

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Bc. Lucie Kozlová

**Možnosti ovlivnění vývoje motoriky
laboratorního potkana opakovaným podáváním
specifického antagonisty NMDA receptoru**

Diplomová práce

Praha 2016

Autor práce: **Bc. Lucie Kozlová**

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

Oponent práce: **RNDr. Karel Valeš, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2016**

Bibliografický záznam

KOZLOVÁ, Lucie. Možnosti ovlivnění vývoje motoriky laboratorního potkana opakovaným podáváním specifického antagonisty NMDA receptoru. Praha, 2016: Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství. 54 s. + přílohy. Vedoucí práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Abstrakt

Antagonisté NMDA receptoru vyvolávají u laboratorních potkanů hyperlokomoci. Cílem této práce je zjistit, jestli tento účinek nespecifických antagonistů vykazuje i antagonist NMDA receptoru specifický pro NR2 podjednotku. Tato podjednotka převládá v mozku v časném postnatálním období. V rešeršní části práce jsou shrnuty poznatky o NMDA receptorech a o vývoji laboratorního potkana. Experimentální část se věnuje působení specifického antagonisty NMDA receptoru Ro 25-6981 na motoriku zvířat. Látku jsme opakovaně podávali mláďatům laboratorního potkana od 7. do 11. postnatálního dne. Tato zvířata byla do dospělosti opakovaně testována baterií testů vhodných pro určitý věk na spontánní a reflexní motoriku a srovnávána s kontrolní skupinou zvířat. Náš výzkum ukázal, že látka nemá na hrubou motoriku laboratorního potkana významný účinek a zůstává vážným kandidátem na věkově vázané antiepileptikum.

Klíčová slova

NMDA receptor, NR2 podjednotka, specifický antagonist, laboratorní potkan, motorický vývoj, Ro 25-6981

Abstract

Nonspecific NMDA receptor antagonists induce hyperlocomotion in rats. The aim of this work is to determine whether the NMDA receptor antagonist specific for NR2 subunit exhibit similar negative effect as nonspecific antagonists. This subunit is predominant in the brain in the early postnatal period. The introduction summarizes the data on NMDA receptors and the development of rat. The experimental part deals with the action of a specific NMDA receptor antagonist Ro 25-6981 on motor performance of developing rats. Substance was repeatedly administered to rats at postnatal days 7 to 11. Spontaneous locomotion and motor performance of the animals were repeatedly tested up to adulthood by battery of tests appropriate for individual ages. Our research demonstrated that this substance does not have significant effect on motor system of laboratory rat and that it might be further tested as a possible age-bound antiepileptic drug.

Keywords

NMDA receptor, NR2B subunit, specific antagonist, laboratory rat, motor development, Ro 25-6981

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 pro k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 29. 4. 2016

Lucie Kozlová

Poděkování

Největší poděkování patří panu profesorovi MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za celé vedení diplomové práce, cenné rady, pomoc se statistickým zpracováním a za jeho skvělý přístup a podporu. Děkuji také všem pracovníkům Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR za jejich trpělivost a stále dobrou náladu, zvláště pak RNDr. Anně Mikulecké, Ph.D. za pomoc při vyhodnocování videí. Poděkování patří také mým nejbližším, kteří mě během celého studia a psaní práce podporovali, jak jen bylo možno.

OBSAH

ÚVOD	9
1 PŘEHLED POZNATKŮ.....	10
1.1 PŘENOS SIGNÁLU	10
1.2 RECEPTORY	10
1.3 GLUTAMÁTOVÉ RECEPTORY	10
1.3.1 Stavba NMDA receptoru	11
1.3.2 Podjednotky NMDA.....	12
1.3.3 Extra-neurální výskyt NMDA receptoru	17
1.3.4 LTP/LTD	18
1.3.5 Patologické stavy NMDA receptorového systému	19
1.3.6 Farnakologie NMDA receptoru.....	20
1.4 LABORATORNÍ POTKAN	22
1.4.1 Ontogeneze	23
1.4.2 Vývoj motoriky	23
2 CÍLE A HYPOTÉZY	29
3 METODIKA.....	30
3.1 ZVÍŘATA	30
3.2 LÁTKA	30
3.3 TESTOVÁNÍ MOTORIKY.....	31
3.3.1 Open field	31
3.3.2 Test vzpřimovacího reflexu	32
3.3.3 Negativní geotaxe	32
3.3.4 Vis na hrazdě	33
3.3.5 Horizontální žebřík	33
3.3.6 Rotarod	34
3.4 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	34
4 VÝSLEDKY	35
4.1 OPEN FIELD	35
4.2 TEST VZPŘIMOACÍHO REFLEXU	42
4.3 NEGATIVNÍ REOTAXE	42
4.4 VIS NA HRAZDĚ	43
4.5 PRAVIDELNÝ HORIZONTÁLNÍ ŽEBŘÍK	46
4.6 NEPRAVIDELNÝ HORIZONTÁLNÍ ŽEBŘÍK.....	48
4.7 ROTAROD.....	50
4.8 TESTOVÁNÍ HYPOTÉZ	50
5 DISKUZE	51
ZÁVĚR.....	54
LITERATURA	55
SEZNAM TABULEK	60
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	61

SEZNAM ZKRATEK

AMPA	alfa-amino-3-hydroxy-5-izoxazol propionová kyselina
AV ČR	Akademie věd České republiky
CA	pyramidální buňky hippocampu
CK2	casein kináza 2
CNS	centrální nervová soustava
CTD	karboxylová koncová doména, C-koncová doména
č.	číslo
ČR	Česká republika
D-APV	D-2 amino-5-phosphonovalerate
E	embryonální den, např. E4 je čtvrtý embryonální den
ER	endoplasmatické retikulum
FG	rychlá červená svalová vlákna
FOG	rychlá bílá svalová vlákna
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GluR	podjednotka AMPA receptoru
GLYX 13	rapastinel, antidepressivum
KA	podjednotka kainátového receptoru
LBD	vazebná doména agonisty
L-DOPA	levodopa, L-3,4-dihydroxyphenylalanin
LTD	dlouhodobá deprese
LTP	dlouhodobá potenciace
m.	musculus, sval
mm.	musculi, svaly
M	hydrofobní segment NMDA receptoru
MK-801	dizocilpine maleate
např.	například
NMDA	N-methyl-D-asparát
NR	podjednotka NMDA receptoru
NTD	amino koncová doména, N-koncová doména
obr.	obrázek
P	postnatální den, např. P4 je čtvrtý postnatální den
PDZ	postsynaptický denzitní protein
pH	vodíkový exponent, míra kyselosti a zásaditosti roztoku
QNZ 46	4-[6-Methoxy-2-[(1E)-2-(3-nitrophenyl)ethenyl]-4-oxo3(4H)quinazoliny]
	benzoová kyselina
Ro 25-6981	(αR , βS)- α -(4-Hydroxyphenyl)- β -methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidinepropanol maleate
Sb.	sbírka
SO	pomalá červená svalová vlákna
TCN-201	benzenesulfonamid

