí po 9 měsících prenatálního vývoje, u potkana embryonální vývoj trvá 3 týdny. Člověk dosahuje dospělosti okolo 20. roku, zatímco u potkana se nejvíce vývojových změn odehraje v dalších 3 týdnech postnatálního života. Jistou analogii v postnatálním motorickém vývoji těchto dvou druhů lze monitorovat tím, že vezmeme na vědomí, že jeden den motorického vývoje u potkana do určitého stupně koresponduje s 1 měsícem motorického zrání u člověka. Tuto stupnici však nelze aplikovat v prenatálním vývoji, kde je potřeba využít jiného měřítka. Vrchol neurogeneze, jež je u potkana datována ve 12-13. embryonálním dni, lze u lidského fétu vidět 43. den gestace (Vinay et al., 2005).

Jinak vývojovou podobnost lze sledovat za prvé v tom, že člověk i potkan se z motorického hlediska rodí výrazně nezralí. Dále motorický vývoj lze u obou druhů popsat v rostrokaudálním směru. Potkan je 2. den po narození schopný zvednout hlavu a krátce ji udržet nad zemí (Vinay et al., 2005). Tuto schopnost lze u kojence zaznamenat ve 2. měsíci života (Kolář et al., 2009). Vinay et al. (2005) ve své práci popisují důležitost 1. postnatálního týdne v motorickém vývoji potkana, neboť v tomto období dochází k zásadnímu sestupu descendentních drah do lumbální míchy. Autoři tuto fázi vývoje připodobňují čtvrtému měsíci ontogenetického postnatálního vývoje u člověka. Točení se kolem vlastní osy pomocí horních končetin, tzv. pivotování lze u člověka datovat začátkem 7. měsíce (Cíbochová, 2004). U potkana tato motorická dovednost vrcholí koncem prvního postnatálního týdne. Kvadrupedální chůze do motoriky potkana vstupuje 12. den života (Altman a Sudershan, 1975). U dítěte lze bipedální chůzi monitorovat ve 12-14. měsíci (Kolář et al., 2009, s. 104 – 105). U obou druhů není chůze v této fázi vývoje podobná chůzi dospělého jedince. A stejně jako u potkana i u člověka dochází k dalšímu vytříbování posturální kontroly (Gramsbergen, 1998).



Obrázek 1. Vztah vývoje potkana s vývojem člověka (rat – potkan, human – člověk), (Vinay et al., 2005)

1.4 Motorické testy pro potkany

Motorický vývoj, kvantita a kvalita motorické aktivity potkanů se měří a sleduje pomocí mnoha motorických testů, které jsou sestaveny tak, aby zdůraznily a umožnily sledovat určitý typ pohybových dovedností zvířat. Některé testy se zaměřují na odhalení určitých funkčních deficitů na základě poškození NS. Pro celkovou představu všech znaků a vlastností charakterizujících zvíře se doporučuje provést více testů zacílených na rozličné schopnosti zvířete (Brooks et Dunnet, 2009).

Motorické testy, jež níže popisují, jsou většinou využívány k detekci ischemického poškození mozku. Při jejich aplikaci lze zaznamenat motorické poruchy vzniklé na základě perinatální hypoxie. Jejich pomocí lze zaznamenat, jak se tyto poruchy mění během vývoje. Mezi tyto testy se řadí hodnocení motorických reflexů, testy na motorickou koordinaci, testy na motorickou aktivitu. Většina testů má stanovený časový limit, který zajistí dostatečně krátkou dobu testování, aby zvíře neztratilo motivaci nebo se příliš neunavilo.

1.4.1 Neurologické reflexy

Testování neurologických reflexů se využívá v raném období života potkana. Jejich pomocí se získávají informace o motorickém výstupu, jež zrcadlí vývoj NS

(Woodworht et al., 2011). Nejvíce reflexů lze zaznamenat až po 7. dni od narození potkana. Narušení reflexologických výstupů se odráží na dlouhodobých funkčních odchylkách (Lubics et al., 2005).

Surface lifting test (napřímení z podložky): V tomto testu se potkan umístí do supinační polohy (poloha na zádech) a sleduje se za jakou dobu a jakým způsobem se potkan přetočí do polohy na břicho (Lubics et al., 2005). Vzprímovací mechanismy se objevují hned po narození. V prvních dnech života k tomu potkani využívají natažených končetin směrem nahoru, které pracují jako páka, dále k tomu využívají kolébacích manévřů předního a zadního trupu do stran, ventrální flexe trupu a nepatrných rotačních pohybů hlavy (Altman et Sudarshan, 1975). Potkan je schopný se postavit pomocí těchto laterálních pohybů první den života (Clarac et al., 1998). S přibývajícím věkem dochází ke změně rychlosti i provedení této posturální reakce. Postupně se zvětšuje rotace hlavy (P3-5) a přední část trupu slouží jako pomoc pro přetočení. Podpora předních končetin se objevuje v P7-8. V tuto dobu se koordinovaně přetáčí hlava, ramena i PKK, zatímco ZKK zůstávají pasivně natažené nahoru. PKK se do přetočení koordinovaně zapojí až v P11-12. Nicméně až v P13-14 je do funkce plně zapojena i akrální oblast ZKK (dorzální flexe v hlezenních kloubech, abdukce prstů). Jakmile je potkan schopný se zdárně koordinovaně přetočit ve všech částech těla, lze u něj v motorické hybnosti sledovat zralý stoj a chůzi. U starších potkanů je vzprímovací reakce tak rychlá, že je při testu není možné umístit do výchozí supinační polohy (Altman et Sudarshan, 1975).

Head lifting (zvednutí hlavy): Potkani se položí do otevřeného prostoru a sleduje se, kolikrát zvednou hlavu nad podložku (Woodworht et al., 2011). Zdravá zvířata dlouhodoběji udrží hlavu nad zemí od 2. týdne života (Lelard et al., 2006).

Mid-air righting test (zaujmutí polohy při pádu): Mid-air righting sleduje napřímení zvířete při pádu. Altman a Sudarshan (1975) nechali svá zvířata upustit z 60cm výšky na vypořádaný povrch. Posturální reakce při pádu se podobně jako v surface lifting testu objevovala v rostrokaudálním směru. Nejdříve dochází k přetočení hlavy a na závěr k přetočení i ZKK s dorzální flexí v hleznech. Úspěšně se všechna zvířata před dopadem plně napřímila až 17. den života (Altman et Sudarshan, 1975).

Test negativní geotaxe: Potkan se umístí hlavou dolů do středu nakloněné roviny (do 45°) a sleduje se, kolikátý postnatální den a za jak dlouho je zvíře schopné se přetočit o 180 °, aby poloha hlavy byla výše než ZKK. Pozitivní reakce se objevuje u všech testovaných zvířat v P5. Pozoruhodné je, že tento jev lze sledovat takto brzy,

přestože běžný projev napřímení ve spontánní kvadrupedální hybnosti lze pozorovat až od v P12. Průběh otáčení i rychlost jsou charakterizované opět věkem potkanů, v P8 je přetáčení provedeno vzápětí po umístění mláděte na nakloněnou plošinu (Altman et Sudarshan, 1975).

Cliff avoidance test: Zvíře se umístí PKK na okraj plošiny tak, aby jim nos přesahoval přes hranu. Je sledována doba, za kterou se potkani vzdálí od okraje. Tento obranný reflex se téměř nevyskytuje v prvních dnech po narození. Únik většiny zvířat od okraje lze očekávat v P7 (Altman et Sudarshan, 1975). Motoricky se projeví buď odsunem PKK od hrany, nebo couvavým pohybem, nebo obratem a útekem z místa nebezpečí (Woodworht et al., 2011).

Test posturální reakce ZKK: V tomto testu byla využita nakloněná rovina, na kterou byli potkani umístěni opačně než v testu negativní geotaxe (ZKK směrem dolů). U novorozených potkanů byla extenční reakce naznačena pouze však v oblasti kyčlí. U 6-denních potkanů se objevila plná extenze v kyčelním, kolenním i hlezenním kloubu bilaterálně na obou ZKK, což dokumentuje proximo-distální vývoj postury (Brocard et al. 1999).

Limb placing reflex (umístění končetiny): Při zavěšení potkana se pozoruje umístění končetin na povrch podložky. Přední a zadní končetina na ipsilaterální straně se dotýkají hrany stolu, zatímco je tělo zvířete zavěšené (Lubics et al., 2005). Sleduje se den, kdy zvíře poprvé opře své končetiny o stůl pomocí extenze v kyčelním, kolenním kloubu a plantární flexí v hlezenním kloubu (Marcuzzo et al., 2010). Ve fyziologickém vývoji potkana lze tuto motorickou reakci u PK zaznamenat v P9-10, u ZK až o 3 dny později. Tato pohybová odpověď se odvíjí od maturace vestibulárního a taktilního systému (neboli od zrání mozkového kmene a korových oblastí mozku). Pozdější začátek posturální reakce na ZKK, která je téhož původu jako skoková reakce, může být zapříčiněna pozdějším zapojením proprioceptivních mechanismů do funkce a pozdějším dozráváním mozečku (Altman et Sudarshan, 1975).

1.4.2 Testy na motorickou koordinaci

Bar holding test (zavěšení na hrazdě): Test, který se zaměřuje na svalovou sílu. Zvíře se zavěsí za přední končetiny na hrazdu nebo natažený pevný drát (horizontal wire test). Při sledování funkce jedné PK, se druhá PK může pomocí pásky přilepit k tělu zvířete (Lubics et al., 2005). Sledujeme také tendence zvířete dopomoci si zadními končetinami. Synergickou podporu lze spatřit v P11. V této době dokáže

několik potkanů ze skupiny uchopit hrazdu pomocí jedné či obou ZKK. Všechna zvířata jsou schopna tuto dovednost ukázat až 21. den po narození (Altman et Sudarshan, 1975). Důležitou roli v tomto testu hraje hmotnost (Brooks et Dunnett, 2009).

Rotarod test (test na rotující tyči): Tento test hodnotí koordinačně komplexnější lokomoční funkce (Altman et Sudarshan, 1975). Zvíře se umístí na otočný válec s vrásněným povrchem, jenž může rotovat různě nastavitelnou rychlostí. Rychlost otáček se pohybuje mezi 1 až 40 otáčkami za minutu (rpm – rotation per minute). Test je zaměřený na udržení rovnováhy zvířat, která se pomocí rovnovážných mechanismů snaží zabránit pádu. Test však nerozlišuje, zdali byl pád způsobený motorickou inkoordinací či svalovou únavou. Další úskalí testu může vzniknout při odmítnutí zvířete se testu podrobit. Potkan skočí dolů, jakmile je na Rotarod umístěn. Příčinou tohoto chování je většinou dlouhotrvající testování, při němž si potkan navykne, že pád není rizikový. Dále výsledky může zkreslovat hmotnost hlodavce. Těžší potkan se může na Rotarodu udržet kratší dobu než lehčí. Právě však neurologicky postižená zvířata mají nižší průměrnou hmotnost v porovnání se zdravými zvířaty a v Rotarod testu se mohou jevit úspěšněji (Brooks et Dunnett, 2009).

Ladder walking test (chůze po žebříku): Potkan je umístěn na žebřík, který musí přejít z jednoho konce na druhý. Žebřík je horizontálně uložený nad zemí a rozestupy mezi příčkami mohou být pravidelné, anebo různé, což zajišťuje koordinačně náročnější podmínky. Všechny končetiny by v krokovém cyklu měly být postupně umístěny na příčky žebříku. Různé mezery mezi příčkami zcitlivují tento test. V testu se měří doba, za kterou zvířata přejdou žebřík, a při tom se zaznamenává počet chybných kroků, kdy dochází ke sklouznutí a propadu končetiny v mezeře mezi příčkami (Brooks et Dunnett, 2009). Částečnou modifikací testu je tzv. grid walking test (test chůze po mřížce), (Lubics et al., 2005).

Balance beam walking test (balanční test s využitím úzkých trámů): Tento koordinačně náročný test umožňuje sledovat přesun zvířete po úzkém trámu, jenž je umístěn nad zemí. V testu se hodnotí počet sklouznutí končetin z trámu či pád zvířete a čas, během něhož se potkan přemístí k bezpečnému místu. Konstrukce testu může být rozšířena o další příčky, jež se umístí z obou stran původního trámu a rozšíří tak šířku trasy, kterou potkan musí překonat. Větší šířka trasy zajistí zvířeti jistější lokomoci a zvíře tak snáze překoná vzdálenost bez strachu z pádu. Horizontálně umístěný trám se může také naklonit pro podporu přirozené tendence uniknout do vyšších poloh. Tyto modifikace zvyšují citlivost testu, kdy test lze použít při hodnocení motorického deficitu

v časném vývojovém období (Brooks et Dunnett, 2009). Většinou jsou zdraví potkani schopní balanc beam walking test úspěšně zvládnout až po otevření očí. Potkani se zejména pomocí PKK přemístí přibližně kolem 16. dne (P16) po narození na širších typech trámů, na užších můstcích až kolem 18. dne (P18). Sklouznutí ZKK při přemísťování se mohou objevovat u zdravých zvířat ještě 20. postnatální den (P20), což dokazuje, že balanční dovednosti během lokomoce dozrávají později než dospělý vzor chůze (Altman et Sudarshan, 1975).

Analýza chůze: Vyšetření chůze může poskytnout podrobnější analýzu motorické koordinace a synchronizaci končetin. Využívá se tzv. test otisků chodidel (foot print test) nebo rozbor chůze pomocí videonahrávky. Foot print test obnáší natření PKK a ZKK potkana různými barvami a dále je potkan donucen k chůzi po papíře přímým směrem. Podle otisků chodidel na papíře se klasifikuje délka kroku, šířka báze, rozevření tlapy a prstů, překrytí mezi přední a zadní tlapkou (Brooks et Dunnett, 2009).

1.4.3 Hodnocení motorické aktivity:

Open field test (test v otevřeném prostoru): Test se považuje za nejjednodušší test pro hodnocení motorické aktivity. Potkani se uloží do kulatě či do hranatě ohraničené plochy rozdělené na stejné díly (Brooks et Dunnett, 2009). U potkanů lze pozorovat motorickou aktivitu a chování s průzkumnými sklony, jež zaznamenává kamera (Lubics et al., 2005). Typické chování zdravého zvířete začíná prvně pohybem ke stěně, odkud potkan začne zkoumat prostor po obvodu ohraničené plochy. Chvilí trvá, než se zvíře adaptuje na nové prostředí, poté se opět vydá nazpět do středu plochy, odkud se opět vrací ke stěně (Brooks et Dunnett., 2009). Z videonahrávky lze sledovat, kolikrát zvíře zvedne hlavu, vzdálenost, kterou potkan ujde, čas pohybu či čas strávený u stěny, věření (sniffing), postavení se na ZKK (rearing), (Lubics et al., 2005). Zvednutí hlavy s rytmickými postranními pohyby využívá zvíře k orientaci. Toto chování se vyskytuje od P10. Od P15 lze spatřit „sniffing“. Tyto pohybové dovednosti jsou podmíněné maturací posturálních reakcí. „Rearing“ s oporou PKK o stěnu (častější varianta) bývá součástí průzkumného chování a lze ji častěji vidět v dospělém věku. Toto chování se vyskytuje až s vyzráním funkce zadních končetin a spíše ho lze spatřit od P18 (Altman et Sudarshan, 1975).

2 Hypoxie

Termínem hypoxie označujeme nedostatek kyslíku v živém organismu či v některé jeho části (Nečas et al., 2005, s. 203).

2.1 Kyslík a jeho význam pro mozkovou tkáň

Kyslík sehrává důležitou roli v aerobním metabolismu eukaryotní buňky. Kyslík je akceptorem elektronu na konci dýchacího řetězce a je tak v mitochondriích využíváný pro výrobu adenosintrifosfátu (ATP), (Nečas et al., 2005, s. 203-8). Adenosintrifosfát je makroergní molekula, při jejímž štěpení se uvolňuje energie, která je potřebná pro řadu buněčných pochodů jako je např. membránový transport, lipogeneze, proteosyntéza či funkce kontraktálních buněčných elementů (Povýšil et Šteiner, 2011, s. 2).

Pro správnou činnost buněk je potřeba dostatečné množství kyslíku a fyziologicky fungující mitochondrie buněk (Nečas et al., 2005, s. 204). Dostatek kyslíku je významně důležitý pro aktivitu mozkové tkáně. Bez autoregulace a stálého zajištění okysličeného krevního průtoku mozkem není možná existence organismu (Ambler, 2006, s. 135).

2.1.1 Autoregulace mozku

Autoregulace je fyziologická adaptace mozku, která se snaží o udržení nepřetržitého krevního průtoku mozkem nezávisle na změnách středního arteriálního tlaku krve. Když pokles lokálního perfúzního tlaku dosáhne dolní hranice cerebrovaskulární autoregulace, dochází ke zvýšené extrakci kyslíku z protékající krve a tím i udržení ještě dostatečného množství kyslíku pro metabolické nároky mozkové tkáně. Pokud je však průtok krve omezen o více než 50 % dochází k ischemii mozkové tkáně s funkčním dopadem na synaptickou činnost neuronů. A při snížení průtoku pod 30 % je tento stav doprovázen již ireverzibilními změnami se strukturálním poškozením neuronů a vzniká mozkový infarkt (Ambler, 2006, s. 136-7).

2.2 Patofyziologie hypoxie

Nedostatek kyslíku v organismu či v některé jeho části označujeme za hypoxii. Za asfyxii se označuje stav, při němž vzniká hypoxemie (pokles pO_2 v arteriální krvi) a hyperkapnie (zvýšení pCO_2 v arteriální krvi) s metabolickou acidózou (Nečas et al., 2005, s. 203). Při snížení či zamezení dodávky arteriální krve do tkáně mluvíme

o ischemii, jež je jednou z hlavních příčin vzniku tkáňové hypoxie (Povýšil et Šteiner, 2011, s. 2).

Perinatální asfyxie je termín příznačný pro poruchu výměny krevních plynů a pro vznik metabolické acidózy během porodu. Dochází k závažnému ohrožení novorozence. Obávaným následkem perinatální asfyxie je cerebrální poškození narozeného dítěte (Lebl, 2012, s. 26).

2.2.1 Příčiny hypoxie

Obecně můžeme rozdělit příčiny hypoxie do 4 typů (Nečas et al., 2005, s. 207). Jako první typ Nečas et al. (2005, s. 207) označili hypoxickou hypoxii, která většinou vzniká na základě nedostatečného parciálního tlaku kyslíku v dýchaném vzduchu. Parciální tlak kyslíku v arteriální krvi klesá. Nastává stav, který označujeme za hypoxemii. Pokud hypoxie postihuje více orgánových struktur, označujeme ji za systémovou hypoxii. Hypoxemie může nastat i při poruchách plic či jiných tělesných částí, jež podporují plicní ventilaci, perfúzi. Dále při pravolevém oběhovém zkratu (Nečas et al., 2005, s. 207).

Jako další typ hypoxie se vyskytuje anemická hypoxie, která je charakterizovaná arteriální hypoxemií. Příčinou je nízká koncentrace hemoglobinu (Nečas et al., 2005, s. 207).

Následující druh hypoxie (stagnační) může vznikat vlivem lokální či systémové poruchy krevní cirkulace. V této situaci může buď dojít k omezenému přívodu krve, anebo k nedostatečnému odvodu krve z místa hypoxie. V případě ischemie kyslík musí difundovat do větších vzdáleností, neboť se prodlužuje interkapilární vzdálenost a jeho tenze se vzdáleností od kapiláry snižuje (Nečas et al., 2005, s. 208).

Ke 4. variantě hypoxického stavu dochází při intoxikaci organismu, kdy mitochondrie nemohou využít kyslík pro tvorbu ATP. Přestože je dostatek kyslíku, nastává obdobná situace jako při jeho nedostatku. Krev ve venózní cirkulaci je více satureovaná (nad 75 %). Na sliznicích a kůži můžeme pozorovat zčervenání. Tato hypoxie se označuje jako histotoxická (Nečas et al., 2005, s. 208).

2.2.2 Etiologie hypoxického stavu v perinatálním období

Perinatální hypoxie-ischemie může vznikat v důsledku asfyxie během porodu či krátce po něm. Další příčinou je krvácení do mozkových struktur (Marešová et al., 2011, s. 133). Krvácení do germinální tkáně v okolí postranních komor mozku se

objevuje u dětí s velmi nízkou porodní váhou. Příčinami krvácení mohou být kolísání perfúze a krevního tlaku v cévách mozku, dále hyperkapnie s dilatací cerebrálních cév. Intraventrikulární krvácení lze spatřit i u donošených jedinců, při jejichž porodu bylo potřeba kleští či vakuumextrakce (Lebl, 2012, s. 52). Hypoxický stav vzniká u respiratory distress syndromu, který je rizikem u více nedonošených dětí (Marešová et al., 2011, s. 133). Dalšími příčinami mohou být kardiovaskulární nemoci matky, hemodynamické činitele (trombózy, koagulopatie) nebo infekce (Kraus et al., 2005, s. 43–55).

2.2.3 Důsledky hypoxie v oblasti buňky

Nedostatek kyslíku ve tkáni negativně ovlivňuje tvorbu ATP. Jakmile pokles ATP přesáhne 5-10 % normálních hodnot, nastane poškození důležitých buněčných systémů (Povýšil et Šteiner, 2011, s. 2). Postižená buňka není schopná udržet gradienty iontů mezi extracelulární a intracelulární oblastí (Nečas, 2005, s. 210). Vlivem deplece ATP je snížena aktivita sodíkové pumpy. Když dojde k jejímu poškození, nastane difuze kalia z buňky a zvýšení koncentrace sodíku a vody uvnitř buňky. Na základě tohoto děje se tvoří intracelulární edém a narušení proteosyntézy bílkovin v důsledku oddálení ribozomů od endoplazmatického retikula (Povýšil et Šteiner, 2011, s. 4). Při destrukci kalciové pumpy, která udržuje velký rozdíl intracelulárních a extracelulárních koncentrací vápníku, se zvyšuje koncentrace vápníku v cytosolu buňky, což na buňku působí vysoce toxicky. Tento stav způsobí zvýšení membránové permeability a podnítí aktivitu mnoha enzymů. Mezi ně se řadí i ATPázy, které urychlují nedostatek ATP, fosfolipázy, které rozkládají membránové fosfolipidy, cytoplazmatické proteázy, které poškozují membrány a cytoskelet. (Povýšil et Šteiner, 2011, s. 3). U nervových buněk, nedostatek ATP způsobí poruchu přenosu signálu (Nečas et al., 2005, s. 210). Anaerobní glykolýza se snaží dohnat depleci ATP a v průběhu tohoto děje se zvyšuje koncentrace laktátu a klesá pH. Metabolity se v buňce hromadí. Acidóza snižuje aktivitu některých buněčných enzymů, a funkce buňky je tím dále omezena (Povýšil et Šteiner, 2011, s. 4).

Výrazné poškození membrán vyvolá další edém a zánik mitochondrií a lysozomů. Dochází k úniku mitochondriálních dehydrogenáz a cytochromu c z mitochondrií, což je signál k apoptóze buňky. Dále při otoku lysozomů dochází k jejich ruptuře a úniku lysozomálních enzymů do cytoplasmy buňky, které dále působí buněčný rozklad. Hypoxické buňky tvoří adhezní molekuly, jež podmiňují příchod

leukocytů. Výsledný zánět působí další poškození buňky a dochází k jejímu definitivnímu zániku (Povýšil et Šteiner, 2011, s. 7).