ÚVOD

Téma výzkumu a preklinických testování mě zaujalo na začátku magisterského studia v povinném předmětu farmakologie. Když se vyskytla příležitost účastnit se tohoto výzkumu, s radostí jsem jí využila. Ačkoliv se zdá, že téma výzkumu glutamátových receptorů je příliš vzdálené a nehodící se pro téma diplomové práce oboru fyzioterapie, opak je pravdou. Fyzioterapie se řadí do multidisciplinárního týmu a s pacienty s poruchami funkce glutamátových konkrétně NMDA receptorů se setkáváme v praxi velice často.

NMDA receptory patří mezi ionotropní glutamátové receptory, které jsou odpovědné za většinu excitačního přenosu v mozku. Poruchy NMDA receptorů jsou součástí patofyziologie nemocí centrálního nervového systému jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, deprese, poruchy autistického spektra či epilepsie a podílí se na patofyziologii chronické bolesti. Výzkum těchto patologických procesů a látek působících na NMDA receptory otevírá cestu pro lepší farmakologické řešení těchto onemocnění.

Laboratorní potkan je v biomedicínských oborech nejčastěji používaným laboratorním zvířetem. Potkan je se svými výhodami nejlepší savčím funkčním modelem k fyziologickým i patologickým pochodům v lidském těle. Mezi výhody patří relativně rychlá reprodukce (krátká březost, hodně mláďat) a větší nezralost zvířete při narození než u lidí, kterou využíváme k výzkumu prenatálních procesů u člověka. Pro testování se používá množství testů, jejichž podkladem je důkladná znalost fyziologie potkana, která je díky dlouhodobému používání tohoto zvířete detailní.

1 PŘEHLED POZNATKŮ

1.1 Přenos signálu

Přenos vzruchu mezi dvěma nervovými buňkami se převážně děje na synapsi. Synapse je spojení, které tvoří presynaptická část, synaptická štěrbina a postsynaptická část. Chemický přenos na synapsi určuje jednosměrnost vedení signálu. Presynaptické zakončení obsahuje synaptické váčky s neurotransmitery (rozeznáváme tři druhy váčků: malé světlé obsahující acetylcholin, glycin, GABA a glutamát, malé s denzním povrchem obsahující katecholaminy a s denzním povrchem obsahující neuropeptidy). Neurotransmitery jsou do štěrbin uvolňovány pomocí exocytózy v oblasti aktivní zóny. Pro uvolnění obsahu je nezbytná přítomnost Ca^{2+} , které napětově řízené kanály vypustí při příchodu akčního potenciálu. Uvolněné přenašeče působí na odpovídající receptory na postsynaptické membráně, přebytečné jsou difúzí nebo metabolismem ze štěrbin odstraněny. Účinnost signálu je dána typem kanálu, dochází ke snížení nebo zvýšení elektrické aktivity v postsynaptické části (Ganong, 2005).

1.2 Receptory

Receptory jsou tvořeny bílkovinnými molekulami (podjednotkami), které při navázání specifické látky změní konfiguraci. To způsobí změnu propustnosti buněčné membrány nebo vede k aktivaci intracelulární odezvy. Receptorový komplex se skládá z rozpoznávacího místa, kde se navazuje látka, efektorového systému, který zajišťuje odezvu, a transdukčního prvku, který vede informaci mezi dvěma předchozími. Pro jeden neurotransmitter existuje více podtypů receptorů, které se mohou lišit transdukčním nebo efektorovým prvkem. Receptory nezprostředkovávají vždy stejnou odpověď, protože se mohou přizpůsobovat změnám v dostupnosti neurotransmiterů. Regulace může probíhat v rámci změny počtu receptorů nebo změny vlastností např. změnou ve spojení podjednotek (Fišar a kol., 2009).

1.3 Glutamátové receptory

Glutamát je dikarboxylová aminokyselina, která odpovídá za většinu (až 75 %) excitačního přenosu v mozku. V nervové buňce vzniká jako intermediární produkt Krebsova

cyklu, ze synaptické štěrbině je zpětně vychytáván presynaptickou buňkou a gliovými buňkami.

Pro glutamát existují 2 typy receptorů: metabotropní a ionotropní.

Metabotropní receptory mají delší dobu latence a hlavně trvání účinku (200-400 ms) než ionotropní (20-40 ms) a jimi způsobená změna má tedy trvalejší charakter. Receptory působí přes G protein navázaný na intracelulární konec bílkovinných molekul, při aktivaci receptoru se změní intracelulární konfigurace, G protein se uvolní, což spustí metabolickou kaskádu. Bylo objeveno 11 podtypů receptoru, většina v mozečku a hippokampu.

Ionotropní glutamátové receptory obsahují interní iontový kanál, který je tvořen 4 bílkovinnými molekulami. Receptory jsou odpovědné za rychlý excitační přenos, způsobují změnu propustnosti pro Na^+ , K^+ , případně i Ca^{2+} . Nalézáme je na neuronech i na gliích. Podle agonistů glutamátu, na které nejvíce reagují, je dělíme do tří skupin: kainátové (kyselina z mořské řasy), NMDA (N-methyl-D-asparát), AMPA (alfa-amino-3-hydroxy-5-izoxazol propionová kyselina).

Všechny receptory jsou složeny z více podjednotek. AMPA receptory se skládají ze čtyř druhů podjednotek GluR1-R4, které jsou dle složení propustné pro Na^+ a Ca^{2+} ionty. Kainátové receptory se skládají z pěti podjednotek GluR5-7 a KA1, KA2. NMDA receptory mohou být tvořeny kombinací sedmi podjednotek, které jsou popsány dále. Podle toho, z jakých podjednotek jsou receptory složeny, se liší jejich vlastnosti a reakce na farmakologické zásahy (Ganong, 2005).

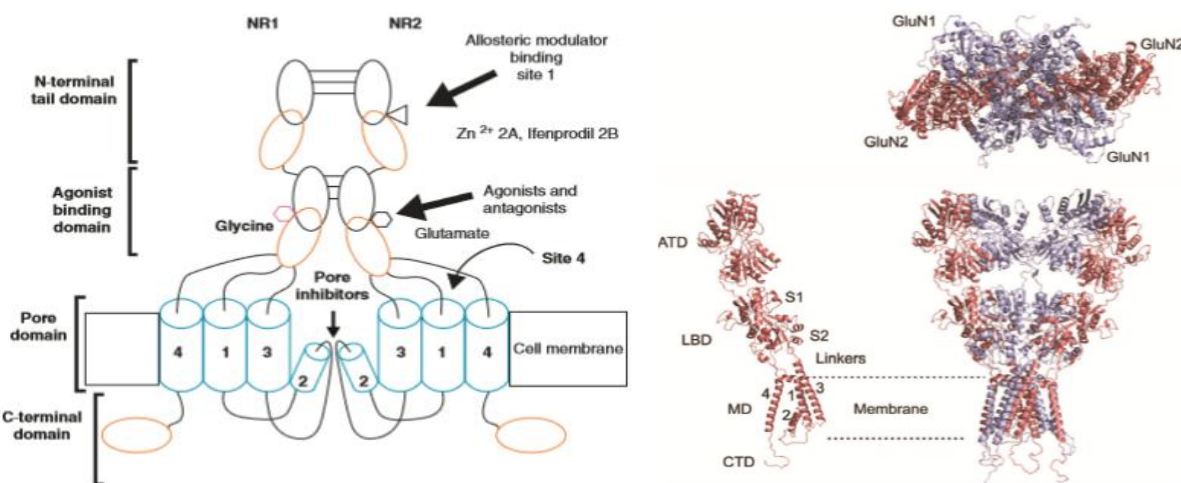
1.3.1 Stavba NMDA receptoru

NMDA receptory se vyskytují napříč celou CNS, postsynapticky se vyskytují na dendritech neuronů, presynapticky jako autoreceptory a heteroreceptory. Jejich přítomnost byla dokázána také v kortikálních astrocytech a extraneurálně. Jejich množství je odlišné v jednotlivých částech mozku a v jednotlivých vývojových stádiích (Haberny, 2002). Receptory jsou prostupné i pro vápenaté dvojmocné kationty.

Kanály NMDA receptoru jsou tetrametry složené ze dvou dimerů, které jsou utvořeny NR1-NR2 nebo méně časté NR1-NR3 podjednotkami (podjednotky popsány níže). Výskyt NR1-NR2a a NR1-NR2b je mapován hlavně v dospělém mozku, z nichž první je považován za synaptický a druhý za extrasynaptický s tím, že má významnou roli při vývoji mozku. NR1-NR2c a NR1-NR2d mají omezený výskyt. Vyskytují se i studie o výskytu tetrametrů

s NR1 (2krát) a kombinací NR2 podjednotek nebo i o existenci tzv. trimerů (Stephenson et al., 2008). Někteří autoři pojem tetrametr nepoužívají a hovoří o spolupracujících dimerech.

Obecně je dimer NR1-NR2 považován za základní stavební jednotku a na dvojici těchto dimerů je vysvětlována stavba a fungování tetrameru. Funkčně můžeme kanál rozdělit do čtyř částí (viz obrázek 1): extracelulárně je amino koncová doména (NTD, N-koncová doména), následuje vazebná doména pro agonisty receptoru (LBD), transmembránová oblast a intracelulární karboxylová koncová doména (CTD), která může interagovat s cytoplasmatickými proteiny. Agonisté popř. antagonisté se vážou do oblasti LBD. Glycin je vázán sítí utvořenou NR1 podjednotkami (S1) a glutamát sítí tvořenou NR2 podjednotkami (S2). Transmembránová oblast je ze čtyř hydrofobních segmentů (M1-M4). Z M2 segmentu se formuje iontový kanál, zároveň se M3 segment rotuje a posunuje se do boku. Funkce M1 a M4 segmentu ještě není zcela známá. M2 segment obsahuje rezidua asparaginu, který zprostředkovává blokádu Mg^{+} a ovlivňuje propustnost pro Ca^{2+} ionty (Flores-Soto et al., 2012; Sainz-Clemente et al., 2013; Vyklicky et al., 2014).



Obrázek 1. Schematický (Flores-Soto et al., 2012) a krystalografický (Vyklicky et al., 2014) model stavby NMDA receptoru

Otevření kanálu je podmíněno částečnou depolarizací, která je způsobena aktivitou AMPA receptorů nebo jiných kanálů s rychlou depolarizací, aby došlo k vypuzení Mg^{+} , který při klidovém membránovém potenciálu kanál blokuje, a navázání glutamátu a glycinu (Ganong, 2005).

1.3.2 Podjednotky NMDA

Na složení NMDA receptoru se může podílet sedm podjednotek: NR1, NR2a, NR2b, NR2c, NR2d, NR3a, NR3b. Složení podjednotek určuje vlastnosti receptoru. Jednotky

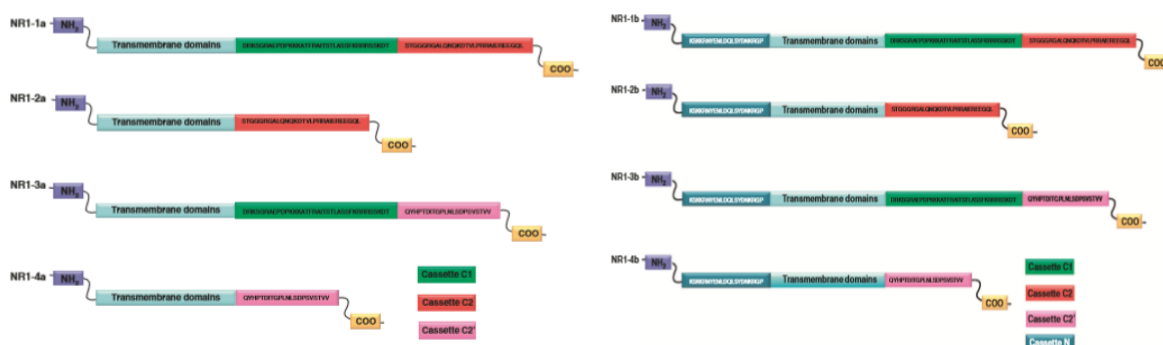
vykazují podobné složení, Stephenson et al. (2008) uvádí, že míra podobnosti se pohybuje mezi NR1 a NR2 ~29 %, NR1 a NR3 ~30%, NR2a až NR2d 38-52 % a mezi NR3a a NR3b ~55 %.