Posthypoxická reperfuze je důležitá pro regeneraci mozkové tkáně a pro ochranu před dalším poškozením. V druhé řadě se však během reperfuze uvolňuje velké množství volných kyslíkových radikálů, jež vznikají při oxidačním stresu. Vlivem aktivovaných cytosinů se může zvyšovat zánětlivá odpověď, která rozšiřuje ischemické léze (Kraus et al., 2005, s. 57). Ischemická nekróza končí vznikem postmalatické pseudocysty a mozkového edému, jenž stlačuje lumen kapilár a způsobuje další ischemizaci mozkové tkáně (Ambler, 2006, s. 137).

2.2.4 Hypoxické poškození a porodní váha

Frekvence poruch po fyzické stránce se mezi váhovými skupinami neliší. Těžké poškození pohybových schopností se vyskytuje u 40 % jedinců s ranou cerebrální destrukcí bez ohledu na gestační stáří i porodní váhu. Naopak význam nízké porodní hmotnosti se zvyšuje u kognitivních schopností, jež se zhoršují s nižší porodní váhou (Kraus et al., 2005, s. 60).

2.2.5 Poškození bílé hmoty a aferentních struktur

Typy poruch se částečně odvíjejí od gestačního období, kdy byl mozek zasažen hypoxií (Stadlin et al., 2003). Největší riziko poškození má u předčasně narozených dětí bílá hmota (Stadlin et al., 2003). U novorozenců do 34. týdne těhotenství je nejvíce postižena periventrikulární bílá hmota, kdy vzniká periventrikulární leukomalacie (PVL). Změny bývají nalezeny na axonech i v gliích (Kraus et al., 2005, s. 49-50). U PVL dochází k morfologickým změnám, jež vypovídají o progresivním poškození mozku (Lebl, 2012), kde můžeme sledovat více ložiskovou nekrózu bílé hmoty kolem postranních komor a kde se vyskytuje i poškození sestupných motorických, optických a asociačních vláken. Na tomto podkladě může vznikat klinický obraz typu spastické diplegie (postižení předních rohů s motorickými vlákny pro dolní končetiny), zrakového postižení (zadní oblasti kolem postranních komor), sluchových poruch se sníženým intelektem (Lebl, 2012, s. 53).

Také může dojít ke vzniku periventrikulárního hemoragického infarktu, který lze spatřit spíše u více donošených dětí (Stadlin et al., 2003). Mezi patogenetické faktory PVL se řadí nevyzrálá vaskularizace zásobující bílou hmotu, intrakraniální krvácení, vysoké lokální množství železa a vývojová zranitelnost prekurzorových buněk

oligodendroglíí při ischemii-reperfuzi, kdy dochází k výraznému působení volných kyslíkových radikálů a extracelulárního glutamátu (Kraus et al., 2005, s. 49-50).

Marešová et al. (2011, s. 134) zmiňuje poškození zejména aferentních struktur, které jsou dříve postiženy, neboť spotřebovávají nejvíce kyslíku. Jedná se o struktury jako je lemniscus medialis, thalamus, mozeček či parietální kůra, které zpracovávají senzitivní informace. Dochází ke špatnému vedení a k nesprávnému vyhodnocení dat, která nemohou být v optimální formě předána do náležitých asociačních motorických a integračních oblastí a ani do výstupních částí CNS. Při dlouhodobějším trvání porušeného aferentního toku nemůže docházet k optimálnímu vývoji jedince (Marešová et al., 2011, s. 134).

2.2.6 Vliv hypokapnie

K poruše bílé hmoty u dítěte může přispět hypokapnie, ke které dochází při hyperventilaci. Prolongovaná hypokapnie zapříčiní výraznou vazokonstrikci cév v mozku. Důsledkem tohoto děje dochází k ischemii mozkové tkáně ve tkáních s omezenou cirkulací. Při opětném vyrovnání pCO₂ v arteriální krvi nastává reaktivní vazodilatace a tím i možný vznik intracerebrálního krvácení. K defektům nezralé mozkové tkáně vede predispozičně nedostatečně vyvinuté cévní zásobení zranitelných oblastí (Kraus et al., 2005, s. 45–46).

2.2.7 Následky perinatální hypoxie

Novorozenci jsou více odolní proti hypoxii než dospělí jedinci (Kraus et al., 2005) Incidence hypoxického inzultu v neonatálním období je odhadována na 2-4 donošené jedince z tisíce narozených dětí. U dětí předčasně narozených s nízkou porodní váhou je toto číslo mnohem vyšší, odhaduje se až na 60 % (Takada et al., 2011). Následkem působení hypoxického inzultu při narození dítěte vzniká poškození nezralého mozku a může dojít k úmrtí jedince nebo k vývoji chronické poruchy (Vannucci et Vannucci, 2005).

Funkční a morfologické poškození mozku novorozence se označuje jako hypoxicko-ischemická encefalopatie (HIE). K jejímu vzniku často dochází perinatálně u donošených nebo téměř donošených novorozenců (Lebl, 2012, s. 26-51). Při porodní asfyxii dochází k poškození buněk až po čase, který odpovídá 8-24 hodinám po iniciálním hypoxicko-ischemickém působení. Tento fakt dává nové šance pro výzkum léčby perinatální hypoxie-ischemie (Kraus, 2005, s. 41).

HIE lze klasifikovat jako lehkou, středně těžkou a těžkou. Těžký stupeň HIE vede k neonatálnímu úmrtí. Výskyt HIE činí 1/2000 – 1/5000 živých novorozenců (Lebl, 2012, s. 26-51).

Dlouhodobé následky poškození mozku se mohou vyskytovat v podobě motorických, kognitivních a behaviorálních poruch, které můžeme sledovat u dětské mozkové obrny (DMO), u mentální retardace, u sluchového či zrakového postižení, u epilepsie (Takada et al., 2011). Dalšími projevy jsou komunikační potíže, poruchy pozornosti a učení, neprospívání s narušeným příjmem potravy, gastroesofageální reflux, emoční disbalance (Kraus et al., 2005, s. 63).

2.3 Perinatální hypoxie u laboratorního potkana

Na základě rešerše Vachovcová (2012) bylo zjištěno, že pro sledování vlivů hypoxie na nezralý CNS laboratorního potkana bylo v průběhu několika desítek let vytvořeno několik modelů perinatální hypoxie. U každého modelu byla hypoxie provedená odlišnými cestami. Hlavní rozdíl v provedení hypoxie byl zaznamenán v odlišné době působení hypoxie, ve věku potkanů, ve kterém byla hypoxie provedena, a v různém procentuálním zastoupení kyslíku v dýchaném vzduchu testovaných zvířat v době hypoxického působení. Často se v modelech perinatální hypoxie k hypoxickému působení přidává ischemická okluze v podobě podvázání jedné či obou arteria carotis communis. Na základě těchto rozdílů vzniká odlišné centrální poškození, které vede k diverznímu motorickému a behaviorálnímu projevu testovaných zvířat (Vachovcová, 2012).

Jako nejčastější model perinatální hypoxie se využívá 7-denní model. Mozek potkana v tomto vývojovém období je morfologicky podobný mozku člověka v gestačním stáří 32–34. týdne. V tuto dobu lze u nezralého mozku sledovat začátek myelinizace bílé hmoty a dokončování rozvrstvení mozkové kůry (Vannucci et Vannucci, 2005).

U tohoto modelu je hypoxie-ischemie navozena jednostranným podvázáním arteria carotis communis, po němž je přivozena systémová hypoxie způsobená expozicí 8 % O₂ ve zbytku N₂. Teplota je stále udržována na 37°C a udržuje se i po ukončení hypoxické fáze, aby nemohlo dojít k ovlivnění mozkové léze změnou teploty. V těchto podmínkách jsou testovaná zvířata schopna přežít 3 hodiny. Takto provedená hypoxie-ischemie způsobí hypoxemii kombinovanou s hypokapnií, k níž dochází na základě

hyperventilace. Nedochází ke změnám systémového pH, neboť vzniklou laktacidemií vyrovnává vznikající hypokapnie (Vannucci et Vannucci, 2005).

Hypoxicko-ischemické poškození mozku u potkanů, kteří přežili více než 3 hodiny, vedlo především k poškození mozkových struktur ipsilaterálně k podvázané a. carotis communis. Na preparátech mozku bylo zaznamenáno selektivní nervové poškození i celostní infarkt, kde byly postiženy všechny struktury včetně glií a cév. Došlo k destrukci mozkové kůry, subkortikální a periventrikulární bílé hmoty, thalamu, hippocampu a striata (Vannucci et Vannucci, 2005).

2.4 Plasticita CNS v kojeneckém věku

„Plasticita je specifická schopnost nervového systému (NS) se zákonitě vyvíjet, reagovat na změny vnitřního a zevního prostředí, případně se jim přizpůsobit, a to za fyziologických i patologických situací (Trojan et Pokorný, 1997).“ Tato schopnost NS závisí na genetických předpokladech, na věku, na celkovém stavu jedince a liší se tak u každého člověka (Trojan et Pokorný, 1997).

Nezralé nervové buňky, které mají geneticky determinovaný následující vývoj, nemají dokončený metabolický vývoj, buněčnou strukturu a mají omezenou funkci. Dochází u nich k myelinizaci, ke zrání iontových kanálů, k tvorbě neurotransmiterů, aj. Zralé buňky jsou zcela funkční a vyžadují vysokou dávku energie. Jsou stabilní, ale zároveň rigidní. Dynamika NS je založena na rovnováze mezi plasticitou nezralých buněk a rigiditou zralých buněk (Trojan et al., 2004).

Plasticitu během vývoje můžeme označit jako evoluční plasticitu, jejíž efekt se může vyskytovat v pozitivní i negativní podobě. Jak a kdy budou nervové struktury uspořádané a funkční, rozhodují genetické programy za souběhu se zevním a vnitřním prostředím (Trojan et al., 2004).

Vývoj neuronálních struktur se uskutečňuje ve skocích, které jsou typické relativně krátkým trváním, jedná se o tzv. kritickou periodu. Během kritické periody je mozek velmi choulostivý na vliv negativních faktorů. Za zvláště citlivé je považováno období růstu. Určitý stimul může zvýšit či utlumit expresi genetického programu, jenž určuje danou strukturu a funkčnost (Trojan et Pokorný, 1997). Změněný obraz funkce se může projevit až v průběhu dalšího vývoje (Trojan et al. 2004). Odpověď neuronálních struktur na změny prostředí může být okamžitá. Ke změněné situaci dochází jen po dobu působení podnětu. Nezralý CNS je schopný přizpůsobit svůj metabolismus v buňkách (Trojan et Pokorný, 1997).

Když dojde ke snížené dodávce kyslíku, celkově se sníží metabolismus nezralé buňky a zvýší se efektivita oxidativní fosforylace pomocí oxidativních enzymů. V případě, že dojde ke snížení pH vnitřního prostředí, nezralé neurony projeví vyšší odolnost a stanou se přizpůsobivějšími kyselému prostředí, což jim umožní přežít (Trojan et al., 2004).

Pro aktivaci neuroplastického procesu je důležitý typ působícího faktoru, možnosti odpovědi organismu a citlivost jednotlivých struktur. Proto má jiný efekt zásah, jenž působí intrauterinně, během narození, postnatálně a v dospělosti (Trojan et al., 1997). Stejně tak hraje významnou roli i individuální citlivost organismu (Trojan et al., 2004).

Reparační plasticitu označujeme jako schopnost neuronů obnovit svoji porušenou funkci. Snahou dnešních výzkumů je najít způsoby aktivace přirozených reparačních dějů pomocí aplikace farmakologických přípravků, jenž aktivují neuroplastické mechanismy tak, aby mohly pomoci renovaci narušených okruhů nervové tkáně (Trojan et al., 2004).

2.4.1 Aktivace neuroplasticity

U nezralého mozku je výraznější naděje pro renesanci a reorganizaci mozkových neuronů, která se může projevit i v lepší schopnosti učení a paměti, než je možné u dospělé populace (Kraus et al., 2005, s. 51).

Ztráta či omezení určitých funkcí se odvíjí podle poškození určitých mozkových struktur, restrikce funkcí však může mít jen dočasný charakter (Marešová et al., 2011, s. 134). Pomocí neuroplasticity je mozek schopen přenést některé funkce z poškozené části mozkové kůry na jinou (Pfeiffer, 2007, s. 79) a poškozené spoje mohou být také nahrazeny novými (Trojan et al., 2004).

Poškození mozku vlivem perinatální hypoxie-ischemie během porodu může být kompenzované pomocí přiměřené terapie, která může napomoci reparačnímu ději, jenž je založen na plasticitě mozku (Trojan et al., 2004). Také bylo prokázáno, že tvorba bílkovin, které se uplatňují při znovuobnovení mozkových buněk, je nejvýraznější v období několika dní až týdnů po hypoxicko-ischemickém infarktu. I proto je toto období ideální pro rehabilitaci (Biernaskie et al., 2004). Struktury mozku se mohou optimálně propojovat pouze za podmínek přítomnosti taktilních, zrakových, sluchových aj. stimulů (Trojan et al., 2004). Periferní stimulací lze tedy potencovat tvorbu nových nervových okruhů, zvýšit jejich regeneraci a také tvorbu nových neuronů. Obnovené

funkce však často nemusí být optimální a můžeme je pozorovat ve snížené kvalitě (Marešová et al., 2011, s. 134).

3 Možnosti ovlivnění následků perinatální hypoxie

Přestože novorozený mozek toleruje mnohem delší periodu kyslíkové deprivace v porovnání s dospělým mozkiem, perinatální hypoxie je stále významnou příčinou neurologické dysfunkce. Z toho důvodu je potřeba zkoumat mechanismy, které modulují rozsah mozkového poškození (Aden et al., 2001).

Cílem této práce není zmínit a popsat všechny zkoumané či dostupné mechanismy neuroprotektivní léčby, ale přiblížit problematiku neuroprotektivní léčby v užším zaměření na agonisty adenosinového A₁ receptoru.

3.1 Fyziologie adenosinu a adenosinových receptorů v mozku

Adenosin je purinový nukleosid složený z nukleové báze a z cukru, ribózy. Adenosin existuje ve všech buňkách, tvoří komponentu nukleových kyselin a energii-nesoucích molekul a může být uvolňován přímo buňkami či generován extracelulárně (Rivkees, Wendler, 2011). Adenosin se účastní všech klíčových cest primárního metabolismu, jako je nukleosidový a nukleotidový metabolismus, metabolismu aminových kyselin obsahujících síru, metabolismu amoniaku (Cunha, 2005).

V rámci buněk může být produkován z ATP, ADP (adenosindifofát), cAMP (cyklický adenosinmonofofát) či z S-adenylylhomocysteinu. Intracelulární odstranění adenosinu probíhá za pomoci enzymu adenosin kinázy, jenž konvertuje adenosin na AMP, či za pomoci adenosin deaminázy, která přeměňuje adenosin na inosin (Rivkees, Wendler, 2011).

Extracelulární ATP je důležitý zdroj adenosinu, jenž následuje přeměnu z ATP na ADP a AMP. Tyto katabolické reakce zahrnují zapojení ektonuklitidáz. Některé z ektonuklitidáz jsou více aktivované během hypoxie a navyšují tak hladiny adenosinu (Rivkees et Wendler, 2011).

Extracelulární adenosin může působit jak na adenosinové metabotropní receptory lokalizované v buněčné membráně sousedících buněk, tak na receptory mateřské buňky. Při aktivaci různého typu adenosinového receptoru se může měnit metabolismus specifické buňky (Cunha, 2005).

Adenosin plní homeostatickou roli. Mnoho savčích buněk je vybaveno adenosinovými A₁ receptory, při jejichž aktivaci dojde ke snížení metabolismu buňky, což buňce pomůže snáze překonat noxu. Zatímco škodlivý stimul způsobí mírný pokles v energetické výbavě buňky, dochází k výraznému navýšení intracelulární hladiny

adenosinu, jenž pak difunduje ven z buňky a signalizuje sousedící buňce skrz A_1 receptory přítomnost škodlivého stimulu. Sousedící buňka je tak lépe připravena pro vypořádání se s noxou pomocí snížení svého celkového metabolismu (Cunha, 2005).

Kromě homeostatické úlohy v mozku je adenosin důležitý pro svou mozkovou modulační funkci. Adenosinové A_1 receptory mají největší hustotu v mozku v porovnání s ostatními typy adenosinových receptorů. Tyto receptory hrají klíčovou roli v kontrole neuronální excitability a v uvolňování neurotransmiterů. Neuromodulační role adenosinu není závislá na změnách energetického zajištění mozkových buněk, z čehož vyplývá, že modulační funkce adenosinu nesouvisí s jeho homeostatickou rolí (Cunha, 2005).

Adenosinová signalizace nepřenáší přímo informace mezi neurony, což patří mezi funkce neurotransmiterů, ale kontroluje tok informací mezi neurony v mozku (Cunha, 2001). Adenosin také není přímo vylučován ze synaptických váček, jako lze pozorovat u neurotransmiterů (Rivkees et al., 2001). Zvyšování extracelulárního adenosinu v synapsích úzce souvisí s uvolněním neurotransmiterů (pomocí A_1 receptorů se nejčastěji inhibuje jejich uvolnění), dále souvisí s frekvencí a intenzitou neurálního firingu (Cunha, 2005).

3.1.1 Adenosinové receptory v mozku

Protože je adenosin všudypřítomný, specifická jeho aktivita je určena na receptorové úrovni (Rivkees et al., 2001). Jsou 4 typy adenosinových receptorů: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3 . Receptory představují metabotropní typ receptoru, jež se váží s G-proteiny (Cunha, 2005). A_1 receptory a A_3 inhibují adenylátcyklázu (enzym katalyzující ATP), zatímco A_{2A} a A_{2B} tento enzym aktivují. Adenosinové receptory obsahují 7 transmembránových domén. Každý z těchto receptorových subtypů má rozdílný vzor tkáňové exprese a váže odlišné ligandy (Rivkees et al., 2001).

Z adenosinových receptorů je A_1 receptor v mozku nejvíce zastoupený a patří mezi nejvíce rozšířené cerebrální receptory s G-proteiny. Ze všech adenosinových receptorů má největší afinitu k adenosinu. Aktivuje G_i a G_o , inhibuje akumulaci cAMP, aktivuje fosfolipázu C a otevírá iontové kanály. Selektivního agonistu pro A_1 receptor představuje N^6 -cyklopentyladenosin (CPA) a jeho chloroderivát (CCPA), (Rivkees, Wendler, 2011) a N^6 -[4-[(2-aminoethyl)-amino] carbonylmethyl]phenyl]adenosine (ADAC), (Aden, 2001) a selektivního antagonistu 8-cyklopentyl-1,3-dipropyl xantine

(DPCPX). A_1 receptor se mimo mozkovou tkáň ve větším množství nachází v tuku, v testes a v menším množství v srdci a v ledvinách (Rivkees, Wendler, 2011).

A_{2A} receptor je koncentrován v bazálních gangliích a méně ve zbytku mozku. A_{2B} a A_3 receptory jsou v mozku zastoupeny velmi poskrovnu. Také existuje nedostatek selektivních farmak, která by prostupovala hematoencefalickou bariérou, k jejich ovlivnění. Jejich úloha v mozku je tak minimálně prozkoumaná. Funkce A_3 receptorů se zdá nejvíce zjevná v astrocytech případně v mikroglíích (Cunha, 2005). Rivkees et al. (2001) ve své práci uvádí, že A_{2B} receptory se v mozku nevyskytují vůbec, navíc jejich afinita k adenosinu a k adenosinovým agonistům je velmi nízká.

Z dostupných dat je role adenosinu v mozku zprostředkována především pomocí vyvážené aktivity A_1 a A_{2A} receptorů (Cunha, 2005). Kofein a aminophylin jsou neselektivní antagonisté adenosinu, blokují všechny typy adenosinových receptorů (Rivkees et Wendler, 2011).

A_1 a A_{2A} receptory nejsou homogenně rozmístěné v mozkových neuronech. Takže výzkum jejich celulórní a subcelulórní lokalizace může poskytnout první vhled na možnou modulační schopnost adenosinu v mozku (Cunha, 2005). Přestože A_1 receptory jsou nejvíce četné v hippocampu a v mozečku, více se nacházejí i v neokortexu, v bazálních gangliích, v diencephalu a mozkovém kmeni (Rivkees et al., 2001). A_1 receptory se nachází v neuronech, méně v astrocytech, oligodendrocytech a mikroglíích (Cunha, 2005). A_1 receptory jsou detekovány na tělech neuronů, na axonech, na nervových zakončeních, kde mohou ovlivňovat uvolnění neurotransmiterů a růst kuželovitých struktur (Rivkees at Wendler, 2011). Dále jsou lokalizované presynapticky i postsynapticky a pomocí různých typů nervových zakončení efektivně kontrolují uvolnění glutamátu, acetylcholinu a serotoninu, ale nejsou schopné modulovat uvolnění GABA a noradrenalinu v mozku. A_1 receptory tak vykonávají synaptickou modulační roli v konkrétních excitačních nervových zakončeních v mozku (Cunha, 2005).

Oproti široké distribuci A_1 receptorů, jsou A_{2A} receptory koncentrovány v bazálních gangliích, především ve striátu. A_{2A} receptory jsou také umístěny v neokortexu a v limbickém systému, v presynaptické aktivní zóně, kde kontrolují uvolňování neurotransmiterů. Kromě glutamátu a acetylcholinu také mohou kontrolovat uvolnění GABA a noradrenalinu, který je nejméně citlivý při aktivaci A_1 receptory (Cunha, 2005).

3.1.2 Modulační schopnost adenosinu

Mezi hlavní účinky adenosinu na mozkové funkce patří presynaptická kontrola uvolňování neurotransmiterů. Za předpokladu, že největší zastoupení v mozku mají A_1 receptory, se dá očekávat, že hlavní efekt adenosinu v mozku bude inhibice uvolnění neurotransmiterů. Usuzuje se tedy, že adenosin především inhibuje neuronální excitabilitu a synaptický přenos. A_1 receptory a A_{2A} receptory v mozku tvoří mezi sebou funkční vtaž, neboť mají opačné účinky na uvolnění excitačních neurotransmiterů, především glutamátu. Na rozdíl od A_{2A} receptorů, které kontrolují pouze uvolnění neurotransmiterů, A_1 receptory navíc kontrolují i neuronální excitabilitu (Cunha, 2005).

Přes A_1 receptory se uskuteční inhibice excitačního synaptického přenosu pomocí presynaptické inhibice uvolnění glutamátu. A_1 receptory také inhibují tok draslíku na postsynaptické úrovni, což vede k neuronální hyperpolarizaci. Tento pozdější účinek je velmi důležitý, neboť kontroluje salvu neurálního firingu. Je však méně důležitý v kontrole synaptického přenosu v nižších frekvencích nervové stimulace (Cunha, 2005).

Vysoká hustota A_1 receptorů v postsynaptické zóně také předvídá důležitou roli adenosinu na postsynaptické úrovni. Tonicke aktivace A_1 receptorů kontroluje amplitudu synapsí v excitačních okruzích a působí jak NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptory, tak na postsynapticky lokalizované napětově řízené vápníkové kanály (Cunha, 2005).