Při pokusech na hlodavcích bylo dokázáno, že specifická exprese podjednotek hraje důležitou roli při synaptogenezi, synaptickém zrání, ale i při eliminaci synapsí a neuronální smrti v časném postnatálním období.

NR1

NR1 podjednotka se vyskytuje napříč celým mozkiem. Shromažďuje se na dvou hlavních místech: na plasmatické membráně, kde je vázána s NR2 a NR3 podjednotkou, a v endoplazmatickém retikulu, kde je shromažďována ve formě dimeru NR1/NR1 (Low a Wee, 2010; Sanz-Clemente, 2013).

Jednotka je kódována jedním genem, ale vyskytuje se v 8 isoformách. Isoformy se od sebe liší přítomností exonu 5 (N1) v extracelulární N-koncové doméně a zpracováním exonů 21 (C1) a 22 (C2, C2'), které provokují změny na intercelulární C-koncové doméně. N1 region mění vlastnosti kanálu v závislosti na přítomnosti sperminu, pH, zinku a mění afinitu k agonistům a antagonistům. Receptory, které obsahují exon 5 jsou při fyziologickém pH aktivovány úplně, ty, které mají nedostatek exonů 5, jsou částečně inhibovány. Odlišnosti C-koncové domény jsou důležité pro regulaci NMDA receptoru na membráně. C1 region obsahuje neurofilamenta, která určují polohu a transportování NMDA receptoru z ER na membránu. C1 region je pozitivně ovlivňován glutamátem a negativně kalmodulin kinázou. Exon 22 může být zpracován ve dvou variantách: C2 a C2'. Oba se účastní na transportu, inserci a udržování NR1 podjednotky na membráně. C2' má navíc vazbu s postsynaptickými denzními proteiny, které umožňují shlukování podjednotek na povrchu buňky. Obě varianty mohou být řízeny synaptickou aktivitou (Flores-Soto et al., 2012; Zhou et al., 2009).



Obrázek 2. Isoformy NR1 podjednotky; Flores-Soto et al, 2012

NR1 podjednotka se v mozku začíná objevovat 14. embryonální den (E14), po 6. postnatálním dnu (P6) začíná exprese rychle stoupat, vrcholí v P19 a poté postupně klesá do hodnot vyskytujících se v dospělosti. Exprese jednotlivých isoform je v různých místech mozku odlišná, význam ale ještě není znám. Zatím co je výskyt NR1-2 hojný, NR1-1 a NR1-4 se vyskytuje nejvíce v přední části mozku (cortex, hippocampus). Ačkoliv se překrývají, liší se i hojnost NR1-a a NR1-b isoformy, kdy v hippocampu můžeme nalézt NR1-a formu ve všech buňkách a NR1-b forma je soustředěna do CA3 vrstvy (Paoletti et al., 2013; Haberny, 2002).

NR2

NR2 podjednotka se od NR1 podjednotky liší v časových i prostorových specifikacích. Čtyři druhy NR2 podjednotek jsou hlavní příčinou rozdílných vlastností NMDA receptoru a přímo ovlivňují postsynaptický excitační tok. C-koncová doména je u NR2 receptoru výrazně větší a má zásadní vliv na funkci a lokalizaci receptoru. NR2 podjednotky mají sekvenci, která aktivuje shlukování receptorů na membráně a maskuje tuto funkci NR1 podjednotky. Nadřazená je NR1 i sekvence NR2b podjednotky ve funkci ER retence. Funkce NR2 podjednotky podléhá regulaci prostřednictvím fosforylace, která zvyšuje aktivitu receptoru. Kromě kináz, které využívají serinová a threoninová rezidua na NR1 podjednotce, je NR2 podjednotka substrátem pro další kinázy, které fosforylují tyrosinová rezidua (Flores-Soto et al., 2012). Jednotlivé subtypy NR2 receptoru se liší odlišnými rezidui na M3 segmentu (Paoletti et al., 2013).

Hlavní výskyt NR2 podjednotky v CNS je na plazmatické membráně buňky, velká většina výzkumů uvádí, že je lokalizována postsynapticky. V dospělé CNS jsou NMDA receptory s NR2a podjednotkou převážně obsaženy v synaptických sítích a receptory s NR2b podjednotkou v extrasynaptických sítích (Sanz-Clemente et al., 2013).

Ontogeneze NR2

Embryonálně dochází v mozku ze čtyř podjednotek hlavně k expresi NR2b a NR2d podjednotky. Ihned po narození startuje exprese NR2a podjednotky (Paoletti et al., 2013). V prvních týdnech po narození v mozku NR2b a NR2a podjednotky dominují. NR2a podjednotky dominují v mozku do 10. – 14. postnatálního dne. V tomto období dochází k výměně a na jejich místa nastupují NR3b podjednotky (Fukaya et al., 2005; Low a Wee, 2010). NR2b podjednotka se začíná vyskytovat v různých částech mozku od narození a až do 10. postnatálního dne ji můžeme najít v celém mozku. Množství NR2b podjednotky stoupá až

do P21, do dospělosti množství mírně klesne (Wenzel et al., 1997). NR2c podjednotky jsou detekovány od 10. - 14. postnatálního dne. NR2d podjednotky jsou nalézány od raného vývoje. Začátek jejich exprese byl zaznamenán v Purkyňových buňkách během prvních 8 postnatálních dní (Sanz-Clemente et al., 2013; Haberny, 2002).

NR2a a NR2b

Expres NR2a podjednotky začíná po narození, v P0 je detekovatelná v CA1 regionu hippocampu a slabý signál vychází z mozkové kůry a striata. V P5 je již podjednotka detekovatelná v celém mozku. V dalších postnatálních dnech exprese podjednotky stoupá s vrcholem v 3. postnatálním týdnu. V P21 je největší koncentrace NMDA s NR2a podjednotkami v globus pallidus, subthalamické oblasti, tektu a prodloužené míše, největší exprese podjednotky je v hippocampu, mozkové kůře, striatu, thalamu, čichovém jádru a v mozečku. Po tomto vrcholu je exprese do dospělosti mírně redukována. NR2b podjednotka se v den narození (P0) již hojně vyskytuje v čichovém jádru, hippocampu a mozkové kůře. V P5 je tento subtyp produkován v celém mozku. Změna nastává mezi P10 a P21, kdy dochází k restrikci exprese a podjednotka je nadále detekovatelná hlavně v přední části mozku. V dospělém mozku je koncentrace ve srovnání s P21 klesne jen minimálně s maximem v mozkové kůře, thalamu a mozečku (Wenzel et al., 1997). Striatální NMDA receptory, které obsahují NR2a a NR2b podjednotky přednostně regulují striato-pallidální a striato-nigrální projekční neurony (Fantin et al., 2007).

Odlisný je pravděpodobně u těchto subtypů systém vazby a mobility na membráně. NR2b podjednotka je na membránu vázána PDZ (post synaptic density protein), NR2a podjednotka se váže na membránu výhradně za absence PDZ. Díky této vazbě, která je daleko lépe narušitelná fosforylací casein kinasou 2 (CK2), se NMDA receptor obsahující NR2b podjednotku lépe uvolní nebo naváže na membránu (Paoletti et al., 2013). Tento názor nesdílejí všichni autoři (např. Sanz-Clemente et al., 2013). NR2b podjednotka má větší afinitu ke glutamátu, ale NR2a podjednotka má vyšší pravděpodobnost aktivace kanálu i rychlejší deaktivaci čas. Studie to přikládají převážnému synaptickému (NR2a) a extrasynaptickému (NR2b) výskytu podjednotek (Sanz-Clemente et al., 2013).

NR2c

NR2c podjednotka je produkována hlavně v mozečku, thalamu a čichovém jádru dospělých jedinců. Nástup podjednotky je proti předchozím opožděný. Slabý signál je detekovatelný v P0, P5 i P10, výrazný vzestup exprese je zaznamenán až v P21. Změna

distribuce a exprese po P21 do dospělosti není evidována (Wenzel et al., 1997). NR2c podjednotka se odlišuje nízkou vodivostí kanálu a senzitivitou k magneziu, to umožňuje v některých částech mozku otevření kanálu bez postsynaptické depolarizace. Pravděpodobnost otevření je ale ve srovnání s NR2a podjednotku až 10 krát nižší (Sanz-Clemente et al., 2013; Strong et al., 2014).

NR2d

Tato podjednotka je lokalizována zejména extrasynapticky, synapticky nebyla zatím jasně dokázána. Exprese podjednotky začíná už embryonálně, po narození dochází k restrikci podjednotky do kaudálních částí mozku, největší exprese je okolo dne P7. V dospělosti je největší množství podjednotek lokalizováno v diencephalu, mezencephalu a v míše. Charakteristický je pro tuto podjednotku dlouhý decay time, a to 4-5 sekund (Paoletti et al., 2013; Sanz-Clemente et al, 2013; Mothet et al., 2015).

NR3

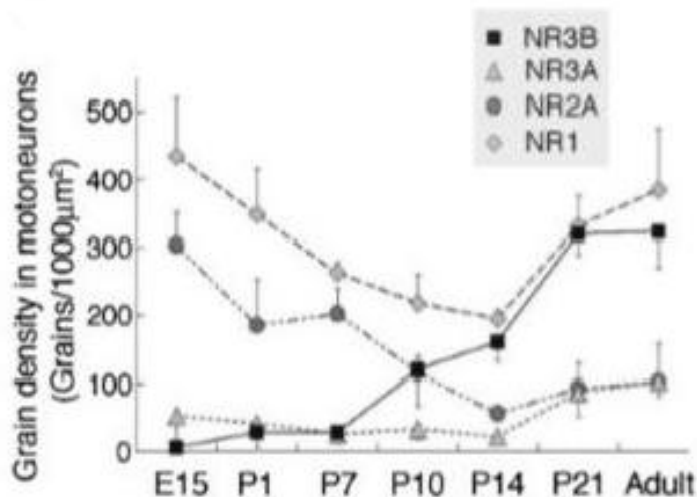
NR3 podjednotka byla identifikována ve dvou formách NR3a a NR3b. Vázané se vyskytují v podobě dimerů NR1-NR3 a heterotrimerů NR1-NR3a-NR3b, NR1-NR2-NR3, které jsou aktivovány navázáním glycinu (koagonista) a za přítomnosti glutamátu (agonista).

NR3A podjednotka vykazuje 27% podobnost s NMDA NR1 a NR2 podjednotkami a 23% podobnost s non-NMDA receptorovými proteiny, do skupiny receptorů se zařadila podobnou strukturou M1 segmentu. Nachází se na postsynaptických membránách napříč celou CNS. Největší koncentrace této podjednotky je v míše, thalamu, hypotalamu, mozkovém kmenu, hippocampu a amygdale.

Výskyt NR3b podjednotky je stejně jako NR1 (v její přítomnosti) v celé CNS. Koncentrace je větší v mozkovém kmenu, hippocampu, mozečku a míše. V mozečku je součástí Purkyňových buněk na rozdíl od NR3a podjednotky, která v mozečku dominuje v granulárních buňkách. V míše se vyskytuje v multipolárních neuronech předních a zadních rohů (Low a Wee, 2010).

Ontogeneze obou NR3 subtypů se liší. V raném postnatálním věku je u hlodavců přítomno relativně vysoké množství NR3a proteinu a NR3b je nedetekovatelný. V období P7-P21 dochází k poklesu NR3a, který zůstává nízký i v dospělosti. Během tohoto období se začíná zvyšovat množství NR3b (Low a Wee, 2010). NR3b podjednotka se v dospělém životě vyskytuje nejvíce v motoneuronech (Paoletti et al., 2013). V oblasti předních míšních rohů

(motoneurony) popsal Fukaya et al. (2005) vztah mezi NR2a a NR3b podjednotkou. Postnatálně do období P10-14 dominuje v této oblasti NR2a podjednotka, ta je v období poklesu nahrazována NR3b podjednotkou, která dosáhne konečného množství P21 a zůstává do dospělosti (Fukaya et al., 2005).