Také by se nemělo zapomínat na to, že účinek adenosinových receptorů při jejich aktivaci není omezen jen na přímou kontrolu neuronální aktivity. Jejich umístění v astrocytech, oligodendrocytech, mikroglíích má také nepřímý vliv na neuronální aktivitu, kdy se adenosin může účastnit komunikace mezi glií a neuronem, kontrolovat astroglyózu a tvorbu různých látek, které mohou mít dopad na neuronální aktivitu. U presynaptické kontroly neurotransmiterů se ukazuje, že adenosinové receptory také doladují akci mnoha dalších receptorových systémů v astrocytech, jako jsou matabotropní glutamátové receptory, histaminové, α -1-adrenergní receptory a ATP P2Y receptory. Jedna určitá excitační funkce aktivovaného adenosinového receptoru v gliích je kontrola exprese a uvolňování cytokinů. Dále, adenosinové receptory kontrolují reaktivitu mikroglíí. Což vede k hypotéze, že adenosin může hrát důležitou roli v kontrole zánětu u nervových buněk, přičemž plní neuroprotektivní funkci (Cunha, 2005).

Aktivace adenosinových receptorů je také schopná modifikovat primární metabolismus většiny buněk (u neuronů i astrocytů), především metabolismus glykogenu (Cunha, 2005).

3.2 Modifikace adenosinového metabolismu za stresových podmínek

Pro získání náhledu na neuroptorektivní funkci endogenního adenosinu, je nejprve potřeba zvážit následky škodlivého stimulu na extracelulární metabolismus. To dále může tvořit podklad pro porozumění farmakologické manipulace s adenosinovými receptory (Cunha, 2005).

Energetické zatížení (energy charge) je jeden ze základních parametrů, které definují status primárního metabolismu buňky, a proto se i jako první přizpůsobuje stresujícímu stimulu ve všech typech buněk. Úzký vztah mezi hladinou adenosinu a energetickým zatížením buňky způsobí to, že tkáňové hladiny adenosinu budou také ovlivněny noxou (Cunha, 2005).

Běžná intracelulární koncentrace adenosinu bývá okolo 1-50 nM, při tkáňové ischemii, hypoxii a zánětu se koncentrace navyšuje na 1 μ M. Lokální hladina adenosinu tak tvoří barometr tkáňové aktivity a oxygenace. Když je tkáň okysličená, je hladina adenosinu snižena, naopak při kyslíkové deprivaci se koncentrace zvyšuje (Rivkees et al., 2011). Není však znám mechanismus, který by popsal souvislost v navýšení intracelulárního adenosinu s navýšením extracelulárních hladin adenosinu (Cunha, 2005).

Nejjednodušší je vysvětlení, že intracelulárně formovaný adenosin je vypuštěn nukleosidovými přenašeči, což vede ke zvýšení hladin extracelulárního adenosinu. Podle tohoto scénáře existuje dobrá korelace mezi odstupňovanou intenzitou škodlivého stimulu, poklesem energetického zatížení a extracelulární hladinou adenosinu ve studované mozkové tkáni (Cunha, 2005).

Také blokáda intracelulárních enzymatických cest, jež jsou zodpovědné za metabolismus intracelulárního adenosinu, zvyšuje extracelulární hladiny adenosinu za různě škodlivých podmínek v mozkových preparátech. Zajímavé však je, že inhibice rovnovážných nukleosidových přenašečů naopak zvyšuje extracelulární hladiny adenosinu, což může vypovídat o tom, že role rovnovážných nukleosidových přenašečů většinou spočívá spíše v úklidu, než v uvolnění adenosinu do extracelulárních prostor, jak je běžné pro nestresové podmínky (Cunha, 2005).

Zřejmá alternativa formace extracelulárního adenosinu vychází z extracelulárního katabolismu adeninových nukleotidů, jež jsou uvolňované na základě působení škodlivého stimulu. Axonální depolarizace a navýšení hladiny glutamátu, charakteristické znaky pro potenciální neurotoxické podmínky, účinně spouští uvolnění ATP. Navíc při působení škodlivých podmínek dochází k up-regulaci ektonukleotidáz, jež katabolizují ATP. Stále však není jasné, jestli stresem indukované uvolnění ATP přispívá k extracelulárnímu navýšení adenosinu (Cunha, 2005)

Z výše psaných řádků plyne, že není mnoho známo o způsobu generování extracelulárního adenosinu během stresových podmínek. Žádný způsob vedoucí ke zvýšení extracelulárního adenosinu při působení škodlivé noxy nebyl experimentálně vyřešen (Cunha, 2005).

I když pomineme způsob, jak je extracelulární adenosin formován, zůstává stále evidentní, že škodlivý stimul spouští výrazné navýšení extracelulární hladiny adenosinu, která dosahuje mikromolárních koncentrací v extracelulární tekutině mozkových preparátů při stresových podmínkách. Afinita pro adenosin u nejvíce četných receptorů (A_1 a A_{2A}) je v nanomolárním rozsahu. Vniká tedy otázka, zda tyto zvýšené hladiny endogenního adenosinu jsou dostatečné k nasycení A_1 a A_{2A} receptorů. Kdyby dostatečné nebyly, nedávalo by smysl hledat terapeutickou neuroprotektivní strategii založenou na užití agonistů adenosinových receptorů. Což je opět otázkou, neboť právě inhibice klíčových enzymů pro kontrolu dostupnosti adenosinu zesiluje neuroprotektivní účinek endogenního adenosinu (Gidday et al., 1999; Cunha, 2005). V podstatě inhibice adenosin kinázy působí silně neuroprotektivně u mozkového poškození a také inhibitory adenosine deaminázy jsou neuroprotektivní (Gidday et al., 1999).

Adenosin představuje více vlivů, které by mohly předvídat pozitivní účinek na stav v mozku způsobený hypoxií. Adenosin má tlumivý účinek na neurální aktivitu, což je důsledek více rozdílných funkcí jako je schopnost inhibovat presynaptické uvolnění glutamátu a je důležitým mediátorem mozkového hypoxického poškození. Adenosin pomáhá udržet blok NMDA receptorů závislý na napětí tím, že indukuje hyperpolarizující proud draslíku. Pomocí blokace NMDA receptorů redukuje influx vápníku a redukuje oxid dusný, což může mít také neuroprotektivní účinky. Adenosin také představuje potenciální vazodilatátor u perinatálního mozku a může předcházet segregaci destiček. Zvýšená dostupnost substrátů zapříčiní spotřebu glukózy neurony a glykogenolýzu astrocytů. V in vitro studiích bylo zjištěno, že adenosin působí na redukci volných radikálů pomocí neutrofilů a pomocí navýšení antioxidační enzymové

aktivity (Gidday et al., 1999). Neuroprotektivní účinky adenosinu jsou nezávislé na účincích adenosinu na vaskulární tkáň, jak dokazuje testování na in vitro preparátech (Phillips, 1995).

3.3 Aktivace A₁ receptorů při akutní neurodegeneraci

Když se zvažovalo, který adenosinový receptor hraje hlavní roli v poskytnutí neuroprotektce v dospělém mozku, nejvýznamnějším kandidátem se stal A₁ receptor. Přispívá k tomu jeho hlavní inhibiční účinek na synaptický přenos a nervovou vzrušivost a také to, že je nejvíce zastoupeným adenosinovým receptorovým subtypem v mozku. Mnoho studií potvrdilo, že akutní aktivace inhibičních A₁ receptorů je neuroprotektivní. Čili, v izolovaných neuronech a v mozkových řezech, aktivace A₁ receptoru snižuje poškození neuronů, zatímco antagonisté A₁ receptoru toto poškození zvyšují (Cunha, 2005). Totéž se potvrdilo u dospělých zvířat postižených ischemií (Von Lubitz, 1999).

Přesto je nutno vzít na vědomí, že terapeutický význam agonistů A₁ receptoru má mnoho omezení, které brání při jejich využití jako nové neuroprotektivní látky. První významnější stinná stránka vzniká na základě silných kardiovaskulárních účinků agonistů A₁ receptoru. Navíc řada agonistů A₁ receptoru má nízkou prostupnost přes hematoencefalickou bariéru. Druhé omezení spočívá v krátkém úseku, kdy mohou agonisté A₁ receptoru vhodně působit. Časový úsek je omezen na několik hodin, nejvíce po počátečním poškození mozku. Toto je ztíženo i skutečností, že agonisty A₁ receptoru není možné řídit chronicky (jako prevenci), neboť nastane opačný účinek, kdy chronická stimulace A₁ receptorů zhorší nervové poškození, které vzniká na podkladě škodlivé noxy. Poslední úskalí při využití agonistů A₁ receptoru jako neuroprotektiva spočívá v tom, že při chronické aktivaci A₁ receptorů, se receptory po čase znečitliví (Cunha, 2005).

Dalo by se shrnout, že mnoho patofyziologických podmínek, které generují extracelulární endogenní adenosin, zapříčiní dlouhodobou down-regulaci A₁ receptorů, která brání neuroprotektivním účinkům A₁ receptorového systému během chronického působení škodlivých podmínek v mozkové tkáni. Z čehož lze usuzovat, že aktivace A₁ receptorů je důležitá pro kontrolu akutní fáze mozkové dysfunkce a neurodegenerace. Naopak z důvodů možné desenzitivizace A₁ receptorů, je A₁ receptorový systém méně vhodný pro vyvinutí neuroprotektivních činitelů, které se zaměřují na interferenci s dlouhodobými škodlivými podmínkami (Cunha, 2005).

3.4 Význam A₁ receptorů v mozku během prenatálního a časného postnatálního období

Exprese A₁ receptorů v mozku je přítomná, jakmile se poprvé objeví nervová tkáň. A₁ receptory jsou v nervovém systému exprimovány během nervového vzniku, migrace i axonálního pučení. Párování A₁ receptoru s efektořem se vyskytuje u embryí, u fetálního i neonatálního mozku (Rivkees, Wendler, 2011). Mozkové A₁ receptory jsou ontogeneticky řízeny, ale přestože jsou přítomny v časných vývojových fázích, jejich prenatální koncentrace je významně omezená (Rivkees et al., 2001). Jejich exprese i hustota se více rozvíjí až po narození, kdy výrazné navýšení přichází u potkanů mezi 9-15. dnem po narození (P9-15), (Cunha, 2005).

Embrya mohou být také vystavená hypoxii. Fetální hypoxie u člověka se může vyskytnout např. u těhotné matky, která během těhotenství kouří, u matek s anémií, s placentální insuficiencí, s preeklampsií, se srdeční, plicní či ledvinovou poruchou. Fetální hypoxie je asociovaná s intrauterinní růstovou retardací (Wendler et. al., 2007)

Wendler et al. (2007) udělali pokus, v němž březí samice laboratorních myší vystavili hypoxii od 7,5. do 10,5. dne gestace. Embrya, jež postrádala A₁ receptory, vykazovala mnohem výraznější růstovou retardací v porovnání s embryi bez A₁ receptorového deficitu. Tato data ukazují, že adenosinové působení přes A₁ receptory v srdci je významné jako protekce embrya proti hypoxickému inzultu (Wendler et al., 2007).

A₁ receptory nejsou esenciální pro normální fetální vývoj. Laboratorní myši s deficitem A₁ receptorů neměly za fyziologických podmínek defekty při narození, ani nebyly růstově retardované. Mozek těchto myší nezaznamenal zjevné strukturální abnormality, přesto byly objevené mírné odchylky v chování (Johansson et al., 2001). Přestože však A₁ receptor a adenosin nejsou potřebné pro normální mozkový vývoj, nadměrná aktivace A₁ receptorů způsobuje v tomto období mozkové poškození (Turner et al., 2002). A naopak blokáda endogenního adenosinu antagonistou A₁ receptoru nepůsobí na mozkové poškození u 7-denního modelu hypoxie-ischemie (Bona et al., 1997b).

Zatímco u dospělého mozku aktivace A₁ receptoru měla neuroprotektivní účinky na hypoxií poškozený mozek, nelze tyto poznatky mechanicky aplikovat na fetus či narozená zvířata (Cunha, 2005). Je dokázáno, že afinita A₁ receptorů se nemění u neonatálních zvířat (Gidday et al., 1995) a i dostatečné spřažení A₁ receptoru

s G proteiny se vyskytuje již před narozením (Turner et al., 2002). Přesto může být výkonnost A₁ receptorů u nezralého mozku redukována a to na základě nedostatečné hustoty těchto receptorů. To znamená, že receptory jsou už u neonatálních potkanů přítomny, jejich množství je však omezené minimálně do 3. týdne života (Gidday et al., 1995).

Navzdory tomu však bylo u novorozených zvířat zaznamenáno mnoho centrálních účinků zprostředkovaných A₁ receptory, např. kontrola epileptogeneze, axonální dozrávání, mozkový metabolismus a synaptický přenos. Tyto důkazy svědčí o tom, že A₁ receptory jsou v této době funkční (Cunha, 2005). Adenosin tak přes A₁ receptory sehrává důležitou modulační roli během prenatálního i postnatálního vývoje savců. Důležité je zmínit, že adenosin může prokazovat protektivní účinky, které však závisí především na načasování jeho expozice a na místě jeho působení (Rivkees, Wendler, 2011).

3.4.1 A₁ receptory a periventrikulární postižení bílé hmoty

Je prokázáno, že mozková produkce adenosinu (coby následek hypoxie-ischemie) se navýší i u neonatálních zvířat (Aden et al., 2001). Studie se však rozcházejí v účincích ovlivnění A₁ receptorů v raném postnatálním období. Nejnovější přehledová práce (Rivkees, Wendler, 2011) se přiklání k nepříznivým účinkům aktivace A₁ receptorů na vyvíjející se mozek v raném postnatálním období. Aktivace A₁ receptorů během 2 následujících týdnů vede k poškození bílé hmoty hlodavců a zároveň deficit či chemická blokáda A₁ receptorů tvoří protekci proti poškození bílé hmoty hypoxickou noxou u neonatálních zvířat (Turner et al., 2002). Blokace adenosinových receptorů kofeinem se tak může stát vítanou terapií u předčasně narozených dětí (Rivkees, Wendler, 2011). Podobné výsledky jsou zaznamenány i při aplikaci teofylinu. Zajímavé však je, že selektivní blokáda A₁ receptoru pomocí DPCPX, nezpůsobila výraznou změnu v poškozené tkáni (Bona et al., 1999).

Turner et al. (2002) ve své práci zkoumali účinky přetrvávající aktivace A₁ receptorů na vývoj mozku. Agonista A₁ receptorů (N⁶-cyklopentyladenosin) a blokátor periferních účinků tohoto adenosinového agonisty byly 2 x denně aplikovány neonatálním potkanům od P3 do P14. Při histologickém rozboru jejich mozku byly zaznamenány morfologické změny, které jsou velmi podobné těm, jež vidíme u poškozeného mozku u modelu perinatální hypoxie. Zaznamenána byla ventrikulomegalie a redukce objemu bílé i šedé hmoty (Turner et al., 2002). Je možné,

že přetrvávající aktivace A_1 receptorů vedla k receptorové desenzitizaci a pozměnění aktivity A_1 receptoru (Cunha, 2005; Rivkees, Wendler, 2011).

Další důkaz o nepříznivém působení aktivovaných A_1 receptorů se ukázal u neonatálních myší (bez deficitu A_1 receptorů), u nichž bylo hypoxií indukováno periventrikulární postižení bílé hmoty s redukcí myelinizace a ventrikulomegalie. U neonatálních myší, jež postrádaly A_1 receptor, periventrikulární postižení bílé hmoty nebylo zaznamenáno (Rivkees, Wendler, 2011).

Aden et al. (2001) ve své studii popisují nulové účinky ADAC, agonisty A_1 receptoru, na poškozený mozek u 7-denního modelu hypoxie-ischemie, které odůvodňují nedostatečným vývojem A_1 receptorů v nezralém mozku a bradykardií, která byla podanou látkou způsobena, a tím pravděpodobně vyrušila potenciální neuroprotektivní účinek ADAC. Navíc tyto autoři zmiňují, že na rozdíl od mozkové tkáně vazba na receptory v srdci je nejvyšší v prvních dnech života a dále se s věkem snižuje. V závěru navrhuje, že spíše jiné adenosinové receptorové subtypy jsou zodpovědné za protektivní účinek zvýšených hladin endogenního adenosinu po hypoxii-ischemii u nezralého mozku.

Nedostatek neuroprotektivních účinků aktivace A_1 receptorů u neonatálních zvířat může být zapříčiněn vývojovými změnami aktivovaných A_1 receptorů (Turner et al., 2002). Opačný účinek aktivovaných adenosinových receptorů na neuronální životnost nemusí vznikat na základě rozdílného fungování A_1 receptorů a A_2 receptorů u nezralých neuronů v porovnání se zralými neurony, ale v důsledku opačného působení intracelulární hladiny kalcia (Cunha, 2005). Zatímco aktivace NMDA receptorů a vzrůst intracelulární koncentrace volného kalcia jsou dva definované charakteristické znaky při neurotoxicitě neuronů u dospělých jedinců (Phillips, 1995), u nezralého CNS mohou být důležité pro přežití neuronů. Aktivace A_1 receptorů ve vyvinutých kortikálních neuronech (u novorozených potkanů) snižuje funkci NMDA receptorů a napěťově řízených kalciových kanálů způsobem, který je znám u dospělých potkanů. U nezralého mozku tato aktivace však spíše vede ke snížení životnosti neuronů namísto zamýšlené neuroprotektce, která byla dokumentována v preparátech mozku dospělých potkanů (Cunha, 2005).

Rivkees et Wendler (2011) uvádějí, že periventrikulární postižení reflektuje narušenou či pozměněnou maturaci oligodendrocytů, buněk, které myelinizují mozkovou tkáň. Hypoxií podmíněná změna vývojové linie oligodendrocytů asociuje hypomyelinizaci, na níž se podílí adenosin. Spíše než zapříčinění smrti buňky, adenosin

a hypoxie vedou k předčasné diferenciaci oligodendrocytových prekursorových buněk. Předpokládá se, že tato série událostí vede ke sníženému počtu oligodendrocytů, což přispívá k periventrikulárnímu poškození bílé hmoty.

Aktivace A_1 receptorů v období, které je ekvivalentní poslednímu trimestru těhotenství naruší vývoj oligodendrocytů způsobující hypomyelinizaci. Kofeinová léčba či vyřazení A_1 receptorů z funkce tak může podpořit myelinizaci u hypoxií postižených novorozenců (Rivkees et Wendler, 2011).

Zajímavé však je, že výsledky autorů Gidday et al. (1995) a Halle et al. (1997) se liší od výše uvedených. Gidday et al. ve své práci prezentují, že farmaka, která zvyšují extracelulární hladiny adenosinu v mozku, konkrétně inhibitor adenosinové deaminázy deoxycoformycin a inhibitor adenosinového vychytávání propetnofylin, poskytují významnou protekci proti hypoxickému poškození mozku u neonatálních potkanů. Farmaka byla zvířatům podána jednorázově, několik minut po hypoxickém inzultu v 7. postnatálním dni.

Halle et al. (1997) u stejného modelu perinatální hypoxie také popisují výrazné snížení mozkového poškození a to pomocí aplikace PD 81,273 (2-amino-3-benzoylthiophen), jež zvyšuje 2-5 x vazebnost adenosinu na A_1 receptor v hypoxické tkáni bez vedlejších účinků na srdeční činnost.

Všechny výše zmíněné studie se zabývaly neuronální ztrátou a morfologickými změnami mozku, jež měly objasnit či vyvrátit neuroprotektivní účinky adenosinu a jeho agonistů působící na A_1 receptory. Žádný z výše jmenovaných autorů však nehodnotil neuroprotektivní efekt pomocí behaviorálních funkcí testovaných zvířat.

4 Cíle a hypotézy

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv perinatální hypoxie na motorický vývoj laboratorních potkanů v důležitých milnících jejich vývoje. K hodnocení motoriky byly využity motorické testy, jež vycházely z dosažené motorické úrovně mladých potkanů. Dalším cílem této práce bylo hodnocení motorického vývoje potkanů postižených perinatální hypoxií, jimž byla aplikovaná látka 2-chloro-N(6)-cyklopentyladenosin (CCPA).

S kontrolními potkany byla porovnána skupina zasažená perinatální hypoxií a skupina zasažená perinatální hypoxií, u níž byla aplikována látka CCPA. Dále obě hypoxické skupiny (s a bez aplikace CCPA) byly porovnány mezi sebou. Porovnání všech tří skupin proběhlo v 5 vývojových stupních pro určení změn motoriky během vývoje.

Hypotéza 1

H_0 Motorika potkanů v rámci jedné skupiny se ve vývojových stupních nemění.

H_A Motorika potkanů v rámci jedné skupiny se významně mění ve vývojových stupních alespoň v jednom z provedených motorických testů.

Hypotéza 2

H_0 Motorika potkanů se po perinatální hypoxii významně nezmění v porovnání s kontrolní skupinou.

H_A Motorika potkanů se po perinatální hypoxii významně změní alespoň v jednom z provedených motorických testů v porovnání s kontrolní skupinou.

Hypotéza 3

H_0 Motorika potkanů se po perinatální hypoxii s aplikací CCPA významně nezmění v porovnání s kontrolní skupinou.

H_A Motorika potkanů se po perinatální hypoxii s aplikací CCPA významně změní alespoň v jednom z provedených motorických testů v porovnání s kontrolní skupinou.

Hypotéza 4

H_0 Motorika potkanů se po perinatální hypoxii s aplikací CCPA významně nezmění v porovnání s potkany ovlivněných pouze perinatální hypoxií.

H_A Motorika potkanů se po perinatální hypoxii s aplikací CCPA se významně změní alespoň v jednom z provedených motorických testů v porovnání s potkany ovlivněných pouze perinatální hypoxií.

Hypotéza 5

H_0 Aplikace látky CCPA v postnatálním období laboratorních potkanů ovlivněných perinatální hypoxií významně nezlepší motorický projev těchto potkanů v porovnání s hypoxickou skupinou.

H_A Aplikace látky CCPA v postnatálním období laboratorních potkanů ovlivněných perinatální hypoxií významně zlepší motorický projev těchto potkanů v porovnání s hypoxickou skupinu.

Hypotéza 6

H_0 Motorické deficity u potkanů ovlivněných perinatální hypoxií nepřetrvávají do rané dospělosti v žádném z motorických testů.

H_A Motorické deficity u potkanů ovlivněných perinatální hypoxií přetrvávají do rané dospělosti alespoň ve jednom z motorických testů.

5 Metodika výzkumné části diplomové práce

Ve výzkumné části jsme se pokusili experimentálně testovat motorický vývoj laboratorních potkanů ovlivněných perinatální hypoxií a dále zkoumat vliv látky agonisty adenosinového A1 receptoru 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosinu (CCPA) na motorický vývoj perinatální hypoxií postižených mláďat potkana.

Experimenty byly prováděny ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky (AVČR). Byly schváleny odbornou komisí AVČR, že jsou v souladu se zákonem ČR o ochraně zvířat proti týrání. Testování probíhalo v zatemněné místnosti s umělým osvětlením, s odvětráváním a klimatizací udržující stálou teplotu 22 °C.

Zvířata v průběhu experimentu pobývala ve zvěřinci ve standardních klecích s matkou a se sourozenci z vrhu do P21, nebo pouze se sourozenci stejného pohlaví od P21. Teplota místnosti zvěřince byla 22±1°C o relativní vlhkosti 60±5%, v místnosti byl nastaven střídavý režim tmy a světla měnící se po 12 hodinách (přepínání v 6 hodin ráno a 18 večer). Potravu a vodu měla k dispozici neomezeně, s výjimkou doby testování.

Motorické testy jsem prováděla a vyhodnocovala osobně v čase mezi 12. a 17. hodinou.