Obrázek 3. Vývoj podjednotek NMDA receptoru; Fukaya et al., 2005

Z obrázku vyplývá, že tvarová změna V u NR1 podjednotky patrně souvisí s vyvíjecí se změnou podjednotek na motoneuronech.

Role NR3 receptoru není ještě zcela známá. Změněný receptorový komplex vykazuje odlišnou odpověď na aferentní signál, což může vysvětlovat sníženou odpověď NMDA receptoru na motoneuronech u starších a dospělých jedinců, a je odolný vůči NMDA zprostředkované excitotoxicitě (Fukaya et al., 2005). Přítomnost redukuje senzitivitu k Mg^{2+} a zároveň snižuje propustnost pro Ca^{2+} . Při nástupu NR3 jednotky na synapse dochází pravděpodobně k útlumu zrání synapsí, což umožňuje inzerci AMPA receptorů (Paoletti et al., 2013).

1.3.3 Extra-neurální výskyt NMDA receptoru

Kromě toho, že se NMDA receptory hojně vyskytují v CNS, je postupně stále objevována jejich přítomnost v extraneurálních tkáních.

Jsou to především orgány odpovědné za homeostázu kalcia a orgány vysoce závislé na rovnováze kalciové koncentrace. Poruchy NMDA receptorů mají souvislost s mnoha onemocněními, nicméně je ještě třeba mnoha výzkumů k rozlišení a využití potenciálu receptorů ve výše popsaných orgánech (Bozic a Valdivielso, 2014).

V následující tabulce do kategorie ostatních patří lymfocyty, keratinocyty, slezina, žaludek, ovaria, dolní urogenitální trakt, brzlík, pankreas a u NR2c podjednotky i příčně pruhované svalstvo (Bozic a Valdivielso, 2014).

	Ledviny	Kost	Příštítná tělíska	Srdce	Ostatní
NR1	x	x	x	x	x
NR2a	x	x		x	
NR2b	x	x		x	x
NR2c	x			x	x
NR2d	x	x		x	
NR3a	x				
NR3b	x				

Tabulka 1. Výskyt jednotlivých podjednotek v orgánech mimo CNS; Bozic a Valdivielso, 2014

1.3.4 LTP/LTD

Dlouhodobá potenciace (Long-Term Potenciation, dále LTP) a dlouhodobá deprese (Long-Term Depression, dále LTD) hrají významnou roli v plasticitě nervových synapsí. Dochází k nim na excitačních i inhibičních synapsích za předpokladu různých protokolů, které jsou stále zkoumány. V protokolech se kromě NMDA receptorů účastní i jiné např. kainátové, serotoninové, dopaminové nebo metabotropní glutamátové receptory. LTP a LTD přispívá k mnoha mozkovým funkcím, jako je paměť, učení, transmise bolesti, emocí a vzniku a udržování chronické bolesti (Zhuo, 2009).

Ganong popisuje jeden z protokolů, kterého se účastní NMDA receptory takto: ke vzniku dlouhodobé potenciace dochází souhrou AMPA a NMDA receptorů. LTP je „rychle vznikající stabilní zvýšení postsynaptické odpovědi na nesynaptickou stimulaci vyvolané krátkou salvou podnětů o vyšší frekvenci, která aktivuje nesynaptické neurony“ (Ganong, 2005, s. 116). Mechanismus byl popsán v oblasti hippocampu, primární aktivací AMPA receptorů a sekundární aktivací NMDA receptorů se do postsynaptické buňky dostane Ca^{2+} , které aktivuje kalmodulin. Ca^{2+} kalmodulinkináza II navazující v kaskádě dále způsobuje pozitivní zpětnou vazbu v podobě zvýšení propustnosti sousedních AMPA receptorů. Glutamát a někteří jeho agonisté mohou ale způsobit zvýšený intracelulární tok Ca^{2+} , jehož koncentrace vede k buněčné smrti (Ganong, 2005, s. 109, 116-117). V dnešní době už jsou známy studie dokazující tuto synaptickou aktivitu ve středním mozku na NMDA receptorech bez účasti AMPA receptorů (Paleotti et al., 2013).

Protokoly spouštějící LTP jsou odlišné pro NMDA receptory, které jsou složeny z odlišných podjednotek, a rozdíly jsou i u totožných receptorů dle jejich lokalizace v mozku např. blokáda NR2-NMDA receptoru v amygdale redukuje LTP, ale nedojde k úplné blokadě, zatímco blokáda stejného receptoru v CA1 regionu hippocampu nemá na indukcii LTP vůbec vliv (Zhuo, 2009).

Dlouhodobá deprese vzniká opačným mechanismem tedy nižší frekvencí stimulace, která vyvolává i menší vzestup Ca^{2+} . LTD vzniká pravděpodobně defosforylací AMPA receptorů (Ganong, 2005). LTD vyvolané v AMPA receptorech může indukovat LTD aktivitu v NMDA receptorech, za určitých podmínek může ale LTD NMDA receptorů vzniknout bez průvodní aktivace AMPA receptorů. Přesný mechanismus průběhu aktivace je stále zkoumán (Paoletti et al., 2013).

Pokusy zkoumající závislost jednotlivých podjednotek v NMDA receptorech na vyvolání LTP/ LTD ukázaly, že aktivace NMDA receptoru s NR2a podjednotkou přímo souvisí s vyvoláním LTP a receptor s NR2b podjednotkou vyvolává LTD. V indukcii LTP/LTD se však nachází diskrepance ve vývoji a lokalizaci NMDA receptorů, proto převládá názor, že podjednotky NMDA receptoru nejsou jediné, které LTP/LTD vyvolávají (Paoletti et al., 2013).