K testování nebylo využito videozáznamů, které by poskytly data pro statistické vyhodnocené kvalitativních ukazatelů motorického projevu. Bylo však provedeno subjektivní slovní hodnocení některých kvalitativních parametrů motorického projevu testovaných zvířat. Statisticky vyhodnocené výsledky obsahují pouze kvantitativně měřitelné znaky.

Sledování vývoje motoriky laboratorního potkana bylo provedeno celkem na 34 mláďatech outbredního kmene Wistar, ve věku P15 až P60, pocházejících z chovu AVČR. Zvířata byla podrobena 5 sezení motorického testování ve vybraných fázích vývoje – P15, P18, P21, P25, P60. Samotnému experimentu předcházelo předběžné testování na 10 zvířatech ve věku P25 pro získání zkušeností práce s potkany.

Z 34 mláďat jsme 10 zvířat využili pro kontrolní skupinu (dále skupina C), 13 potkanů bylo ovlivněno perinatální hypoxií (dále skupina H) a 11 zvířatům ovlivněných perinatální hypoxií byla aplikována látka agonista adenosinového A1 receptoru 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosin (CCPA), (dále Skupina HP).

Testování Skupiny C bylo provedeno na souboru sameček, pocházejících z 3 vrhů. Skupina H byla vytvořena ze 2 vrhů s přítomností obou pohlaví, 6 sameček, 7 sameček. Skupinu HP tvořil jeden vrh o 6 samečcích a 5 samečkách. Měření

jednotlivých skupin neprobíhalo v přesně stejném časovém období, nemohlo tedy dojít k záměně zvířat z různých skupin.

5.1 Perinatální hypoxie

Perinatální hypoxie začala již během intrauterinního vývoje, kdy březí matky byly v 11. dni termínované březosti (G11) umístěny do hypoxické normobarické komory s obsahem 10% O₂ ve zbytku N₂. Matky v komoře přebývaly do doby porodu, během porodu a následujících 6 dní po porodu spolu s mláďaty. Poté byla ukončena hypoxická fáze a celý vrh byl přemístěn do zvěřince s normálním ovzduším.

5.2 Aplikace látky

Potkanům ze Skupiny HP byl v P14 intraperitonálně aplikován 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosinu (CCPA) v dávce 1 mg/kg. Aplikace látky proběhla 24 hodin před prvním testováním motorických funkcí potkanů. Látka byla aplikovaná jednorázově. Nebyla vytvořena kontrolní skupina, již by byl aplikován fyziologický roztok.

5.3 Testy motorických dovedností

Pro sledování motorických dovedností byly vybrány 4 motorické testy, jež se dle rešerše (Vachovcová, 2012) jeví jako účinné pro sledování motorického vývoje ve 3. a 4. týdnu postnatálního života. Podle doporučení RNDr. Anny Mikulecké, PhD. bylo vytvořeno pořadí testů jdoucích za sebou, počty opakování a časové limity u každého testu. Počet opakování byl volen tak, aby test poskytl dostatečnou výpovědní hodnotu pro statistické zpracování, umožnil testy opakovat bezprostředně za sebou bez výrazného vyčerpání testovaných potkanů a zároveň co nejvíce zamezil i možnostem učení se motorickým dovednostem u těchto zvířat. Vždy přímo před testováním byla všechna testovaná zvířata označena a zvážena. Jednotlivé testy byly prováděny bezprostředně za sebou stále ve stejném pořadí: Balance beam test, Horizontal ladder rung walking test (pravidelný a nepravidelný typ)/Ascending ladder test, Bar holding test a Rotarod test. V prvních dvou testech byly naměřeny naráz všechny pokusy u jednoho zvířete, zatímco u zbylých dvou testů byl nejprve naměřen jeden pokus u všech zvířat a až po naměření posledního zvířete v daném pokusu se přistoupilo k měření dalšího pokusu a to z důvodů delšího trvání jednoho pokusu a možného vyčerpání zvířat. Zvířata byla v pokusech měřena vždy ve stejném sledu pro zajištění dostatečné doby odpočinku mezi jednotlivými testy.

Vzhledem k motorickým schopnostem vázaným na věk potkanů byly pozměněny některé parametry motorických testů (viz níže). U potkanů s věkem P15 a P18 byl využitý namísto Horizontal ladder rung walking testu Ascending ladder test. V Balance beam testu u zvířat v P15 a v P18 byla změněna šířka a délka příčky, kterou zvířata přecházela. U potkanů s věkem P60 tento test nebyl měřen z důvodu chybějícího vybavení testovací laboratoře pro takto stará zvířata.

5.3.1 Balance beam test

Využití Balance beam testu slouží k ohodnocení motorické koordinace, využívá se také k ohodnocení kloubní patologie.

V testu, jenž obsahoval 3 pokusy, 15-denní a 18-denní zvířata měla přejít 30 cm dlouhou příčku širokou 3 cm, umístěnou 30 cm nad zemí. 21denní a 25denní potkani měli za úkol přejít 60 cm příčku širokou 1 cm a taktéž umístěnou 30 cm nad zemí. U 60-denních potkanů test nebyl prováděn.

V testu se měřila doba, za kterou potkani ušli/uběhli vyměřenou vzdálenost a zároveň byl zaznamenán počet chyb v podobě sklouznutí či neumístění přední končetiny (PK) či zadní končetiny (ZK) na balanční úzkou plošinu, po které se pohybovali, anebo jako chyba bylo započítáno, když testovaný potkan spadl z plošiny dolů. V měření se nerozlišovalo, zda chyby byly provedeny PK či ZK. V testu byl určen časový limit 120 s, do kterého potkani museli úkol splnit.

5.3.2 Ascending ladder test

Tento test obsahuje drátěný žebřík o šířce 5 cm a výšce 75 cm s 38 příčkami umístěný v úhlu 45°. Základna žebříku je umístěná u hrany stolu, jenž je 35 cm nad zemí, a vrch žebříku je v kontaktu s platformou, kam jsou umístěni sourozenci testovaného potkana, aby podpořili jeho motivaci pohybovat se směrem nahoru. Testovaný potkan je umístěn na spodní příčce žebříku (ne však k úplné základně žebříku, aby mu takovéto umístění nemohlo poskytnout snadné uniknutí na plochu stolu). Tento test byl volen u 15-denních a 18-denních potkanů z důvodů větší potřeby takto starých potkanů utéct do bezpečí směrem nahoru a připojit se k sourozencům.

V testu byl měřen čas, za který potkan vyšplhal na výše uloženou platformu. Časový limit byl 60 s. V testu pak byl měřen počet chyb končetin bez rozlišení PK či ZK. Za chybu bylo považováno sklouznutí či minutí příčky, anebo opření končetiny o stojnu žebříku mimo úroveň podélné příčky.

5.3.3 Horizontal ladder rung walking test

100 cm dlouhý horizontálně umístěný žebřík byl složený ze 2 stěn z čirého plexiskla a kovových příček o průměru 3 mm, které lze vsunout tak, aby mohly mezi sebou tvořit minimální vzdálenost 1 cm. Žebřík byl umístěn 12 cm nad zemí s umístěnou prázdnou klecí na jedné straně a s klecí obsahující sourozence na straně druhé. Šířka žebříku mohla být aktuálně přizpůsobená podle individuální velikosti potkana, aby se neotočil při testování. Pro měření bylo využito 2 horizontálních žebříků. Jeden žebřík obsahoval pravidelně rozmístěné příčky po 2 cm (pravidelný typ). Druhý žebřík obnášel nepravidelně rozmístěné příčky, jejichž vzdálenosti se různily od 1 cm do 4 cm (nepravidelný typ).

Potkani měli za úkol přejít oba žebříky ve 4 pokusech, na každý žebřík připadaly 2 pokusy. Záznam každého pokusu obsahoval dobu vykonávaného úkolu a počet chyb končetinami bez rozlišení PKK či DKK. Chyba byla zaznamenána, když došlo ke sklouznutí a propadnutí končetiny mezi příčkami. Doba pokusu byla limitována na 60 s.

5.3.4 Rotarod test

Pomocí tohoto testu se vyšetřuje motorická koordinace a rovnováha. Jedná se o otočný válec o průměru 6 cm s vrásněným povrchem, který je rozdělen do 4 úseků se šířkou 8,5 cm, a který se otáčí různě nastavitelnou rovnoměrnou rychlostí. Testované zvíře se umístí na válec hlavou proti směru otáčení a měří se doba, dokud zvíře nepadne z rotujícího válce dolů.

V každém vývojovém stupni byli potkani měřeni ve 2 pokusech při zvolené rychlosti vhodné pro dané vývojové období. Pro 15-denní a 18-denní potkany byla zvolena rychlost otáčení 5 otáček za minutu (rpm). U 21-denních a 25-denních byly zvoleny 2 rychlosti: 5 rpm a 15 rpm. U 60-denních potkanů byly zvoleny 3 rychlosti: 10 rpm, 15 rpm, 20 rpm. Časový limit jednoho pokusu byl zvolen na 120 s pro všechna zvířata do P25. Považujeme ho za maximální čas, který jsou potkani schopni přetrvat na otáčejícím se válci, aniž by pro tuto činnost ztratili motivaci. Časový limit byl změněn u 60-denních zvířat na 60 s ze stejného důvodu.

5.3.5 Bar holding test

Zvíře bylo předními packami zavěšeno na horizontální dřevěnou hrazdu tak, že ho testující osoba držela jednou rukou za zátylek a druhou rukou mu dopomohla umístit

přední packy na hrazdu. Hrazda byla 25 cm dlouhá, byla umístěná ve výšce 25 cm nad podložkou a její průměr činil 1 cm.

Byla zaznamenána doba, po kterou se zavěšené zvíře na hrazdě udrželo s časovým limitem 120 s. Dále se sledovalo, jestli byl potkan schopný přitáhnout ZKK k hrazdě.

5.3.6 Statistické zpracování dat

Data všech 3 skupin, (C, H, HP) naměřená ve všech výše zmíněných testech a v soboru obsahující hmotnost zvířat v každém vývojovém období byla podrobena statistické analýze pomocí statistického softwaru SigmaStat. Všechna data prošla deskriptivní statistikou, která je určena pro statistické soubory s jedním argumentem, pro testování normality distribuce hodnot. Pro zhodnocení výsledků byl využitý párový t-test pro porovnání 2 různých sezení u jedné skupiny v jednom vývojovém období a pro porovnání stejné skupiny ve 2 vývojových obdobích u vybraných testů. Dále byla využita jednosměrná analýza rozptylu One way ANOVA, pomocí které jsme zjišťovali odlišnost naměřených hodnot jednoho testu u 3 různých skupin s následným párovým srovnáváním Holm-Sidakovým testem. Hladina významnosti byla stanovena na 5% ($P < 0,05$).

6 Výsledky

Průměrné výsledky se střední chybou uvádíme v rámci tabulek a signifikantní rozdíly znázorňujeme v podobě obrázků s grafy.

6.1 Hmotnost

Byl zaznamenán hmotnostní úbytek u skupin H a HP ve všech vývojových fázích v porovnání se skupinou C. Vyšší průměrná hmotnost byla signifikantně prokázána u skupiny H v porovnání se skupinou HP ve všech vývojových fázích s výjimkou P60 (Tabulka 1).

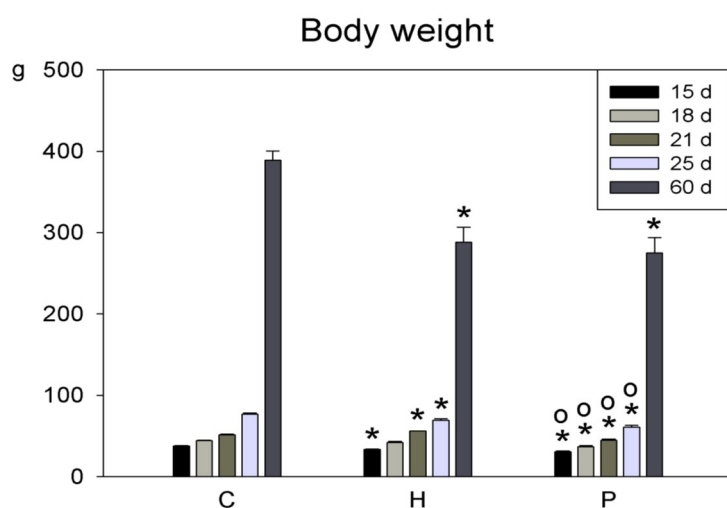
V P15 jsme v hmotnostních rozdílech zaznamenali hladinu statistické významnosti ve všech 3 skupinách (C, H, HP) při jejich vzájemném porovnání. Největší průměrná hmotnost se vyskytuje u skupiny C, nižší hmotnost u skupiny H a nejnižší hmotnost je zaznamenána u skupiny HP.

V P18 nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v hmotnosti mezi skupinou C a skupinou H. Zaznamenali jsme však signifikantní rozdíly v hmotnosti mezi skupinou C a HP a skupinou H a HP.

V P21 byly také zaznamenány signifikantní rozdíly mezi skupinou C a HP a mezi skupinou H a HP.

V P25 byly vypočítány signifikantní rozdíly u všech 3 skupin.

V P60 byly signifikantní rozdíly skupin C a H a u skupin C a HP. Rozdíl mezi skupinou H a HP nedosáhl statistické významnosti.



Obrázek 2. Sloupcový diagram ukazuje hmotnost (g). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP (P). U každé skupiny jsou v různých odstínech šedi znázorněny sloupce diagramu znázorňující jeden vývojový stupeň (v řadě zleva: P15, P18, P21, P25, P60). Na ose Y je znázorněna hmotnost (g). * = sign. rozdíly proti sk. C, o = rozdíly sk. HP proti H

Věk (dny) / hmotnost (g)	C	H	HP
P15	37,6 ± 0,48	33,6 ± 0,67	30,7 ± 1,11
P18	44,5 ± 0,3	42,3 ± 0,88	36,9 ± 1,27
P21	55,9 ± 0,37	51,3 ± 1,05	44,7 ± 1,6
P25	77,1 ± 1,09	69,5 ± 1,55	60,9 ± 2,15
P60	389 ± 5,15	288 ± 18,75	275 ± 18,80

Tabulka 1. Průměrná hmotnost a ± střední chyba (g) měnící se s věkem zvířat (P15 – P60) u skupiny C, H a HP

6.2 Balance beam test

V Balance beam testu jsme měřili 2 kvantitativní parametry: časové hodnoty a počet chyb ve 3 sezeních.

6.2.1 Čas

U skupiny C jsme od P15 do P18 zaznamenali výrazné zkrácení času potřebné k přemístění po balanční plošině (širší typ plošiny). Rychleji tento úkol testování potkani zvládli také v P25 oproti P21 (na užším typu balanční plošiny), (Tabulka 2, Tabulka 3). Signifikantní rozdíly mezi sezeními jsme zaregistrovali pouze v P25 mezi 1. a 3. sezením, kdy u 3. sezení se výrazně zkrátil čas pro vykonání úkolu (Obrázek 3).

Skupině H trvalo delší dobu přejít přes příčku než kontrolní skupině v P15, v P18 a v P25 ve všech třech sezeních. Se významnými rozdíly v P18 (v 1. a 3. sezení) a v P25 (1. sezení). V P15 jsme zaregistrovali významný rozdíl mezi 1. a 3. sezením, kdy ve 3. sezení testovaná zvířata splnila úkol mnohem rychleji než v 1. sezení.

U skupiny HP v porovnání se skupinou H jsme naměřili kratší časy potřebné k přejití obou typů balančních plošin ve všech vývojových fázích a ve všech sezeních s jedinou výjimkou v P21 v 1. sezení, kdy průměrný čas skupiny HP byl nepatrně delší (bez významných rozdílů), než u skupiny H. Hladiny statistické významnosti jsme zaregistrovali mezi těmito skupinami v P15 v 1. a 2. sezení a těsně pod hladinou statistické významnosti se vyskytly výsledky v P25 v 2. (P = 0,052) a 3. sezení. Signifikantní rozdíly mezi sezeními jsme zaregistrovali v P18 ve 2. sezení v porovnání s 1. sezením, dále v P21 ve 2. a 3. sezení a v P25 ve 2. sezení oproti 1. sezení. U 1. sezení jsme naměřili vždy delší časy, než v dalších sezeních, což dokumentuje schopnost motorického učení při opakování úkolu.

Věk (dny) /chyby	C1	C2	C3	H1	H2	H3	HP1	HP2	HP3
P15	3,6 ±0,79	3,4 ±0,62	1,5 ±0,37	3,8 ±0,74	3,2 ±0,77	1,5 ±0,31	4,5 ±0,28	3,0 ±0,43	2,4 ±0,45
P18	1,6 ±0,22	0,6 ±0,22	0,2 ±0,13	2,7 ±0,50	1,6 ±0,27	1,2 ±0,40	1,9 ±0,25	1,2 ±0,35	1,1 ±0,25

Tabulka 2. Průměrný čas a ± střední chyba (s) v Balance beam testu měnící se s věkem zvířat (P15, P18) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

Věk (dny) /chyby	C1	C2	C3	H1	H2	H3	HP1	HP2	HP3
P21	3,4 ±0,78	3,8 ±0,59	2,2 ±0,39	2,0 ±0,33	1,7 ±0,29	1,6 ±0,30	2,7 ±0,68	2,0 ±0,54	2,1 ±0,67
P25	1,8 ±0,44	1,6 ±0,40	0,8 ±0,33	2,5 ±0,42	2,1 ±0,45	1,2 ±0,28	1,5 ±0,43	0,8 ±0,33	1,2 ±0,35

Tabulka 3. Průměrný čas a ± střední chyba (s) v Balance beam testu měnící se s věkem zvířat (P21, P25) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

6.2.2 Chyby

V tomto testu byli vyřazeni pro statistické zpracování chyb v P15 ze skupiny C 2 potkání v 1. sezení a 1 potkan ve 3. sezení, ze skupiny H 2 potkání v prvním sezení, 3 potkání ve 2. sezení a 2 potkání ve 3. sezení (ze skupiny HP nebyl vyřazený žádný potkan) protože do maximálního časového limitu zůstali bez lokomočního projevu a tedy bez možnosti udělat chybu.

U skupiny C se v P15 snižoval počet chyb při každém dalším provedeném sezení (Tabulka 4). Mezi 1. a 3. sezením jsme spočítali signifikantní rozdíly. Počty chyb se dále snižovaly v P18 (již bez signifikantních rozdílů), a kdy také v P18 testování potkání dělí významně méně chyb než v P15. V P21 a v P25 rozdíly v počtu chyb byly méně výrazné (neprokázaly se signifikantní rozdíly), (Tabulka 5).

U skupiny H jsme zaznamenali signifikantní rozdíly v P21, kdy překvapivě hypoxií ovlivněná zvířata prokazovala výrazně nižší počet chyb, než zvířata z kontrolní skupiny. V tomto případě si tyto výsledky vysvětlujeme tím, že hypoxická zvířata měla zcela změněný motorický vzor při plnění úkolu, který tak způsobil nižší počet chyb (viz Subjektivní hodnocení 6.2.3). Statisticky významné rozdíly mezi sezeními jsme zaznamenali v P15 a v P25 ve 3. sezení v porovnání s 1. sezením.

U skupiny HP jsme v počtu chyb nezaregistrovali žádné signifikantní rozdíly od skupiny H i od skupiny C s výjimkou v P21 ve 2. sezení, kdy skupina HP podobně jako skupina H měla výrazně méně chyb v porovnání se skupinou C. Domníváme se, že důvod je stejný jako u skupiny H. Statisticky významné rozdíly mezi sezeními jsme zaregistrovali pouze v P15 ve 2. a 3. sezení v porovnání s 1. sezením.

Věk (dny) /chyby	C1	C2	C3	H1	H2	H3	HP1	HP2	HP3
P15	3,6 ±0,79	3,4 ±0,62	1,5 ±0,37	3,8 ±0,74	3,2 ±0,77	1,5 ±0,31	4,5 ±0,28	3,0 ±0,43	2,4 ±0,45
P18	1,6 ±0,22	0,6 ±0,22	0,2 ±0,13	2,7 ±0,50	1,6 ±0,27	1,2 ±0,40	1,9 ±0,25	1,2 ±0,35	1,1 ±0,25

Tabulka 4. Průměrný počet chyb a ± střední chyba v Balance beam testu měnící se s věkem zvířat (P15, P18) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

Věk (dny) / chyby	C1	C2	C3	H1	H2	H3	HP1	HP2	HP3
P21	3,4 ±0,78	3,8 ±0,59	2,2 ±0,39	2,0 ±0,33	1,7 ±0,29	1,6 ±0,30	2,7 ±0,68	2,0 ±0,54	2,1 ±0,67
P25	1,8 ±0,44	1,6 ±0,40	0,8 ±0,33	2,5 ±0,42	2,1 ±0,45	1,2 ±0,28	1,5 ±0,43	0,8 ±0,33	1,2 ±0,35

Tabulka 5. Průměrný počet chyb a ± střední chyba v Balance beam testu měnící se s věkem zvířat (P15, P18) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

6.2.3 Subjektivní hodnocení kvality pohybu

U 5 potkanů (38 %) ze Skupiny H a u 4 potkanů (36 %) ze Skupiny HP ve věku P15 byly z důvodů motorické dyskoordinace a nestability zaznamenány pády při přecházení balanční plošiny. Pády se u těchto potkanů objevovaly i při pokusu o otočku pro potřebu změnit směr v pohybu. V P15 se u 5 potkanů (38 %) ze skupiny H a u 6 potkanů (55%) ze skupiny HP objevil pohyb pomocí pouze PKK, zatímco ZKK byly bezvládně taženy za tělem. Pády ani pohybové odchylky se nevyskytly u skupiny C.

V P18 se potkani ve všech skupinách pohybovali pravidelnou reciproční chůzí pomocí všech končetin.

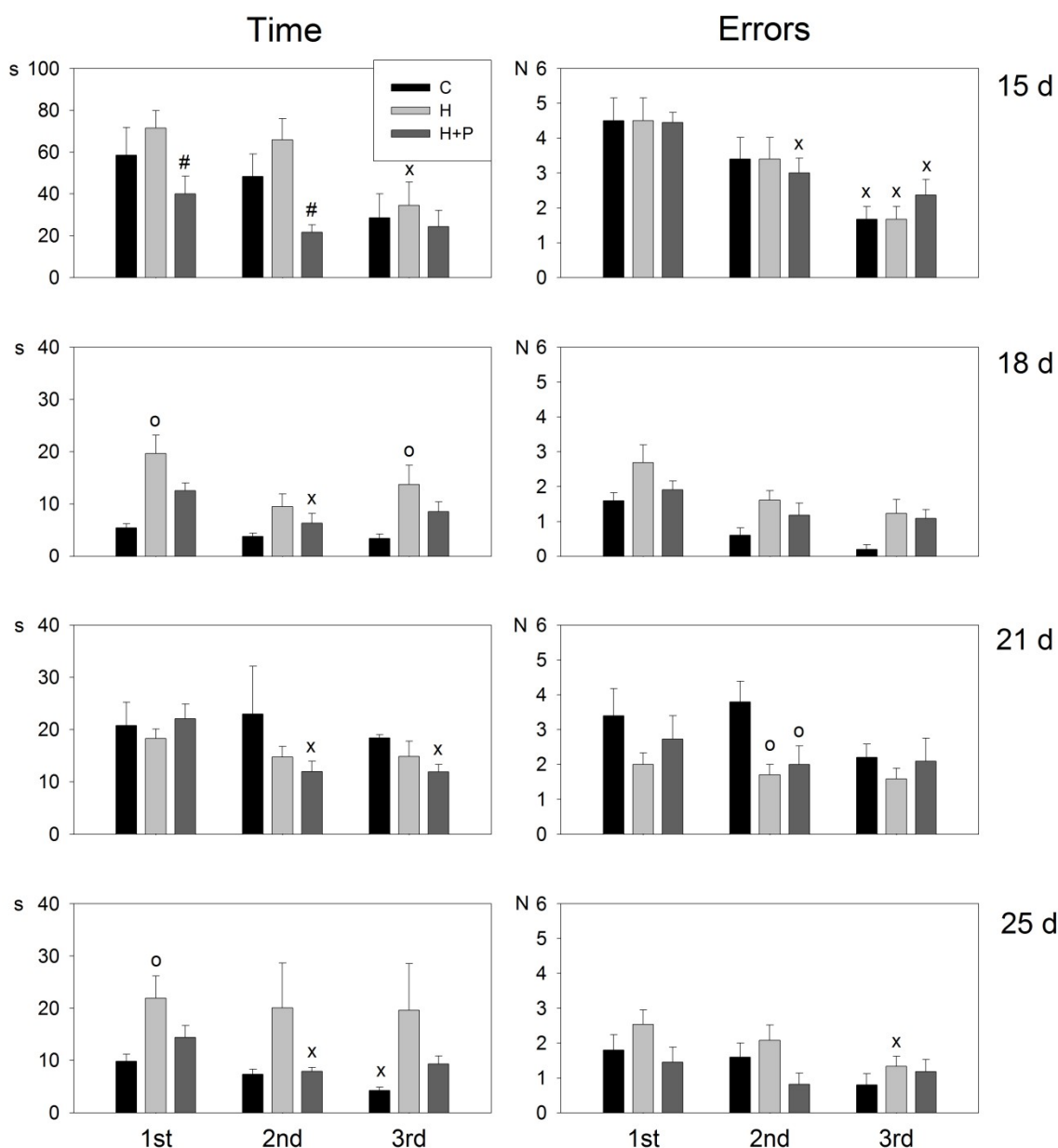
V P21 byla příčka, na které měla zvířata přecházet vyměněna za delší a užší. V tomto věku se u 9 zvířat (69 %) ze skupiny H a u 10 zvířat (90 %) ze skupiny HP vyskytl charakteristický motorický projev pohybu vpřed, ve kterém zvířata pevně obemkla zadními končetinami užší (1 cm širokou) platformu a pohybovala se pouze pomocí silného tahu PKK. Vykazovala tak menší počet chyb než jejich druzi ze stejné skupiny, kteří se pohybovali pomocí všech 4 končetin, a kteří dělali nejčastěji chyby zadními končetinami. Tento motorický projev nebyl zaznamenán u skupiny C.

V P21 jsme zaznamenali ve všech třech testovaných skupinách sníženou potřebu otočky pro změnu směru pohybu, jejíž důvod spočíval v rychlejší možnosti úniku ke stabilní plošině. Domníváme se, že testovaná zvířata byla více motivovaná dosáhnout vzdálenější plošiny s umístěnými sourozenci.

V P25 ve skupině H se v prvním pokuse objevil u 8 zvířat (62 %) výše zmíněný pozměněný motorický vzor, ve kterém testovaní hlodavci využili pouze PKK namísto kvadrupedální lokomoce, pouze však jedno zvíře (8 %) vykazovalo tento vzor ve všech 3 pokusech. U skupiny HP se tímto způsobem v prvním pokuse pohybovalo 8 zvířat (72%) a tento vzor přetrval u 3 jedinců (27 %) ve všech 3 pokusech.

U 60-denních potkanů se tento test nedělal z důvodů nedostatečné technické výbavy pohybové laboratoře pro takto staré potkany.

Beam walking



Obrázek 3. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Balance beam testu v P15 (první 2 grafy od shora), v P18 (druhé 2 grafy od shora), v P21 (třetí 2 grafy od shora) a v P25 (nejníže umístěné 2 grafy). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: pořadí sezení (1st, 2nd, 3rd); v každém sezení sloupce diagramu znázorňují: skupinu C (černě), skupina H (světle šedě) a skupina HP (tmavě šedě) u všech 8 grafů. Na ose Y u grafů v levé části obrázku je znázorněna doba (s), za kterou testovaní potkani přešli balanční plošinu. Na ose Y v pravé části obrázku je zobrazen počet chyb (N), které při přecházení balanční plošiny potkani učinili. x = rozdíl mezi 1. a 2. sezením; o = rozdíl proti sk. C; # = rozdíl sk. HP proti sk. H

6.3 Ascending ladder test

V Ascending ladder testu jsme měřili u 15 a 18denních mláďat 2 kvantitativní parametry: časové hodnoty a počet chyb ve 2 sezeních.

6.3.1 Čas

U skupiny C jsme naměřili nižší průměrný čas potřebný pro vylezení ascendentního žebříku v P18 než v P15 ve 2. sezení V P18 jsme také naměřili statisticky významně kratší čas ve 2. sezení v porovnání s 1. sezením (Tabulka 6).

U skupiny H jsme zaznamenali signifikantní rozdíl v době vylezení po ascendentním žebříku v P15 v porovnání se skupinou C, kdy zvířata ze skupiny H potřebovala více než dvojnásobný průměrný čas ke zdolání stejného úkolu jako skupina C v obou sezeních (Obrázek 4). V P18 se tento čas u skupiny H zkrátil o více než polovinu v prvním sezení při srovnání s časem v P15. Rozdíly v P18 v porovnání se skupinou C byly ještě signifikantní ve 2. sezení.

U skupiny HP jsme v P15 u obou pokusů zaznamenali kratší dobu potřebnou ke zvládnutí úkolu, než bylo zaregistrováno u skupiny H, avšak rozdíly nedosáhly hladiny statistické významnosti. Signifikantně delší čas jsme však spočítali v porovnání se skupinou C. V P18 průměrná doba potřebná pro vylezení ascendentního žebříku byla u skupiny HP signifikantně kratší než u skupiny H v 1. sezení.

Věk (dny) / čas (s)	H1	H2	C1	C2	HP1	HP2
P15	87,4 ±7,50	71,4 ±9,78	43,6 ±8,90	40,2 ±12,69	66,7 ±7,70	55,2 ±9,64
P18	49,2 ±5,25	31,0 ±5,65	36,3 ±10,28	18,6 ±2,85	30,3 ±4,36	21,9 ±6,57

Tabulka 6. Průměrný čas a ± střední chyba (s) v Ascending ladder testu měnící se s věkem zvířat (P15, P18) u skupiny C, H a HP. Číslíčky za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

6.3.2 Chyby

V tomto testu byli vyřazeni pro statistické zpracování chyb v P15 ze skupiny H 1 potkan v 1. sezení, 3 potkani ve 2. sezení z důvodu naměření maximálního časového limitu bez lokomočního projevu a tedy bez možnosti učinění chyb.

Počet chyb byl v 1. pokuse u skupiny C v P15 významně vyšší než ve 2. pokusu. V P18 se tento počet v 1. sezení významně snížil v porovnání s počtem chyb v P15 (Tabulka 7). V P18 se mezi sezeními nevyskytly významné rozdíly.

U skupiny H jsme nezaznamenali výrazné rozdíly v počtu chyb v porovnání se skupinou C v P15 ani v P18. Signifikantní rozdíly se u této skupiny objevily pouze v 1. a 2. sezení v P15.

Rozdíl s dosažení statistické významnosti se objevil u skupiny HP v P15 v obou sezeních, kde se objevilo výrazné navýšení chyb při srovnání se skupinami C. Výrazné snížení v počtu chyb se u skupiny HP objevilo v P18 při srovnání s počtem chyb v P15. V porovnání se skupinami C a H měli testovaní potkani ze skupiny HP v P18 nejméně

chyb s dosažením signifikantního rozdílu se skupinou H v 1. sezení a se skupinou C ve 2. sezení.

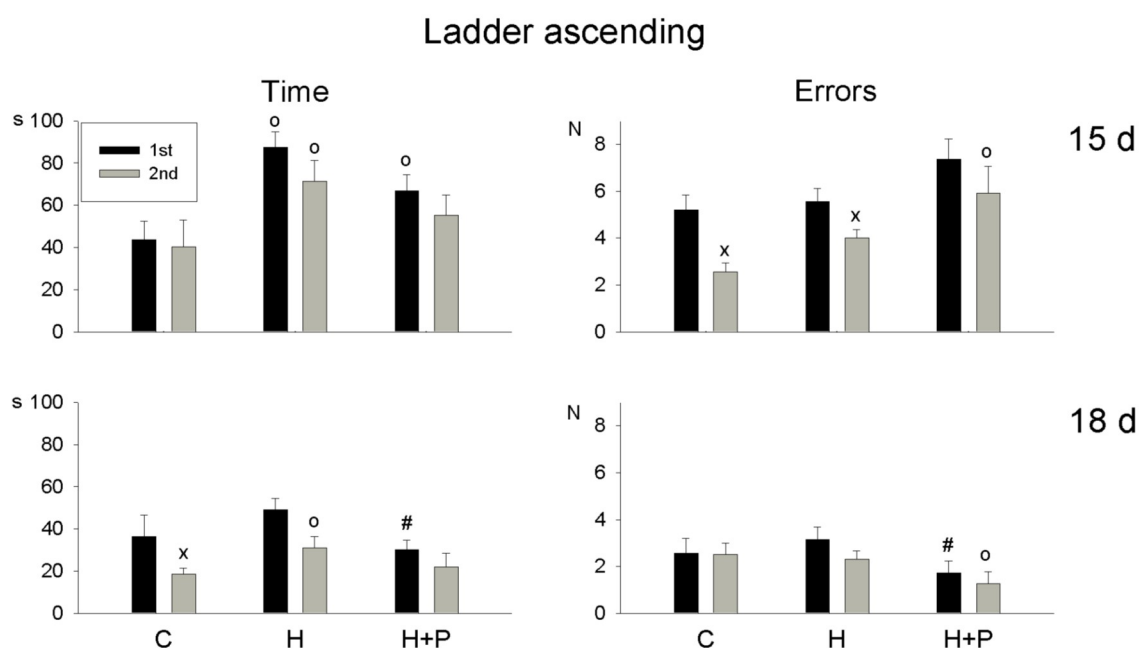
6.3.3 Subjektivní hodnocení kvality pohybu

Ve věku P15 potkani ze skupiny H z počátku setrvali na místě a mapovali terén po stranách žebříku. 3 potkani (23 %) zůstali na místě po celou dobu časového limitu. Domníváme se, že důvodem setrvání na místě byl velký strach z pádu v průběhu lezení. U 9 testovaných zvířat (69 %) ze skupiny H a u 6 zvířat (55 %) ze skupiny HP byl zaznamenán průběh pohybu pomocí homologního lezení namísto recipročního umístění pacek na příčky žebříku. Do motorického projevu navíc byli minimálně zapojené ZKK, kde nebyl zaznamenán odraz od obou ZKK ani nárok jedné ZK. Pohyb byl uskutečněn přes vytažení PKK. Tento motorický stereotyp nebyl sledován u skupiny C.

V P18 jsme registrovali sníženou motivaci dostat se ke svým sourozencům u 7 potkanů (54 %) ze skupiny H. Tito potkani se namísto pohybu do výšky otáčeli a volili obrácený způsob úniku.

Věk (dny) / chyby	H1	H2	C1	C2	HP1	HP2
P15	5,5 ±0,56	4,0 ±0,37	5,2 ±0,65	2,6 ±0,38	7,4 ±0,87	5,9 ±1,15
P18	3,2 ±0,54	2,3 ±0,35	2,6 ±0,65	2,5 ±0,50	1,7 ±0,51	1,3 ±0,49

Tabulka 7. Průměrný počet chyb a ± střední chyba v Ascending ladder testu měnící se s věkem zvířat (P15, P18) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení



Obrázek 4. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Ascending ladder testu v P15 (horní 2 grafy) a v P18 (dolní 2 grafy). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP u všech 4 grafů. Na ose Y u grafů v levé části obrázku je znázorněna doba (s), za kterou testování

potkani z daných skupin vylezli na ascendentní žebřík. Na ose Y v pravé části obrázku je zobrazen počet chyb (N), které během lezení testovaní potkani učinili. Černě jsou zaznamenány výsledky 1. sezení, šedě výsledky 2. sezení. x = rozdíl mezi 1. a 2. sezením; o = rozdíl proti skupině C; # = rozdíl sk. HP proti sk. H

6.4 Horizontal ladder rung walking test - pravidelný typ

V pravidelném typu horizontálního žebříku jsme měřili 2 kvantitativní parametry: časové hodnoty a počet chyb ve 2 sezeních.

6.4.1 Čas

U skupiny C se v P25 potřebná průměrná doba k přejití horizontálního žebříku signifikantně zkrátila (přibližně o polovinu v obou sezeních z původní doby naměřené v P21). V P60 již nebyla zaznamenána kratší doba při plnění úkolu (Tabulka 8), ve 2. sezení byly naopak naměřeny vyšší hodnoty oproti 1. sezení se signifikantním rozdílem.

U skupiny H byla v P21 (ve 2. sezení) a v P25 (obou sezeních) naměřena významně delší doba u testovaných zvířat při plnění úkolu, než jsme zaznamenali u skupiny C (Obrázek 5). V P60 jsme naopak u skupiny H zaznamenali signifikantně kratší čas v 1. sezení v porovnání se skupinou C

U skupiny HP jsme v P21 zaznamenali kratší průměrné časy než u skupiny H, avšak bez dosažení hladiny statistické významnosti. V P25 tyto rozdíly již hladiny statistické významnosti dosáhly v obou pokusech. Dále signifikantně kratší průměrná doba se objevila v P60 v porovnání se skupinou C.

Věk (dny) /čas (s)	H1	H2	C1	C2	HP1	HP2
P21	16,5 ±2,26	14,7 ±1,51	12,7 ±2,36	9,6 ±1,87	13,6 ±1,96	12,3 ±1,11
P25	17,5 ±2,24	14,8 ±2,26	7,0 ±0,52	6,2 ±0,69	7,0 ±0,67	6,3 ±0,60
P60	9,2 ±0,96	8,8 ±1,06	8,6 ±0,93	16,1 ±2,68	6,8 ±0,81	6,5 ±1,28

Tabulka 8. Průměrný čas a ± střední chyba (s) v Horizontal ladder rung walking testu (pravidelný typ) měnící se s věkem zvířat (P21, P25, P60) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

6.4.2 Chyby

U skupiny C docházelo k postupnému snižování počtu chyb s narůstajícím věkem testovaných potkanů v obou sezeních (Tabulka 9).

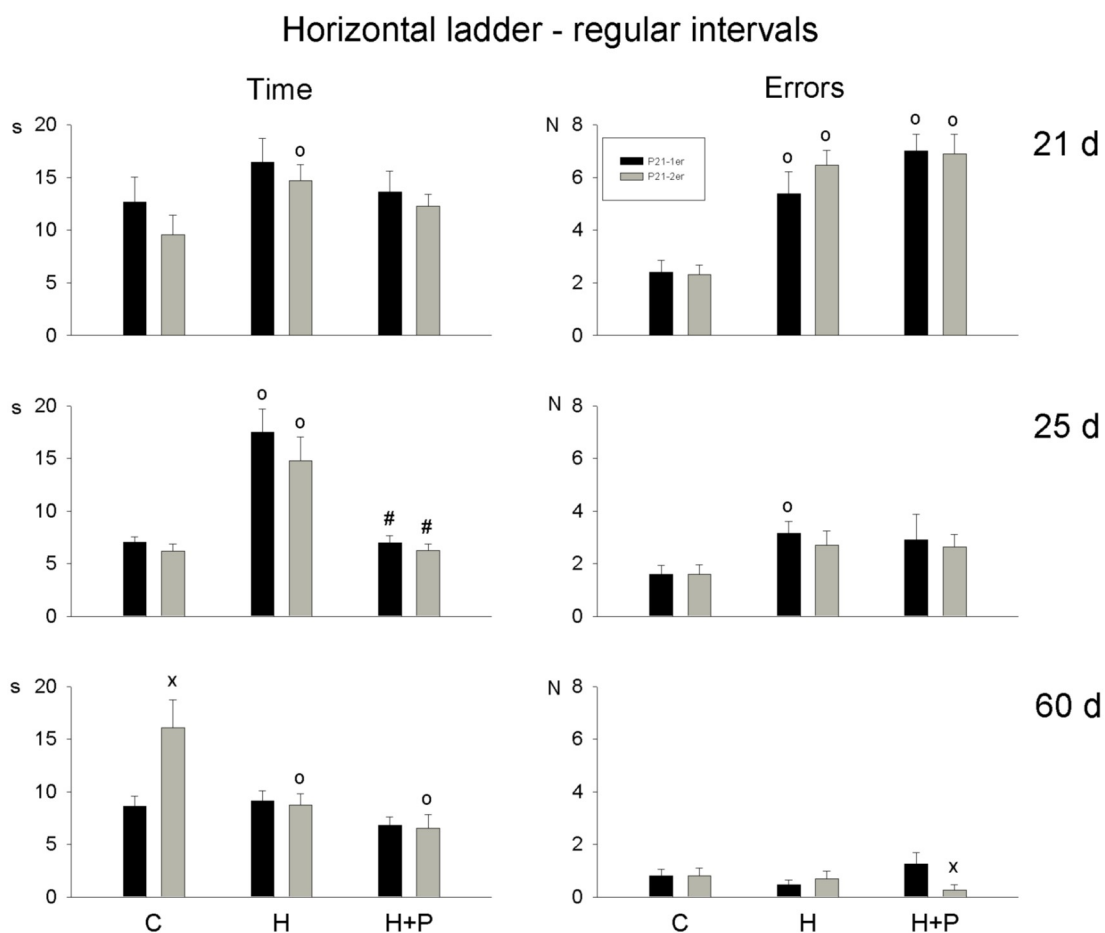
U skupiny H se v P21 objevil signifikantní rozdíl v počtu chyb u obou sezeních při srovnání se skupinou C. Tento rozdíl stále přetrvával v P25 v 1. sezení. V P60 nebyly zaregistrované signifikantní rozdíly mezi žádnou skupinou.

U skupiny HP byly v P21 zaznamenány nejvýraznější rozdíly v průměrném počtu chyb. Hladina statistické významnosti byla dosažena mezi skupinou HP a C u obou pokusů. V P25 průměrný počet chyb významně klesl při srovnání s počtem chyb

v P21. Zaznamenané rozdíly v porovnání se skupinami C i H nebyly již v P25 a v P60 významné. Signifikantně kratší průměrný čas byl pouze naměřen ve 2. sezení proti 1. sezení.

Věk (dny) / chyby	H1	H2	C1	C2	HP1	HP2
P21	5,4 ±0,84	6,5 ±0,57	2,4 ±0,45	2,3 ±0,37	7,0 ±0,65	6,9 ±0,72
P25	3,2 ±0,45	2,7 ±0,56	1,6 ±0,34	1,6 ±0,37	2,9 ±0,97	2,6 ±0,47
P60	0,5 ±0,18	0,7 ±0,31	0,8 ±0,25	0,8 ±0,29	1,3 ±0,41	0,3 ±0,20

Tabulka 9. Průměrný počet chyb ± střední chyba v Horizontal ladder rung walking testu (pravidelný typ) měnící se s věkem zvířat (P21, P25, P60) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení.



Obrázek 5. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Horizontal ladder rung walking testu s pravidelně umístěnými příčkami v P21 (horní 2 grafy) a v P25 (prostřední 2 grafy) a v P60 (dolní 2 grafy). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP u všech 6 grafů. Na ose Y u grafů v levé části obrázku je znázorněna doba (s), za kterou testovaní potkani přešli pravidelný horizontální žebřík. Na ose Y v pravé části obrázku je zobrazen počet chyb (N), které při přecházení pravidelného žebříku testovaní potkani učinili. Černě jsou zaznamenány výsledky prvního sezení, šedě výsledky 2. sezení. x = rozdíl mezi 1. a 2. sezením; o = rozdíl proti sk. C; # = rozdíl sk. HP proti sk. H

6.5 Horizontal ladder rung walking test – nepravidelný typ

V nepravidelném typu horizontálního žebříku jsme měřili 2 kvantitativní parametry: časové hodnoty a počet chyb ve 2 sezeních.

6.5.1 Čas

Čas u skupiny C, který jsme zaznamenali v P21 v obou sezeních, se výrazně nezměnil v P25. V P60 se sice prodloužil, ale nedosáhl hladiny statistické významnosti.

U skupiny H byly zaznamenány signifikantně delší časy v obou sezeních v P21 v porovnání se skupinou C (Tabulka 10). V P25 signifikantní rozdíl ještě přetrvával 1. sezení. V P60 nebyly zaznamenány rozdíly mezi skupinami.

U skupiny HP nebyly zaznamenány výrazné rozdíly v čase při srovnání se skupinou C v žádné vývojové fázi (P21, P25, P60) v obou sezeních (Obrázek 6). Signifikantně kratší průměrné časy v obou sezeních byly naměřené v P21 i v P25 při srovnání se skupinou H.

Věk (dny) / čas (s)	H1	H2	C1	C2	HP1	HP2
P21	28,8 ±6,10	24,2 ±3,71	7,9 ±1,75	8,9 ±1,55	12,1 ±1,74	11,5 ±2,27
P25	21,4 ±3,59	14,7 ±2,91	8,6 ±1,71	11,3 ±1,32	9,2 ±1,65	7,7 ±0,96
P60	9,5 ±1,29	12,4 ±1,81	15,3 ±1,53	14,3 ±1,09	9,2 ±1,21	10,5 ±1,30

Tabulka 10. Průměrný čas a ± střední chyba (s) v Horizontal ladder rung walking testu (nepravidelný typ) měnící se s věkem zvířat (P21, P25, P60) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

6.5.2 Chyby

U skupiny C se postupně snižoval počet chyb v obou sezeních s narůstajícím věkem testovaných potkanů (Tabulka 11).