1.3.5 Patologické stavy NMDA receptorového systému

NMDA receptory jsou důležité pro presynaptický vývoj a maturaci a hrají zásadní roli při excitační synaptické transmisi a synaptické plasticitě. Období největší synaptické exprese má koincidenci s obdobím intenzivní formace synapsí, předpokládá se, že aktivace axonálních NMDA receptorů může facilitovat formování synapsí (Fedder a Sabo, 2015). Dominantní role NMDA receptoru je ale zároveň příčinou větší senzitivity k excitotoxicitě, způsobenou zvýšeným influxem Ca^{2+} a zvýšenou aktivitou receptoru. Nadměrná koncentrace Ca^{2+} v buňce způsobuje peroxidaci lipidů buněčné membrány, ER a mitochondrií. Proces vede k narušení iontové homeostázy a poklesu zásob ATP. Zvýšená koncentrace Ca^{2+} aktivuje intracelulární signální dráhy spojené s buněčnou apoptózou. (Flores-Soto et al., 2012).

Narušení formování synapsí při vývoji mozku přispívá k patologii neurovývojových a psychiatrických onemocnění jako je autistické spektrum, epilepsie, anxieta, deprese nebo schizofrenie (Fedder a Sabo, 2015). Dysfunkce receptoru může být podkladem

k onemocněním i po období jejich největší exprese, kdy by měly vykazovat stabilitu např. neurodegenerativní postižení, kognitivní změny, cerebrální ischemie, aj. (Paolletti et al., 2013).

Indikace	Změny NMDA receptoru	Farmakoterapie	Zdroj
Epilepsie	p. s. epilepticus - zvýšená exprese NR2b podjednotky, zvýšená regulace aktivity receptorů obsahujících podjednotku (žádné změny u NR2a podjednotky)	premedikace NR2b antagonistou	Guli et al., (2016)
Deprese	zapojení NMDA není jasné, ale při inhibici dochází k rychlé (24hod) a trvalé (dny) redukci symptomů	NMDA antagonist (ketamin), NR2b antagonist	Miller et al., (2014); Paolletti et al., (2013)
Poruchy autistického spektra	redukovaná i zvýšená funkce NMDA receptoru, mechanismus nejasný	využití NMDAR antagonistů i potenciátorů	Paolletti et al., (2013)
Schizofrenie	Redukovaná aktivita NMDA receptoru, alterace metabolismu D-serinu (primárně) a glycinu	NMDA potenciátory, D-serinové a glycinové inhibitory	Mothet et al., (2015); Paolletti et al., (2013)
Alzheimerova choroba	zvýšené množství beta-amyloid peptidu se váže na synapse a způsobuje pokles exprese NR2b podjednotky, korelace mezi změnou NMDA receptoru a kognitivní dysfunkcí	NMDA antagonist (memantin), NR2b antagonist	Sanz-Clemente et al., (2013); Flores-Soto et al., (2011); Paolletti et al., (2013)
Parkinsonova choroba	pokles množství NR1 a NR2b podjednotky, při léčbě L-DOPA změna distribuce NR2b a zvýšená exprese NR2a podjednotky, souvislost s motorickým postižením	NR2b antagonist, zkoumání vlivu NR2a podjednotky	Sanz-Clemente et al., (2013); Paolletti et al., (2013)
Huntintonova choroba	prvotní pokles exprese NR2a a NR2b podjednotky je asociována s větší citlivostí k degeneraci neuronu, gen Huntington indukuje aktivaci NR2b excitotoxicitu	NMDA antagonist, NR2b antagonist	Flores-Soto et al., (2011); Paolletti et al., (2013)
Ischemie a traumatická postižení mozku	hyperaktivace receptoru s NR2b podjednotkou vede k excitotoxicitě	NR2b antagonist, peptidy narušující NR2b interakce	Paolletti (2013); Celso Constantino (2014)

Tabulka 2. Patologické stavy ve vztahu s NMDA receptory; vlastní zpracování

1.3.6 Farmakologie NMDA receptoru

Funkce NMDA receptoru může být cíleně pozitivně i negativně ovlivněna. Výzkum potenciace a deprese funkce NMDA receptoru se týká využití látek hlavně u neurologických onemocnění jako schizofrenie, cévní mozková příhoda, celková ischemie, Parkinsonova nebo

Alzheimerova choroba a depresí (Vyklícky et al., 2014; Strong et al., 2014). Současné studie ukazují na výraznou neuroprotektivní funkci při zvýšené aktivaci NR2a podjednotky (Zhang et al., 2015).

Pozitivní vliv na funkci má několik skupin látek:

- polyaminy – spermin
 - zvýšením senzitivity glycinu NR2b podjednotky
- neurosteroidy – pregnenolon sulfát
 - zvýšením pravděpodobnosti otevření kanálu s podjednotkou NR2a nebo NR2b
- selektivní allosterické potenciátory – methadon
 - zvýšením frekvence otevírání kanálů s NR2c a NR2d podjednotku
- pyrolidinony – selektivní potenciáci NR2c podjednotky
- parciální agonisté – D-cykloserin
 - zvýšením LTP
- peptid GLYX 13 a jeho analogy
 - zvýšením LTP a snížením LTD

Negativně působících látek je zaregistrováno mnoho, ne na všech ale probíhají studie. Podle vazebného místa je můžeme dělit na kompetitivní antagonisty, blokátory kanálu a nekompetitivní antagonisty. Kompetitivní antagonisté se vážou na místo agonisty, ale kanál neaktivují. Blokátory kanálu se vážou na místo kanálu a způsobí jeho neprůchodnost. Jsou závislé na napětí a prvotní aktivaci receptoru, jejich účinnost je na začátku pomalá, výhodou je úměra mezi vzestupem účinnosti a aktivitou receptoru. Protože je ale kanál tvořen více druhy podjednotek, vykazují tyto antagonisté nízkou selektivitu ke konkrétním podjednotkám. Nekompetitivní antagonisté navázáním kamkoliv na receptor receptor inaktivují. Jsou nezávislí na napětí, aktivaci receptoru a výhodou je velká specifita k dané podjednotce. Specifičtí antagonisté ještě nebyli identifikováni pro NR3 podjednotku (Vyklícky et al., 2014; Strong et al., 2014; Paoletti et al., 2013).