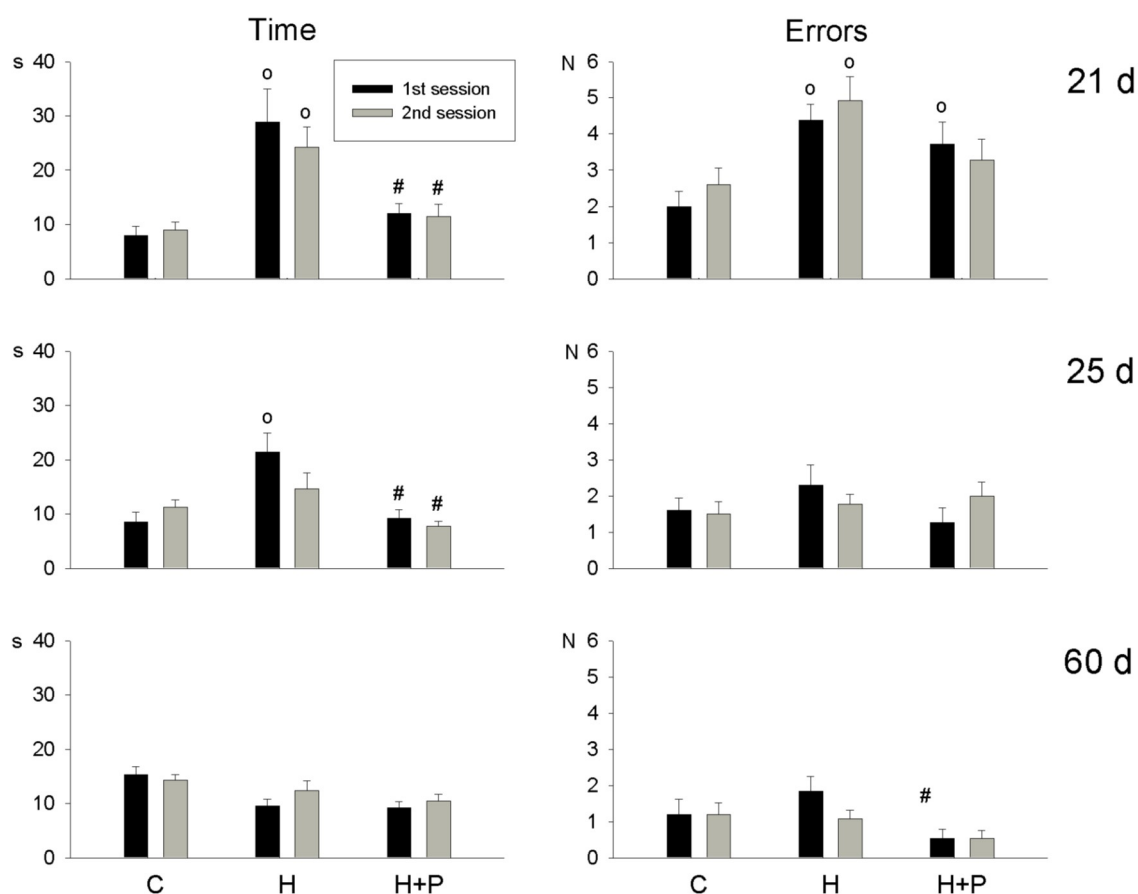
U skupiny H byl průměrný počet chyb signifikantně vyšší než u skupiny C v obou sezeních v P21. Tento rozdíl již nebyl patrný v P25 a v P60.

U skupiny HP v P21 byl zaznamenán vyšší počet chyb než u skupiny C a zároveň menší počet chyb, než u skupiny H v obou pokusech. Tyto rozdíly dosáhly hladiny statistické významnosti v 1. sezení. V P25 již nebyly rozeznatelné rozdíly v porovnání se skupinami C a H. V P60 byl u skupiny HP zaznamenán nejmenší průměrný počet chyb ze všech skupin se signifikantním rozdílem při srovnání se skupinou H v 1. sezení.

Věk (dny) / chyby	H1	H2	C1	C2	HP1	HP2
P21	4,4 ±0,43	4,9 ±0,67	2,0 ±0,42	2,6 ±0,45	3,7 ±0,60	3,3 ±0,57
P25	2,3 ±0,55	1,8 ±0,28	1,6 ±0,34	1,5 ±0,34	1,3 ±0,41	2,0 ±0,38
P60	1,8 ±0,41	1,1 ±0,24	1,2 ±0,42	1,2 ±0,33	0,5 ±0,25	0,5 ±0,21

Tabulka 11. Průměrný počet chyb a ± střední chyba v Horizontal ladder rung walking testu (nepravidelný typ) měnící se s věkem zvířat (P21, P25, P60) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

Horizontal ladder - irregular intervals



Obrázek 6. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Horizontal ladder rung walking testu s nepravidelně umístěnými příčkami v P21 (horní 2 grafy) a v P25 (prostřední 2 grafy) a v P60 (dolní 2 grafy). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP u všech 4 grafů. Na ose Y u grafů v levé části obrázku je znázorněna doba, za kterou testovaní potkani přešli nepravidelný horizontální žebřík. Na ose Y v pravé části obrázku je zobrazen počet chyb (N), které při přecházení nepravidelného žebříku testovaní potkani učinili. Černě jsou zaznamenány výsledky prvního sezení, šedě výsledky 2. sezení. x = rozdíl mezi 1. a 2. sezením; o = rozdíl proti sk. C; # = rozdíl sk. HP proti sk. H

6.6 Bar holding test

U skupiny C se doba závěsu na hrazdě prodlužovala s věkem do P25 v obou sezeních. V P25 jsme zpozorovali signifikantní rozdíl při porovnání výdrže na hrazdě v 1. a 2. pokuse, kdy v 2. jsme zaznamenali výrazně kratší průměrný čas testovaných zvířat, než v 1. pokuse (Tabulka 12). V P60 se testovaná zvířata udržela v závěsu nejkratší čas v obou pokusech ze všech testovaných vývojových fází. Hladiny statistické významnosti dosáhl rozdíl mezi 1. a 2. sezením v P60.

U skupiny H jsme zaznamenali průměrnou nejkratší dobu výdrže na hrazdě v P15 při srovnání se skupinou C a HP (Obrázek 7). Tyto rozdíly však nebyly signifikantní pro skupinu C a zároveň dosáhly signifikantního rozdílu u skupiny HP.

Signifikantní rozdíly skupiny H byly patrné i v P18 ve druhém sezení při srovnání s oběma skupinami (C a HP). V tomto věku u skupiny H bylo 2. sezení významně kratší v porovnání s 1. sezením. V P21 nebyly již zaznamenány signifikantní odchylky od obou skupin (C a HP) v obou sezeních. V P25 jsme zaregistrovali u skupiny H dokonce významně delší průměrné časy závěsu na hrazdě ve 2. sezení a zároveň v P60 v obou sezeních při srovnání se skupinou C.

U skupiny HP byly zaznamenány nejdelší průměrné časy ve všech testovaných vývojových fázích v obou sezeních. Statisticky významné rozdíly jsme zaznamenali v P15 v 1. sezení a v P18 ve 2. sezení při srovnání se skupinou H a také v P25 v 2. pokuse při srovnání se skupinou C. Signifikantně delší průměrné časy jsme zaznamenali ještě v P60 při srovnání se skupinou C v obou sezeních.

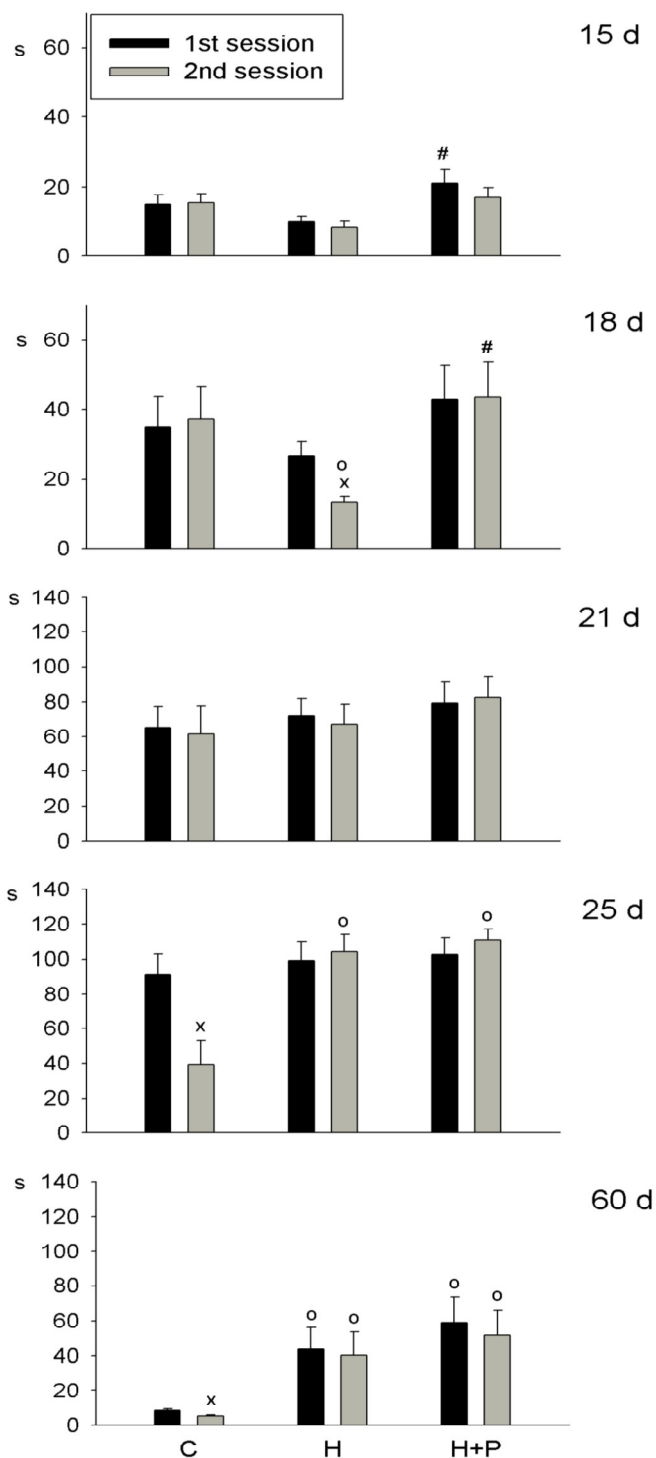
6.6.1 Subjektivní hodnocení kvality pohybu

Všechna zvířata od P15 do P25 ze všech 3 skupin přitáhla dolní končetiny k hrazdě. V P60 5 potkanů (50 %) ze skupiny C, 6 potkanů (46 %) ze skupiny H a 1 potkan (9 %) ze skupiny HP nepřitáhli ZKK. Soudíme, že důvodem poklesu počtu přitažených končetin k hrazdě u testovaných zvířat je vyšší hmotnost a menší strach z pádu. Všechna zvířata ze skupiny C (100 %) a 5 potkanů (38 %) ze skupiny H a 1 potkan (9 %) ze skupiny HP v P60 vykazovala sníženou motivaci udržet se na hrazdě. Tato tendence se u skupiny C objevila už v P25 při testování zvířat ve 2. sezení. Myslíme si, že menší počet potkanů se sníženou motivací u skupiny H a HP je dáno větším strachem testovaných zvířat z pádu. Dále se domníváme, že signifikantně delší výdrž v závěsu potkanů ze skupiny H a HP je nejen z důvodů lepší motivace, ale i důsledkem nižší hmotnosti zvířat z těchto skupin.

Věk (dny) /čas (s)	C1	C2	H1	H2	HP1	HP2
P15	15,0 ±2,80	15,4 ±2,64	9,8 ±1,44	8,3 ±1,60	21,1 ±4,00	17,0 ±2,71
P18	35,0 ±8,58	37,2 ±9,36	26,7 ±4,08	13,2 ±1,53	42,7 ±9,94	43,4 ±10,23
P21	65,2 ±12,27	61,6 ±16,23	71,8 ±10,05	67,2 ±11,40	79,3 ±12,12	82,5 ±11,70
P25	91,2 ±11,88	39,4 ±13,81	99,2 ±11,07	104,2 ±9,84	102,5 ±9,76	111,0 ±6,23
P60	8,3 ±1,13	5,1 ±0,69	43,8 ±12,48	40,2 ±13,53	58,9 ±14,86	51,7 ±14,15

Tabulka 12. Průměrný čas a ± střední chyba (s) v Bar holding testu měnící se s věkem zvířat (P15 - P60) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení

Bar holding



Obrázek 7. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Bar holding testu v P15 (1. graf od shora), v P18 (2. graf od shora), v P21 (3. graf od shora), v P25 (4. graf od shora) a v P60 (poslední graf od shora). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP u všech 5 grafů. Na ose Y u grafů je znázorněn čas (s), po který se testovaní potkani udrželi na hrazdě. Černě jsou zaznamenány výsledky prvního sezení, šedě výsledky 2. sezení. x = rozdíl mezi 1. a 2. sezením; o = rozdíl proti slup. C; # = rozdíl sk. HP proti sk. H

6.7 Rotarod test

V Rotarod testu jsme použili 4 různé rychlosti otáček.

6.7.1 Neonatální období od P15 do P21

V tomto období jsme použili 2 rychlosti: 5 rpm a 15 rpm.

6.7.1.1 Rychlost otáček - 5 rpm

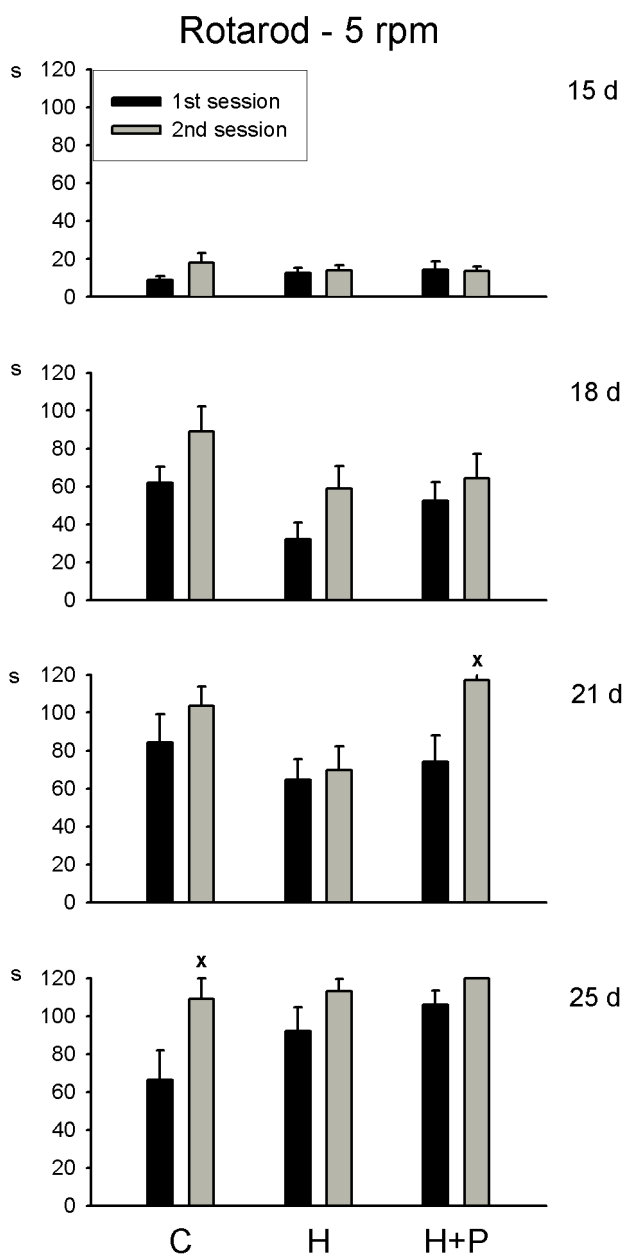
U skupiny C se doba výdrže na válci v 1. pokusech prodlužovala s přibývajícím věkem do P21. Doba výdrže ve 2. pokusu se nepatrně zvyšovala od P18 s přibývajícím věkem (Obrázek 8). V P25 se zkrátila průměrná doba zaznamenaná v 1. pokuse od hodnot naměřených v P21. V P25 jsme zaznamenali signifikantně vyšší průměrné časy ve 2. sezení oproti 1. sezení.

U skupiny H se čas setrvání na válci rovnoměrně prodlužoval s nabývajícím věkem až do P25 v obou pokusech (Tabulka 13). Podobně jako u skupiny C byly časy ve 2. sezení delší, než v prvním sezení ve všech fázích vývoje (bez statistické významnosti). V P18 a v P21 byla průměrná doba setrvání na válci kratší v obou pokusech než u skupiny C, avšak bez dosažení hladiny statistické významnosti. V P25 se však průměrný čas prodloužil v 1. sezení oproti skupině C (bez zaznamenání signifikantních rozdílů).

U skupiny HP se také prodlužovala výdrž na otáčejícím se válci v průběhu vývoje. Od P18 do P25 byla průměrná doba v udržení se na Rotarod delší než u skupiny H (bez statistické významnosti), přesto nedosahovala výsledků skupiny C v prvním sezení od P18 do P21 (bez statistické významnosti). V P21 byla zaznamenána signifikantně delší doba setrvání na válci ve 2. sezení proti 1. sezení. V P25 se testování potkání ze skupiny HP udrželi na válci ze všech skupin nejdéle v obou pokusech (bez signifikantních rozdílů).

Věk (dny) / čas (s)	C1	C2	H1	H2	HP1	HP2
5 rpm v P15	9,0 ±1,97	17,9 ±5,07	12,7 ±2,74	14,0 ±2,82	18,5 ±4,37	13,5 ±2,33
5 rpm v P18	61,8 ±8,49	89,0 ±13,36	32,0 ±8,76	58,8 ±11,72	52,5 ±9,82	64,3 ±12,95
5 rpm v P21	84,4 ±14,91	103,7 ±10,10	64,5 ±10,89	69,7 ±12,64	74,2 ±13,68	90,1 ±13,01
5 rpm v P25	66,4 ±15,55	109,2 ±10,80	92,3 ±12,29	113,2 ±6,52	106,0 ±7,47	120,0 ±0,00
10 rpm v P60	60,0 ±0,00	60,0 ±0,00	60,0 ±0,00	60,0 ±0,00	48,8 ±4,01	55,3 ±3,03
15 rpm v P21	96,3 ±12,20	90,5 ±14,42	85,1 ±11,18	71,7 ±12,02	87,2 ±12,17	63,3 ±12,30
15 rpm v P25	103,0 ±11,47	103,4 ±11,10	93,1 ±10,84	101,2 ±10,34	97,7 ±12,16	111,0 ±9,00
15 rpm v P60	60,0 ±0,00	56,5 ±3,50	60,0 ±0,00	60,0 ±0,00	55,8 ±3,01	59,5 ±0,55
20 rpm v P60	49,1 ±4,25	49,7 ±4,95	60,0 ±0,00	60,0 ±0,00	58,7 ±1,33	60,0 ±0,00

Tabulka 13. Průměrný čas a ± střední chyba (s) v Rotarod testu měnící se s věkem zvířat (P15 - P60) a s danou rychlostí (5 rpm, 10 rpm, 15 rpm, 20 rpm) u skupiny C, H a HP. Číslicemi za písmeny C, H, HP je udáno pořadí sezení.



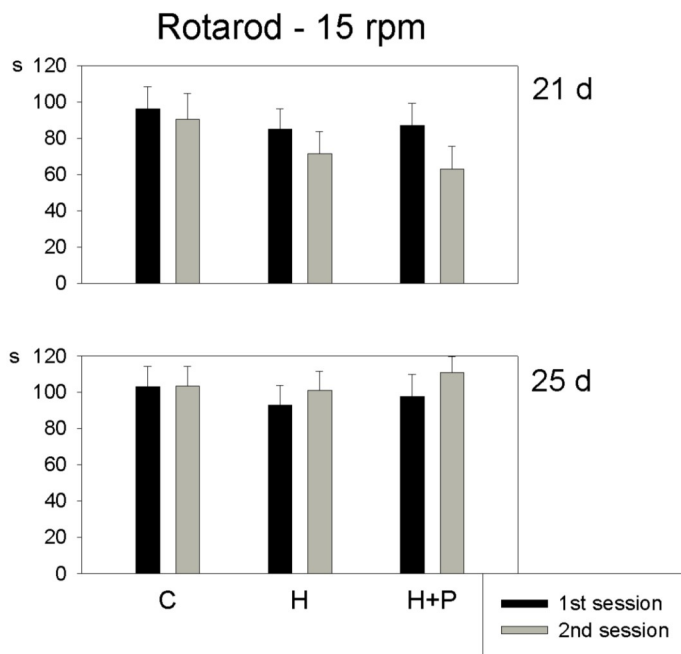
Obrázek 8. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Rotarod testu při rychlosti 5 rpm v P15 (1. graf od shora), v P18 (2. graf od shora), v P21 (3. graf od shora), v P25 (4. graf od shora). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP. Osa Y označuje čas, po který se testování potkani udrželi na otáčejícím se válci. Černě jsou zaznamenány výsledky prvního sezení, šedě výsledky 2. sezení. x = rozdíl mezi 1. a 2. sezením; o = rozdíl proti sk. C; # = rozdíl sk. HP proti sk. H

Rychlost otáček: 15 rpm

U skupiny C se časové hodnoty významně nezměnily v P21 a P25 v obou měřeních (Obrázek 9).

Přestože byly u skupiny H zaznamenány průměrné časy o něco nižší v P21 i v P25 v obou pokusech při srovnání se skupinou C, nebyly nalezeny signifikantní rozdíly.

U skupiny HP byly zaznamenány také nižší časy v 1. pokuse v P21 i v P25 při srovnání se skupinou C, avšak i zde bez signifikantních rozdílů. Výraznější rozdíl (bez dosažení hladiny statistické významnosti) byl zaznamenán mezi skupinou C a HP ve 2. sezení v P21.



Obrázek 9. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Rotarod testu při rychlosti 15 rpm v P21 (horní graf), v P25 (dolní graf). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP. Osa Y označuje čas (s), po který se testovaní potkani udrželi na otáčejícím se válci. Černě jsou zaznamenány výsledky prvního sezení, šedě výsledky 2. sezení.

6.7.2 Raná dospělost (P60)

V tomto období jsme zvolili 3 rychlosti: 10 rpm, 15 rpm a 20 rpm.

6.7.2.1 Rychlost otáček: 10 rpm

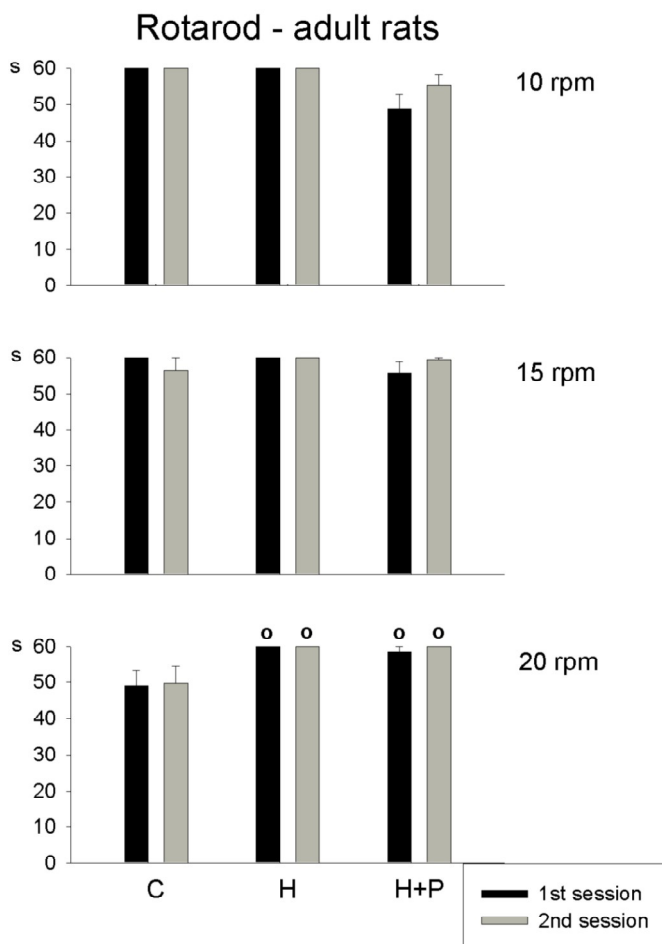
Mezi skupinami C a H nebyly nalezeny rozdíly ani v jednom z pokusů. Výrazně kratší doba v 1. pokusu byla zaznamenána u skupiny HP v porovnání se skupinami C i H, avšak bez dosažení statistické hladiny významnosti.

6.7.2.2 Rychlost: 15 rpm

Nebyly nalezeny žádné významnější rozdíly při srovnání jednotlivých skupin v obou pokusech.

6.7.2.3 Rychlost: 20 rpm

Signifikantní rozdíly byly zjištěny u skupiny C v porovnání se skupinami H a HP (Obrázek 10). Průměrná doba testovaných zvířat ze skupiny C nedosahovala maximálního časového limitu, jako u většiny testovaných zvířat ze skupiny H i HP.



Obrázek 10. Sloupcový diagram ukazuje výsledky Rotarod testu v rané dospělosti (P60) s rychlostí 10 rpm (horní graf), s rychlostí 15 rpm (prostřední graf) a s rychlostí 20 rpm (dolní graf). Na ose X jsou v řadě zleva znázorněny: skupina C, skupina H a skupina HP. Osa Y označuje čas (s), po který se testovaný potkan udrželi na otáčejícím se válci. Černě jsou zaznamenány výsledky prvního sezení, šedě výsledky 2. sezení. x = rozdíl mezi 1. a 2. sezením; o = rozdíl proti sk. C; # = rozdíl sk. HP proti sk. H

6.7.3 Subjektivní hodnocení kvality pohybu

Domníváme se, že zaznamenané pády v Rotarod testu v P21 a v P25 u všech 3 skupin byly dány ztrátou motivace setrvat na otáčejícím se válci. Obdobné závěry jsme udělali i v případě skupiny C v P60. Zvířata se také pravděpodobně naučila, že pád z válce není bolestivý.

6.8 Testování hypotéz

Hypotéza 1

H_0 byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám u všech 3 skupin v motorickém chování během vývojových stupňů ve všech motorických testech.

H_A se potvrdila.

Hypotéza 2

H_0 byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám motoriky u potkanů po perinatální hypoxii v porovnání s kontrolní skupinou.

H_A se potvrdila.

Hypotéza 3

H_0 byla zamítnuta vzhledem k signifikantním změnám motoriky u potkanů po perinatální hypoxii s aplikací CCPA v porovnání s kontrolní skupinou.

H_A se potvrdila.

Hypotéza 4

H_0 byla zamítnuta vzhledem k signifikantním změnám motoriky u potkanů po perinatální hypoxii s aplikací CCPA v porovnání s hypoxickou skupinou

H_A se potvrdila.

Hypotéza 5

H_0 byla zamítnuta vzhledem k signifikantně lepším motorickým projevům laboratorních potkanů ovlivněných perinatální hypoxií, jimž byla postnatálně aplikována látka CCPA, v porovnání s potkany ovlivněných pouze perinatální hypoxií.

H_A se potvrdila.

Hypotéza 6

H_0 se potvrdila

H_A byla zamítnuta vzhledem k statisticky nevýznamným rozdílům mezi potkany ovlivněných perinatální hypoxií a kontrolními potkany v rané dospělosti.

7 Diskuse

Studie modelů perinatální hypoxie poskytují důležité poznatky o mechanismu vzniku cerebrálního poškození, který bývá příčinou vzniku neurologických deficitů. V rámci konkrétního postižení mozku pojednávají o možném funkčním či histopatologickém dopadu a o další progresi tohoto postižení. Umožňují tak získat podklad pro zvolení terapeutických terčů, jejichž cílem je zmírnění neurologického defektu a dosažení co nejlepšího dalšího vývoje postižených jedinců.

Každý model perinatální hypoxie je charakterizován způsobem provedení hypoxie. Konkrétní model je podmíněn typem hypoxického inzultu, dobou po kterou inzult působí, vývojovým obdobím, ve kterém je jedinec hypoxii vystaven. Morfologie poškozených struktur mozku, motorický projev a behaviorální výstup se dále odvíjejí od zvoleného typu modelu.

Námi zvolený model perinatální hypoxie obnáší mírný typ hypoxie dlouhodobě působící. Celková hypoxie byla provedena v prenatalní (intrauterinní) i v postnatální fázi vývoje laboratorního potkana. Do jisté míry odpovídá perinatální fázi člověka, která je datována obdobím od 26. týdne po oplození vajíčka až do 4. týdne po narození jedince (Moore et Persaud, 2002, s. 120). Systémovou hypoxii, která se nejvíce blíží reálné intrauterinní hypoxii u lidských jedinců a která zasahuje celý organismus, ve svých pracích popisují Van de Berg et al. (2003), Robinson et al. (2005) a Delcour et al. (2012), kteří přivodili hypoxii intrauterinně. Celkově působící hypoxii nikoliv však intrauterinní popisují autoři Marcuzzo et al. (2010) a Strata et al. (2004), kteří vystavili své potkany 2 epizodám 12- minutového hypoxického působení s nedostatkem O₂.

V jiných pracích se můžeme setkat s hypoxicko-ischemickým působením ovlivňujícím spíše jen část mozku. V těchto pracích se neonatálním potkanům provede podvázání jedné arteria carotis communis a následně je omezen přísun O₂ (Balduini et al., 2000; Bona et al., 1997a, Jansen et Low, 1996; Lubics et al., 2005; Tai et al., 2009; Vannucci et Vannucci, 2005; Williams et al., 2004; Woodworth et al., 2011; Young et al., 1986). Tento typ takto poškozeného mozku vykazuje převážně jednostrannou symptomatiku na kontralaterální straně těla od strany léze (Lubics et al., 2005). Fan et al. (2005) provedli bilaterální podvázání arteria carotis communis. V tomto případě je zasažen celý mozek hypoxicko-ischemickou noxou.

Navzdory stejným testovacím okolnostem v rámci jedné studie se morfologické poškození mozku liší u jednotlivých zvířat (Balduini et al., 2000; Jansen et Low, 1996,

Young et al., 1986). V tomto případě je to projev individuálního fenotypu každého zvířete (Wagner et al., 2002). Bona et al. (1997) oznamují, že velikost léze nemusí bezpodmínečně korelovat s funkčním deficitem. Woodworth et al. (2011) naopak prezentují, že jejich výsledky v senzomotorických testech monitorující dlouhodobější motorické odchylky korelují s velikostí histologického nálezu.

Nejvíce populárním a tedy i nejvíce užívaným modelem perinatální hypoxie je 7-denní model laboratorního potkana. Tento model je využíván, jak autoři (Vannucci et al., 2005) zmiňují, i na další vývojová stádia mláďete potkana. Z důvodu rozdílného neurologického defektu vznikajícího v různém věku potkana se však stále provádějí další výzkumy, jež poskytují neurobehaviorální poznatky o jiném typu mozkového postižení. Autoři Delcour et al. (2012) a Robinson et al. (2005) popisují model perinatální hypoxie, který vzniká na základě již prenatálního působení hypoxie v 17. a 18. dni fetálního vývoje. Autoři se domnívají, že tento model je ideální pro poskytnutí obrazu axonální degenerace a hypomyelinizace, kterou lze často sledovat na základě perinatálních komplikací u výrazně předčasně narozených dětí. Marcuzzo et al., (2010), Strata et al., (2004) a Van de Berg et al. (2003) provedli hypoxii v P0. Tento model perinatální asfyxie odráží poškození CNS, které odpovídá 18-20. týdnu gestace člověka. 3denní model popisují Tai et al. (2009), který odpovídá 24–28 týdnům gestace u lidského fětu. Fan et al. (2005) popisují 4denní model, u něž hypoxický inzult představuje největší hrozbu pro prekurzorové buňky oligodendroglíí.

V našem experimentu jsme zaznamenali výrazně nižší hmotnost hypoxické skupiny v porovnání s kontrolními zvířaty. Sníženou hmotnost u hypoxií postižených zvířat popisují i další studie (Bona et al., 1997a; Fan et al., 2004; Lubics et al., 2005; Tai et al., 2009). Naopak Van de Berg et al. (2003), Strata et al. (2004) a Marcuzzo et al. (2011) u své hypoxické skupiny nezaznamenali váhové rozdíly při srovnání s kontrolami. Strata et al. (2004) se domnívají, že váhový úbytek u hypoxií postižených zvířat souvisí s rozsahem mozkové léze i s okolními podmínkami (imobilizace). K nižší váze může přispívat snížená kostní denzita, atrofie svalů i nižší příjem potravy. Podvýživa může tak být další příčinou zpožděného lokomočního vývoje postižených zvířat. Je však nutné myslet i na to, že nižší hmotnost může přispívat k lepším výsledkům v testech zaměřených na svalovou sílu, jako je např. Bar holding test.

Pro testování a hodnocení motorických dovedností hypoxií postižených zvířat existují specifické motorické testy. Tyto testy nám umožňují kvantifikovat rozdíly v motorickém projevu u testovaných zvířat. Pomocí těchto testů lze sledovat nejen

motorické deficity, ale i obraz pozitivní neuroplasticity, kterou lze sledovat ve zlepšení funkčního provedení daného úkolu (Brooks et Dunnet, 2009). Motorické testy můžeme rozdělit na testy hodnotící motorický výstup v raném období vývoje a na testy specifické pro dlouhodobější hodnocení pohybového vývoje, které jsou zaměřené na komplexnější koordinovanou lokomoci. Hodnocení dlouhodobějšího motorického vývoje je daleko náročnější, neboť schopnost neuroplasticity potkana je mnohem zřetelnější, než lze sledovat u člověka (Lubics et al., 2005). A přestože je dle histologického rozboru mozek u potkanů po perinatální hypoxii výrazně poškozen, funkční deficity těchto zvířat mohou být velmi mírné. Fan et al., (2005), Jansen et Low, (1996v), Lubics et al. (2005) a Van de Berg et al. (2003) ve svých pracích popisují nevýznamné posturální a lokomoční nedostatky při srovnání s kontrolními skupinami. Lubics et al (2005) zmiňují, že některé motorické odchylky v průběhu času mohou opravdu zcela zmizet, jiné však mohou přetrvávat do dospělého věku. V rámci našeho experimentu jsme se však neshledali s žádnými motorickými deficity, které by byly ještě patrné u postižených zvířat v porovnání s kontrolní skupinou na pomezí rané dospělosti.

V našem měření jsme se tedy věnovali právě koordinačně náročnějším testům pro zhodnocení důsledků perinatální hypoxie na pohybový projev v pozdější fázi motorického vývoje. První test, který jsme využili pro náš experiment, je Balance beam test. Tento test zachycuje mírné motorické deficity, které se nejčastěji projeví v nepřesném umístění chodidla na úzkou plošinu, test je zaměřen na celkovou balanční dovednost. V našem testování jsme kromě počtu chyb zohledňovali i dobu, po kterou testování potkani plnili úkol. V našich výsledcích hypoxická skupina potřebovala více času na přejítí balanční plošiny proti kontrolní skupině v P15, v P18 a v P25 se signifikantními rozdíly minimálně v jednom sezení v P18 a v P25. Výrazně větší počet chyb u hypoxické skupiny jsme nezaregistrovali v žádném vývojovém stupni. Je však nutné zmínit, že tento počet zcela nekoreluje s motorickým projevem postižených zvířat. Tato zvířata se pohybovala vpřed pomocí pouze PKK a dělala tak daleko méně chyb ZKK. Woodworth et al. (2011) prezentují vyšší počet chyb na jeden krok u testovaných zvířat (7-denní model) při využití modifikovaného Balance beam testu v P28, P42, P49, a v P56. Výraznější asymetrii mezi ispilaterální a kontralaterální stranou testovaných samečků v porovnání s kontrolní skupinou uvádějí v P28, a v P49, tato asymetrie se u testovaných samiček vyskytuje ve všech měřených vývojových fázích (P28, P35, P42, P49, P56). Rozdíly mezi pohlavími byly zaznamenány pouze

v P56, kdy hypoxičtí samečci měli více chyb i výraznější asymetrii v motorickém projevu, než hypoxií ovlivněné samičky. Také počet chyb u testovaných samečků vzrůstal s věkem, nikoliv však u samiček. Autoři však v práci nezohledňují čas, za který testovaná zvířata splnila úkol. Je pravděpodobné, že hypoxičtí samečci se během několika měření naučili, že při pádu jim nehrozí výrazné nebezpečí a mohli úkol splnit o to rychleji na úkor většího počtu chyb. Také se domníváme, že vzrůst počtu chyb v průběhu věku měřených samečků může být podmíněn hyperaktivním chováním. V další studii (Marcuzzo et al. 2010) je velmi zajímavé, že tito autoři nepopisují žádné motorické deficity hypoxických zvířat v P31, P38, P45 a v P52 při srovnání s kontrolami. Tato práce však nebrala v úvahu počet chyb ani dobu pro splnění úkolu, ale pouze hodnotili, zda testovaná zvířata úkol splní a zdali při jeho plnění využívají koordinovaný pohyb všech 4 končetin. Je také pravděpodobné, že nenalezení rozdílů je zapříčiněno i pozdní dobou měření (v P31) a pouze mírnou neurologickou dysfunkcí po perinatální hypoxické noxe (2 x 12 min působení hypoxie), která vlivem neuroplastického děje dosáhla funkčního výsledku kontrolní skupiny již v prvním měření v P31. Práce Lubicse et al. (2005) zaregistrovala odchylky hypoxických zvířat a kontrol pouze v P14. Zde však soudíme, že způsob měření v tomto testu nebyl optimální pro měření dlouhodobějších motorických deficitů. V tomto testu autoři zohlednili pouze dobu, po kterou se měření potkani udrželi na 40cm mostku širokém 1cm, a pokud se zvířata dostala k jednomu konci mostku, bylo jim připsáno dosažení maximálního časového ohodnocení. Podle autorů Altmana a Sudarshana (1975) jsou zdravá zvířata ve věku P18 schopná se po takovémto mostku pohybovat bez výrazných obtíží a je více než pravděpodobné (usuzujeme z našeho měření), že i většina hypoxických zvířat bude v P21 schopná se dopravit k jednomu z konců mostku, dosáhnout tak maximálního časového ohodnocení a získat stejné ohodnocení jako zdravá zvířata z kontrolní skupiny. A proto navrhuje, že je nutné v testování hypoxických zvířat pomocí Balance beam testů zohlednit jak čas, tak především provedení pohybu. Hodnotit tedy přinejmenším průměrný počet chyb, lépe však kvalitativně posoudit lokomoční vzor testovaných potkanů.

Mezi další testy, které jsme využili pro hodnocení motorické koordinace, se řadí Ascending ladder test a Horizontal ladder rung walking test (pravidelný a nepravidelný typ). Tyto testy jsme zvolili pro jejich vysokou citlivost v kvantitativním hodnocení motorické funkce a pro detekci motorických změn během vývoje zvířat ovlivněných perinatální hypoxií. Tyto testy vyžadují dobrou senzomotorickou kontrolu s přesným

umístěním končetin i na nepravidelný povrch. Ascendentní žebřík je modifikací horizontálního typu žebříku a využívá se u nižšího stupně vývoje (do P21) pro podmínění motorické aktivity měřených potkanů. Práce Lubicse et al. (2005) a Bony et al. (1997a) využívá grid walking test, jež je alternativou námi zvoleného horizontálního žebříku.

V rámci našeho měření hypoxičtí potkani v Ascending ladder testu potřebovali výrazně více času ke splnění úkolu v obou sezeních v P15 při srovnání s kontrolní skupinou a v P18 ve 2. sezení. V počtu chyb se však odchylky od kontrolní skupiny v tomto věku neobjevily. V pravidelném typu Horizontal ladder rung walking testu se objevily signifikantní rozdíly v delším časovém provedení i v počtu chyb při plnění úkolu u hypoxické skupiny v P21 a v P25. Podobné výsledky jsme zaznamenali i u nepravidelného typu Horizontal ladder rung walking testu s výjimkou vývojového stupně P25, kdy nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v počtu chyb. V P60 nebyly zaznamenány žádné odchylky v čase ani v počtu chyb u hypoxických zvířat při srovnání s kontrolami při přechodu pravidelného i nepravidelného typu horizontálního žebříku v jednom sezení. Lubics et al. (2005) popisují signifikantně větší počet chyb u testovaných hypoxických zvířat oproti kontrolním během celého sledovaného období (v P14, P21, P28, P35). S větším počtem chyb na kontralaterální straně od postižené hemisféry testovaných potkanů se v porovnání s ipsilaterální stranou setkáváme ve studii Bony et al. (1997a), kteří své měření provedli ve věku P42. Výrazné rozdíly hypoxických a kontrolních zvířat testovaných u nepravidelného typu horizontálního žebříku nezaznamenali od P31 do P52 Marcuzzo et al. (2010). Domníváme se, že v této studii hypoxický inzult (2 x 12 min působení 100% N₂) nebyl dostačující pro způsobení dlouhodobého motorického deficitu.

Dále jsme motorickou koordinaci trupu, PKK a ZKK a zároveň svalovou sílu testovali pomocí Bar holding testu. V P18 jsme u hypoxických zvířat zaznamenali kratší průměrné časy oproti kontrolám, zato v P25 i v P60 byly časy signifikantně delší v porovnání s kontrolami. Předpokládáme, že delší časy jsou podmíněné větším strachem z pádu a také nižší váhou u hypoxií ovlivněných zvířat. Fan et al. (2005) ve své práci s využitím 4-denního modelu popisují výrazné rozdíly mezi kontrolními a hypoxickými potkany do P16. Další rozdíly nejsou v této práci od P16 do P21 signifikantní. Lubics et al. (2005) u svého 7denního modelu nezaregistrovali významné změny v P14 a v P21, ale až v P28, kdy u hypoxických zvířat zaznamenali signifikantně nižší průměrné časy v udržení se v závěsu pomocí obou PKK oproti kontrolní skupině.

A při testování výdrže v závěsu pomocí pouze jedné končetiny (kontralaterálně od strany léze), byly naměřené nižší časy i v P21, nikoli však v P14 a v P35. Zajímavé výsledky však u svého 7-denního modelu uvádí Bona et al. (1997a), kteří naopak podle výsledků získaných až v P42 uvádějí významné rozdíly mezi kontrolami a hypoxickými zvířaty. Tito autoři prezentují méně než poloviční průměrnou dobu, po kterou jsou hypoxická zvířata schopná se udržet v závěsu v porovnání s kontrolní skupinou. Odlišné výsledky prezentují v P42 Van de Berg et al. (2003), kteří uvádějí nulové změny mezi kontrolní a hypoxickou skupinou (20-minutová intrauterinní hypoxie v P0). V této práci autoři zohlednili i koordinačně náročnější prvky v testu jako je: udržení se na hrazdě pomocí ZKK, vylezení zvířete na hrazdu pomocí ZKK, anebo zapojení ocasu pro vylezení na hrazdu. Také Balduini et al. (2000) se u 7denního modelu zaměřili na zapojení ZKK při závěsu potkanů za PKK v P18 a nezaznamenali významné rozdíly mezi kontrolní a hypoxickou skupinou v tomto věku. Ani v našem kvalitativním sledování hypoxických potkanů jsme v tomto věku nezaznamenali odchylky od kontrolní skupiny. Kontroverzní výsledky Lubicse et al. (2005) a Bony et al. (1997a) lze těžko objasnit pomocí rozdílného způsobu hypoxického ovlivnění, neboť obě studie využily velmi podobný model perinatální hypoxie, ve kterém dokonce Lubics et al. (2005) nechali hypoxický inzult působit o 20 minut déle, než uvádí Bona et al. (1997a). Vysvětlením může být velká interindividuální odlišnost mezi jedinci v obou pracích.

Posledním testem, který jsme využili pro náš experiment je Rotarod test. Ve výsledcích našeho měření v Rotarod testu s rychlostí 5 rpm a 15 rpm u skupiny ovlivněné hypoxií jsme nenašli statisticky významné rozdíly při srovnání s kontrolní skupinou v žádné fázi vývoje. Nepatrně nižší průměrné časy jsme však zaznamenali u hypoxické skupiny v P18 a v P21 při srovnání s kontrolní skupinou v obou sezeních. Rozdíly neuvádějí ve své práci Balduini et al. (2000), kteří svá zvířata měřili jednorázově v P35 při rychlosti 8 rpm a Lubics et al. (2005), kteří testovali zvířata ve věku P21, P28, P35 při rychlosti 13 rpm. Strata et al. (2004) u své skupiny hypoxických zvířat zaznamenali dokonce výrazné zlepšení u hypoxických zvířat v P24 a v P31 v porovnání s kontrolami. I v našem experimentu jsme zaznamenali signifikantně delší průměrný čas hypoxických potkanů v P60 při rychlosti 20 rpm, než bylo naměřeno u kontrolní skupiny. Naopak zhoršený motorický výstup v Rotarod testu u hypoxických zvířat v porovnání s kontrolami zaznamenali v P35 Wagner et al. (2002) při rychlosti otáčení 18 rpm. Také horší výsledky u hypoxií ovlivněných zvířat uvádějí Jansen a Low (1996). Tito autoři zaznamenali kratší průměrné časy u zvířat měřených jednou týdně ve

věku od P15 do P49. U těchto hypoxií ovlivněných zvířat nebyla zaregistrovaná kontralaterální hypertrofie kůry, která je asociovaná s funkční plasticitou a lepší senzomotorickou integrací coby důsledek druhostranné mozkové destrukce. Domníváme se, že rozdílné výsledky studií v Rotarod testu nejsou podmíněné pouze interindividuální rozdílností mozkové léze či uplatnění neuroplasticity, ale také na základě lišících se parametrů v různých měřeních. Myslíme si, že rychlost 8 rpm ani 13 rpm pro testování 35-denních zvířat nemusí být dostatečná pro zachycení signifikantních rozdílů testovaných zvířat. Dále možným vysvětlením pro delší časové hodnoty, které jsme zaznamenali v P60, a které uvádí Strata et al (2004) v P24 a v P31, by mohly být důsledkem vyššího strachu hypoxických zvířat z pádu.

Existují důkazy, že endogenní adenosin funguje jako neuroprotektivní prostředek u dospělého mozku, ale méně je známo o účincích adenosinu u nezralého mozku (Aden et al. 2001).

Hunter et al. (2003) uvádějí, že endogenní aktivace A_1 receptoru u fetálního mozku ovcí postižených těžkou asfyxií snížila neurální aktivitu, čímž ochránila fetální mozek. Přesto se nezdá, že by agonisté A_1 receptoru byli významně efektivní v protekci nezralého mozku proti poškození při ischemickém infarktu u potkanů (Aden et al., 2001). Podle studie Turnera et al. (2002) může být aktivace A_1 receptorů dokonce škodlivá pro nezralý mozek, a to od chvíle, kdy při aktivaci A_1 receptoru nastává inhibice růstu neuritů. Na základě tohoto mechanismu může kofein a jiní antagonisté A_1 receptoru předcházet podmínkám působící na vznik periventrikulární malárie u novorozenců (Turner et al., 2002). Také u 7denního modelu perinatální hypoxie u Bona et al (1997b) se neuroprotektivní účinky vyskytují při aplikaci teofylinu, neselektivního antagonisty endogenního adenosinu.

Zajímavé však je, že akutní navýšení extracelulárního adenosinu poskytuje neuroprotekcii proti ischemickému infarktu u stejného modelu v práci Gidday et al. (1995). Jistým vysvětlením by mohlo být i to, že se uplatňuje opačná role A_{2A} receptoru v kontrole nervového poškození u nevyzrálého mozku oproti dospělým zvířatům. Blokáda A_{2A} receptorů odpovídá neuroprotektivní strategii proti mozkovému poškození u dospělých zvířat, zatímco u nevyvinutého mozku dochází ke zhoršení mozkového poškození (Cunha, 2005), pak by však byl méně pochopitelný léčebný účinek výše zmíněného kofeinu a teofylinu.

V rozporu výsledků od Hunter et al. (2003) a výsledků od Bona et al., (1997b) kde obě studie využívají selektivního antagonisty A_1 receptoru (DPCPX), jenž

u prvního způsobil změny a u druhého nezpůsobil výrazné změny v morfologii mozkového poškození, by se dalo vycházet z druhové rozdílnosti testovaných zvířat využitých v obou zmíněných studiích. Neurovývojová zralost fetálního mozku ovcí se liší od zralosti mozku neonatálních potkanů.

Z výše zmíněných poznatků lze těžko určit, zda A_1 receptory hrají zásadní roli v neuroprotektivní léčbě neonatálních zvířat. Je více než pravděpodobné, že neuroprotektivní účinky zvýšených hladin endogenního adenosinu či neselektivních antagonistů adenosinu působí na více adenosinových receptorů současně, anebo jejich působení může být zcela receptorově nezávislé. Otázkou stále zůstávají rozcházející se výsledky od Bona et al. (1997b) a Gidday et al. (1995). Odpovědi lze tak stále hledat v rozdílné aktivitě a expresi receptorů v nevyzrálém mozku, v rozdílné afinitě některých chemických látek k adenosinovým receptorům, a také v možném působení těchto látek na zcela jiné úrovni v mozkové tkáni, než se domníváme.

Také žádná ze studií nepopisuje behaviorální změny testovaných zvířat. V rámci rešeršního zpracování dat jsme našli práce zabývající se pouze morfologickými účinky po aplikaci adenosinového agonisty. Zdá se, že by bylo vhodné zaměřit více pozornosti i do oblasti výzkumu funkčního výstupu testovaných zvířat, neboť ne vždy musí velikost léze korelovat s behaviorálním výstupem testovaných zvířat (Bona et al., 1997a) a i výrazné mozkové poškození může mít jen mírný funkční dopad v motorickém projevu testovaných potkanů (Lubics et al., 2005). I z tohoto důvodu jsme se v našem experimentu zabývali působením agonisty adenosinového A_1 receptoru CCPA na motorický projev u hypoxických potkanů.

V Ascending ladder testu při srovnání skupiny H a skupiny HP jsme nenašli signifikantní rozdíly v P15, signifikantně kratší čas i nižší počet chyb se u skupiny HP objevil až v P18. V P21 jsme v rámci pravidelného typu horizontálního žebříku nezaznamenali výrazný rozdíl mezi těmito skupinami. V P25 se však časový záznam skupiny HP zkrátil natolik, že téměř dosahoval průměrného času kontrolní skupiny a byl signifikantně nižší v obou sezeních oproti skupině H. V P60 se nevyskytly rozdíly mezi skupinou H a HP. V testování skupiny HP pomocí nepravidelného typu horizontálního žebříku se ukázalo, že skupina HP má signifikantně kratší časy v porovnání se skupinou H už v P21, dále v P25 a to v obou sezeních. Signifikantně nižší počet chyb jsme zaregistrovali u nepravidelného typu horizontálního žebříku v P60 v jednom sezení.

V Bar holding testu jsme zaregistrovali signifikantně delší průměrné časy v udržení se v závěsu na hrazdě u skupiny HP v porovnání se skupinou H v P15 a v P18.

Dále již nebyly signifikantní rozdíly mezi těmito skupinami zaznamenány. U tohoto se testu se domníváme, že zvířata ze skupiny HP byla zvýhodněna svou ještě nižší hmotností oproti skupině H.

V Rotarod testu nebyly zaregistrovány žádné rozdíly mezi skupinou H a HP při všech rychlostech a ve všech vývojových fázích.

Z výše prezentovaných výsledků naší studie lze pozorovat, že téměř ve všech motorických testech jsme zaznamenali rozdíly mezi hypoxickou skupinou a hypoxickou skupinou s postnatální aplikací CCPA. V rámci signifikantních rozdílů v Balance beam testu, v Ascending ladder testu, v pravidelném i nepravidelném typu Horizontal ladder rung walking testu a v Bar holding testu jsme u hypoxické skupiny s aplikací CCPA zaznamenali lepší motorické dovednosti, než vykazovala hypoxická skupina. Mírně zhoršený kvalitativní pohybový stereotyp hypoxické skupiny s CCPA oproti hypoxické skupině jsme zaznamenali pouze v Balance beam testu. Proto na základě našeho behaviorálního experimentu se přikláníme k tomu, že látka CCPA aplikovaná 14. postnatální den má neuroprotektivní účinky u laboratorního potkana. V dalších studiích je nutno analyzovat vliv časového vztahu podání CCPA ke skončené expozici hypoxii a také účinky opakovaného podání tohoto agonisty.

ZÁVĚRY

Cílem této práce bylo vytvořit studii, která zaznamená funkční odchylky pozdního motorického vývoje laboratorního potkana, jenž bude ovlivněn relativně mírnou perinatální hypoxií, od motorického projevu zdravých potkanů. Dalším záměrem této práce bylo sledovat motorický vývoj laboratorního potkana postiženého perinatální hypoxií, u něž byl postnatálně aplikován agonista A1 adenosinových receptorů CCPA. Touto prací jsme chtěli ozřejmit, zdali má látka CCPA pozitivní účinky na funkční projev testovaných zvířat v průběhu vývoje a zda lze tuto látku využít jako neuroprotektanci pro model perinatální hypoxie.

Pro vyhodnocení motorického vývoje jsme využili 34 zvířat rozdělených do 3 skupin (kontrolní, hypoxická a hypoxická s CCPA), která jsme podrobili motorickému testování na 4 typech koordinačně náročných testů, jež byly adekvátně přizpůsobeny pro jednotlivá vývojová stadia testovaných zvířat. Pomocí těchto testů jsme získali kvantitativní data, která jsme statisticky analyzovali. Dále jsme statistické výsledky doplnili o slovní hodnocení kvality motorického projevu testovaných zvířat.

Signifikantně horší motorický projev hypoxické skupiny oproti kontrolní skupině alespoň v jednom sezení dle kvantitativního zhodnocení jsme zaznamenali v rámci času ve věku P15 a v P18 v Ascending ladder testu, v P18 v Bar holding testu, v P18 a v P25 v Balance beam testu a v P21 a v P25 v Horizontal ladder rung walking testu (v pravidelném i nepravidelném typu). Hodnocení počtu chyb ukázalo zhoršený motorický projev hypoxické skupiny v Horizontal ladder rung walking testu v P21 (pravidelný typ i nepravidelný typ) a v P25 (pravidelný typ), nikoliv však v dalších testech. Dle kvalitativního hodnocení jsme zaznamenali výrazně změněný motorický projev postižených potkanů v P15, v P21 i v P25 v Balance beam testu, jehož náročnost jsme přizpůsobovali vývojovému stadiu testovaných potkanů. V tomto testu se během měření oproti kontrolní skupině objevovaly pády z balanční plošiny (v P15) a výrazná dyskoordinace PKK a ZKK (P15, P21, P25). Většina zvířat se přemisťovala pomocí plazivého pohybu s využitím pouze PKK. Dále zhoršený motorický projev postižení potkani ukázali v Ascending ladder testu v P15 i v P18, ve kterém jsme zaregistrovali homologní lezení s omezeným funkčním využitím ZKK. V P60 jsme nezaznamenali v žádném testu významně zhoršenou motorickou funkci hypoxické skupiny v porovnání s kontrolní skupinou. Dokonce jsme u hypoxické skupiny naměřili lepší motorické projevy než u kontrolní skupiny v Bar holding a Rotarod testu při rychlosti otáčení 20

rpm. Z těchto výsledků usuzujeme, že u laboratorních potkanů vystavených perinatální hypoxií přetrvávají drobné motorické deficity během dospívání, avšak ve věku rané dospělosti již nelze tyto poruchy v motorickém projevu postižených potkanů prokázat. Tyto poznatky prezentují i jiné studie, jež poukazují na evidentní vliv vysoké schopnosti neuroplastického děje u nezralých laboratorních potkanů oproti lidskému jedinci.

U hypoxické skupiny s CCPA jsme v Bar holding testu zaznamenali nejlepší výkony ve všech vývojových fázích proti hypoxické i kontrolní skupině (v P15 a v P18 v jednom sezení se signifikantními rozdíly v porovnání s hypoxickou skupinou). Další signifikantní rozdíly určující lepší motorický projev hypoxické skupiny s CCPA oproti hypoxické skupině minimálně v jednom sezení se ukázaly v rámci času v Balance beam testu v P15 a v P25 (zde těsně pod hladinou statistické významnosti), dále v Ascending ladder testu v P18, dále v Horizontal ladder rung walking testu v P21 (nepravidelný typ) a v P25 (pravidelný i nepravidelný typ). V rámci počtu chyb se vyskytly signifikantní rozdíly mezi těmito skupiny v P18 v Ascending ladder testu a v P60 v nepravidelného typu Horizontal ladder rung testu (zaznamenán menší počet u chyb hypoxické skupiny s CCPA). V Rotarod testu jsme nenalezli signifikantní rozdíly mezi hypoxickou skupinou s CCPA a hypoxickou skupinou. V kvalitativním hodnocení jsme u hypoxické skupiny s protekcí zaznamenali stejný pohybový stereotyp v Balance beam testu a v Ascending ladder testu jako u hypoxické skupiny, malé rozdíly se vyskytovaly v počtu potkanů, u kterých byl tento pohybový projev spatřen. V Balance beam testu se patologický motorický vzor vyskytl o něco více u hypoxické skupiny s CCPA (90 % potkanů v P21 a 72 % potkanů v P25) než u hypoxické skupiny (69 % potkanů v P21 a 62 % potkanů v P25), rozdíly však nejsou signifikantní.

Výsledky naší studie prokázaly, že perinatální hypoxie naruší dlouhodobé motorické projevy u vyvíjejících se laboratorních potkanů. Pohybové deficity jsme zaznamenali ve 3 ze 4 zvolených motorických testů. V našem experimentu jsme shledali, že Rotarod test je nejméně citlivý pro detekci motorických deficitů u postižených zvířat. Pohybový projev v ostatních testech již nebyl významně narušen ve věku rané dospělosti (v P60), což můžeme pokládat za důkaz uplatnění nervové plasticity. Dalším závěrem naší práce je, že pohybový projev byl významně lepší u hypoxické skupiny s aplikací látky CCPA v porovnání se s hypoxickou skupinou ve všech testech kromě Rotarod testu. Těmito výsledky z behaviorálního testování bychom chtěli poukázat na možné využití látky CCPA, agonisty adenosinového A₁ receptoru,

pro zesílení adenosinergní inhibice v postnatální fázi vývoje, které tak může částečně omezit narušení motorického vývoje laboratorního potkana.

REFERENCE

- ADEN, U., A. LEVERIN, H. HAGBERG a B. FREDHOLM. Adenosine A1 receptor agonism in the immature rat brain and heart. *European Journal of Pharmacology*. 2001, 426(3), 185-192. ISSN 0014-2999.
- ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal behavior*. 1975, 23(4), 896-920. ISSN 0003-3472.
- AMBLER, Z. *Základy neurologie: učebnice pro lékařské fakulty*. 6., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2006, 351. ISBN 80-726-2433-4.
- ANDERSEN, S. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience*. 2003, 27(1-2), 3-18. ISSN 0149-7634.
- BAKER, H., LINDSEY, R. a S. WEISBROTH. *The Laboratory Rat*. New York: Academic Press, Inc., 1980. ISBN 0-12-074902-5.
- BALDUINI, W., V. DE ANGELIS, E. MAZZONI a M. CIMINO. Long-lasting behavioral alterations following a hypoxic/ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research*. 2000, 859(2), 318-325. DOI: 10.1016/S0006-8993(00)019971
- BIERNASKIE, J.; CHERNENKO, G.; CORBETT, D. Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *Journal of Neuroscience*. 2004, 24(5), 1245-54. ISSN 0270-6474.
- BONA, E., B. JOHANSSON a H. HAGBERG. Sensorimotor Function and Neuropathology Five to Six Weeks after Hypoxia-Ischemia in Seven-Day-Old Rats. *Pediatric Research*. 1997, 42(5), 678-683. ISSN 0031-3998.
- BONA, E., U. ADEN, E. GILLAND, B. FREDHOLM a H. HAGBERG. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia: The effect of adenosine receptor antagonists. *Neuropharmacology*. 1997, 36(9), 1327-1338. ISSN 0028-3908.

- BROCARD, F., L. VINAY a F. CLARAC. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Brain research. Developmental Brain Research*, 1999, 117(1), 81-89. ISSN 0165-3806.
- BROOKS, S. a S. DUNNET. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009, 10(7), 519-529. ISSN 1471-0048.
- CALAMANDREI, G. Ethological and methodological considerations in the use of newborn rodents in biomedical research. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2004, 40(2), 195-200. ISSN 0021-2571.
- CÍBOCHOVÁ, R. Psychomotorický vývoj dítěte v prvním roce života. *Pediatric pro praxi*. 2004, 6, 291-297. ISSN 1213-0494.
- CLARAC, F., F. BROCARD a L. VINAY. The maturation of locomotor networks. *Progress in Brain Research*. 2004, 143, 57-66. ISSN 0079-6123.
- CLARAC, F., L. VINAY, CAZALET, J., FADY, J. a J. JAMON. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews*. 1998, 28(1-2), 35-43. ISSN 0165-0173.
- CUNHA, R. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signalling*. 2005, 1(2), 111-134. ISSN 1573-9546.
- COUNOTTE, D., A. SMIT, T. PATTIJ a S. SPIJKER. Development of the motivational system during adolescence, and its sensitivity to disruption by nicotine. *Developmental Cognitive Neuroscience*. 2011, 1(4), 430-443. ISSN 1878-9293.
- DELCOUR, M., M. RUSSIER, M. AMIN, O. BAUD, V. PABAN, M. BARBE a J. COQ. Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behavioural Brain Research*. 2012, 232(1), 233-244. ISSN 0166-4328.
- FAN, L., S. LIN, Y. PANG, M. LEI, F. ZHANG, P. RHODES a Z. CAI. Hypoxia-ischemia induced neurological dysfunction and brain injury in the neonatal

rat. *Behavioural Brain Research*. 2005,165(1), 80-90. DOI 10.1016/j.bbr.2005.06.033.

FRANĚK, M., Š. VACULÍN a R. ROKYTA. *Fyziologie a klinická fyziologie: principy a praktická cvičení*. Vyd. 1. Praha: R.B.C., 2009, 132. Medicína (R.B.C.). ISBN 978-80-254-5409-1.

GIDDAY, J., J. FITZGIBBONS, A. SHAH, M. KRAUJALIS a T. PARK. Reduction in Cerebral Ischemic Injury in the Newborn Rat by Potentiation of Endogenous Adenosine. *Pediatric Research*. 1995, 38(3), 306-311. ISSN 0031-3998.

GRAMSBERGEN, A. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 1998, 22(4), 547-553. ISSN 0149-7634.

HALLE, J., C. KASPER, J. GIDDAY a B. KOOS. Enhancing adenosine A1 receptor binding reduces hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats. *Brain Research*. 1997, 759(2), 309-312. DOI 10.1016/S0006-8993(97)00364-8.

HUNTER, C., L. BENNET, G. POWER, V. ROELFSEMA, A. BLOOD, J. QUAEDACKERS, S. GEORGE, J. GUAN a A. GUNN. Key Neuroprotective Role for Endogenous Adenosine A1 Receptor Activation During Asphyxia in the Fetal Sheep. *Stroke*. 2003, 34(9), 2240-2245. ISSN 1524-4628.

JAMON, M. The early development of motor control in neonate rat. *Comptes Rendus Palevol*. 2006, 5(3-4), 657-666. ISSN 1631-0683.

JANSEN, E. a W. LOW. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behavioural Brain Research*. 1996, 78(2), 189-194. DOI 10.1016/0166-4328(95)00248-0.

KOLÁŘ, P., et al. *Rehabilitace v klinické praxi*. Praha: Galén, 2009, 713. ISBN 978-80-7262-657-1.

KRAUS, Josef. *Dětská mozková obrna*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005, 344. ISBN 80-247-1018-8.

LEBL, J. *Klinická pediatrie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2012, 698. ISBN 978-807-2627-721.

- LEDVINA, M., A. STOKLASOVÁ a J. CERMAN. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2004, 274. ISBN 80-246-0851-0.
- LELARD, T., M. JAMON, J. GASC a P. VIDAL. Postural development in rats. *Experimental Neurology*. 2006, 202(1), 112-124. ISSN 0014-4886.
- LUBICS, A., D. REGLÓDI, A. TAMÁS, P. KISS, M. SZALAI, L. SZALONTAY a I. LENGVÁRI. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic–ischemic injury. *Behavioural Brain Research*. 2005, 157(1), 157-165. ISSN 0166-4328.
- MARCUZZO, S., M. DUTRA, F. STIGGER, P. DO NASCIMENTO, J. ILHA, P. KALIL-GASPAR a M. ACHAVAL. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain and Development*. 2010, 32(4), 323-331. ISSN 0387-7604.
- MAREŠOVÁ, E., P. JOUDOVÁ a S. SEVERA. *Dětská mozková obrna: možnosti a hranice včasné diagnostiky a terapie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, 154. ISBN 978-807-2627-035.
- MCCUTCHEON, J. a M. MARINELLI. Age matters. *European Journal of Neuroscience*. 2009, 29(5), 997-1014. ISSN 1521-0103.
- MOORE, K. a T. PERSAUD. *Zrození člověka: embryologie s klinickým zaměřením*. 1. vyd. Překlad Richard Jelínek. Praha: ISV nakladatelství, 2002, xiv, 564. ISBN 80-858-6694-3.
- MUIR, G. Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. *Brain Research Bulletin*. 2000, 53(5), 719-726. ISSN 0361-9230.
- NEČAS, E. *Obecná patologická fyziologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000, 377. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0051-X.
- PFEIFFER, J. *Neurologie v rehabilitaci: pro studium a praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007, 350. ISBN 978-802-4711-355.

- PHILLIS, J. The effects of selective A1 and A2a adenosine receptor antagonists on cerebral ischemic injury in the gerbil. *Brain Research*. 1995, 705(1-2), 79-84. ISSN 0006-8993.
- POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER. *Obecná patologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011, 290. ISBN 978-807-2627-738.
- RIVKEES, S. a C. WENDLER. Adverse and Protective Influences of Adenosine on the Newborn and Embryo: Implications for Preterm White Matter Injury and Embryo Protection. *Pediatric Research*. 2011, 69(4), 271-278. ISSN 0031-3998.
- RIVKEES, S., Z. THAO, G. PORTER a Ch. TURNER. Influences of Adenosine on the Fetus and Newborn. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2001, 74(1-2), 160 - 171. ISSN 1096-7192.
- ROBINSON, S., K. PETELENZ, Q. LI, M. COHEN, A. DECHANT, N. TABRIZI, M. BUCEK, D. LUST a R. MILLER. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic–ischemic insults in rats. *Neurobiology of Disease*. 2005, 18(3), 568-581. ISSN 0969-9961.
- STADLIN, AL., A. JAMES, R. FISCUS, Y. WONG, M. ROGERS a C. HAINES. Development of a postnatal 3-day-old rat model of mild hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Research*. 2003, 993, 1-2, 101-110. ISSN 0006-8993.
- STRATA, F., J. COQ, N. BYL a M. MERZENICH. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience*. 2004, 129(1), 141-156. DOI 10.1016/j.neuroscience.2004.07.024.
- TAI, W., K. BURKE, J. DOMINGUEZ, L. GUNDAMRAJ a J. TURMAN. Growth deficits in a postnatal day 3 rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Behavioural Brain Research*. 2009, 202(1), 40-49. ISSN 0166-4328.
- TAKADA, S., C. SAMPAIO, W. ALLEMANDI, P. ITO, L. TAKASE a M. NOGUEIRA. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos

immunoreactivity. *Journal of Neuroscience Methods*. 2011, 198(1), 62-69. ISSN 0165-0270.

TROJAN, S. a J. POKORNÝ. Teoretický a klinický význam neuroplasticity. *Bratislavské lékařské listy*. 1997, 98(12), 667-663.

TROJAN, S., M. LANGMEIER, D. MAREŠOVÁ, J. MOUREK a J. POKORNÝ. Plasticity of the brain in neuroontogenesis. *Prague Medical Report*. 2004, 105(2), 97-110.

TURNER, C., H. YAN, M. SCHWARTZ, T. OTHMAN a S. RIVKEES. A1 adenosine receptor activation induces ventriculomegaly and white matter loss. *Neuroreport*. 2002, 13(9), 1199-1204. ISSN 0959-4965.

VACHOVCOVÁ, S. *Vliv perinatální hypoxie na motorický vývoj laboratorního potkana*. Praha, 2012. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství. 66 s. Vedoucí práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

VAN DE BERG, W., M. KWAIJTAAL, A. DE LOUW, N. LISSONE, C. SCHMITZ, R. FAULL, A. BLOKLAND, C. BLANCO a H. STEINBUSCH. Impact of perinatal asphyxia on the GABAergic and locomotor system. *Neuroscience*. 2003, 117(1), 83-96. DOI 10.1016/S0306-4522(02)00787-X.

VANNUCCI, R. a S. VANNUCCI. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental neuroscience*. 2005, 27, 81-86. ISSN 0378-5866.

VINAY, L., F. BEN-MABROUK, F. BROCARD, F. CLARAC, C. JEAN-XAVIER, E. PEARLSTEIN a J. PFLIEGER. Perinatal Development of the Motor Systems Involved in Postural Control. *Neural Plasticity*. 2005, 12(2-3), 131-139. ISSN 2090-5904.

VON LUBITZ, D., R. LIN, N. BISCHOFBERGER, M. BEENHAKKER, M. BOYD, R. LIPARTOWSKA a K. JACOBSON. Protection against ischemic damage by adenosine amine congener, a potent and selective adenosine A1 receptor agonist. *European Journal of Pharmacology*. 1999, 369(3), 313-317. ISSN 0014-2999.

- WAGNER, B., J. NEDELCU a E. MARTIN. Delayed Postischemic Hypothermia Improves Long-Term Behavioral Outcome after Cerebral Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rats. *Pediatric Research*. 2002, 51(3), 354-360. ISSN 0031-3998.
- WENDLER, C., S. AMATYA, C. MCCLASKEY, S. GHATPANDE, B. FREDHOLM a S. RIVKEES. A1 adenosine receptors play an essential role in protecting the embryo against hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, 104(23), 9697-9702. ISSN 1091-6490.
- WILLIAMS, P., P. DOU a F. DUDEK. Epilepsy and Synaptic Reorganization in a Perinatal Rat Model of Hypoxia-Ischemia. *Epilepsia*. 2004, 45(10), 1210-1218. DOI 10.1111/j.0013-9580.2004.60403.x.
- WOODWORTH, K., J. PALMATEER, J. SWIDE a M. GRAFE. Short- and long-term behavioral effects of exposure to 21%, 40% and 100% oxygen after perinatal hypoxia–ischemia in the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011, 29(6), 629-638. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2011.05.001.
- YAGER, J. a J. THORNHILL. The Effect of Age on Susceptibility to Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Neuroscience*. 1997, 21(2), 167-174. ISSN 0149-7634.
- YOUNG, R., J. KOLONICH, C. WOODS a S. YAGEL. Behavioral performance of rats following neonatal hypoxia-ischemia. *Stroke*. 1986-11-01,17(6), 1313-1316. DOI 10.1161/01.STR.17.6.1313.