- kompetitivní antagonisté – D-2-amino-5-phosphonovalerate (D-APV)
- blokátory kanálu – dizocilpine maleate (MK-801)
 - phenylcyklidin, ketamin – používané jako anestetika
 - memantin – specifický nízkou aktivitou a rychlou disociací po inaktivaci receptoru
- nekompetitivní antagonisté – QNZ 46 – specifický pro NR2c a NR2d podjednotku

- sulfonamidové deriváty – benzenesulfonamid (TCN-201) – specifický pro NR2a podjednotku
- phenylethanolaminové sloučeniny – ifenprodil, eliprodil, Ro 25-6981 specifické pro NR1/NR2b podjednotku, vážou se na povrch mezi laloky podjednotek tohoto dimeru

Studie ukazují, že menší molekuly se navazují s větší afinitou a na receptor mají větší vliv. Některé látky jsou v současnosti testovány kvůli specifickým podmínkám, které vyžadují, pouze in vitro, např. TCN-201 (Regan et al., 2015). Komplikovaná je interpretace farmakologických znalostí pro triheteromické receptory. Například funkce tri-heteromeru NR1/NR2a/NR2b je potenciována Zn^{+} se stejným výsledkem, ale ifenprodil i přes svou vysokou afinitu inhibuje receptor jen přibližně z 20%. Pro působení látek na tri-heteromery je potřeba další výzkum (Paolletti et al., 2013).

1.4 Laboratorní potkan

Potkan je zvíře, které se do Evropy dostalo z Asie na začátku 18. stol. Taxonomie laboratorního potkana:

říše: živočichové (Animalia)

kmen: strunatci (Chordata)

třída: savci (Mammalia)

podtřída: živorodí (Theria)

řád: hlodavci (Rodentia)

podřád: myšovci (Myomorpha)

čeleď: myšovité (Muridae)

podčeleď: pravé myši (Murinae)

rod: krysa (Rattus)

druh: potkan (Rattus norvegicus)

poddruh: potkan laboratorní (Rattus norvegicus var.alba)

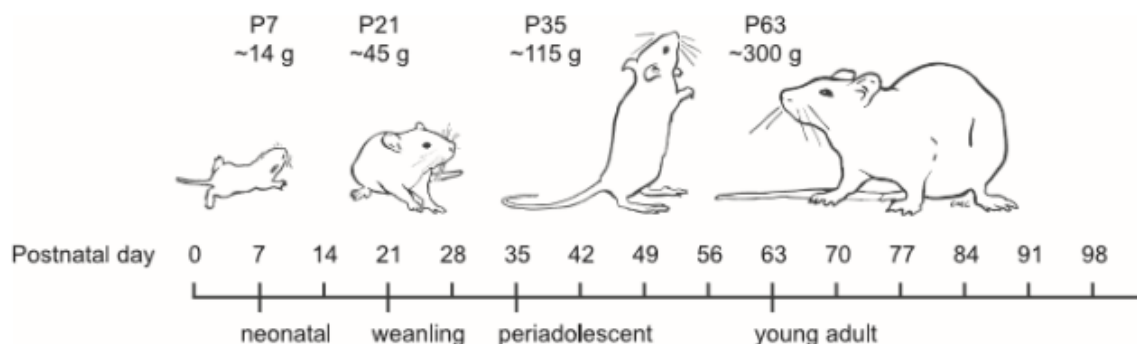
Bílí potkani byli poprvé uchováni v roce 1909 ve Wistar institutu ve Filadelfii, odkud se jako první domestikované zvíře pro výzkumné účely rozšířili do laboratorních chovů po

celém světě. Podobná patofyziologie a etiologie onemocnění potkana a člověka umožňuje jeho použití pro výzkum v experimentální medicíně napříč obory (Krinke, 2000, s. 3-6). Studie o podobnosti zrání nervové soustavy potkana a člověka pochází ze začátku 20. stol., kdy uváděli, že 1 den potkana odpovídá 30 lidským dnům, novorozené dítě odpovídá věku potkana P5, protože se rodí více nezralý. Tvrzení bylo doloženo studii mozku o podobnosti růstu váhy, poklesu množství vody, akumulace myelinu, zrání mozečku a dosažení tloušťky mozkové kůry (Donaldson, 1916).

1.4.1 Ontogeneze

Těhotenství je vícečetné a trvá 21-22 dnů. Mláďata se rodí v jednom vrhu obvykle 12-18, ale může jich být i více než 20 (Krinke, 2000, s. 163-171). Vývoj motoriky trvá u potkana od nejnižších k nejvyšším modelům 2-3 týdny po narození (viz níže). Mláďe je u matky v laboratorních podmínkách do věku přibližně P21 a poté je odstaveno.

V dalším období nastupuje u mláďat období sexuálního zrání. Sexuální zrání je obecně definováno u samic vaginálním otevřením, ke kterému dochází ve věku P32-34, a u samců balano-prepuciální separací, ke které dochází ve věku P45-48. Období dospělosti předchází ještě adolescence, která je jako u lidí charakterizována změnami chování s menším pudem sebezáchovy, riskováním a sociálními hrami. Období dospělosti začíná po osmém postnatálním týdnu, což odpovídá přibližně P63 (McKutcheon a Marinelli, 2009). Laboratorní potkan se dožívá přibližně 3 let.



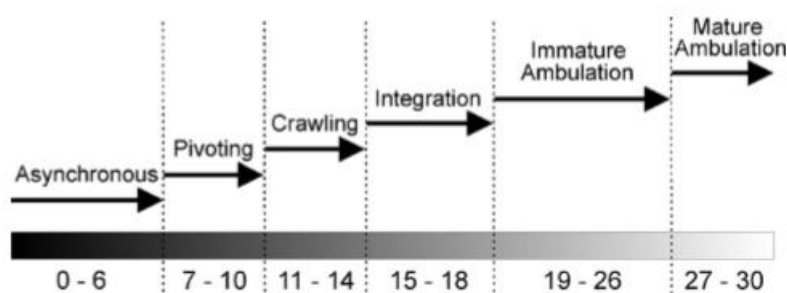
Obrázek 4. Schéma odlišných vývojových stádií laboratorního potkana v prvních třech měsících života; McKutcheon a Marinelli, 2009

1.4.2 Vývoj motoriky

Jak už bylo řečeno, vývoj motoriky trvá u potkana od nejnižších k nejvyšším modelům 2-3 týdny po narození. Na organismu probíhá rostrokaudálním a ventrodorzálním směrem.

Potkan je schopen generovat pohyby na spinální úrovni již v embryonálním stadiu okolo E20. Tento mechanismus jde po narození vyvolat při umístění mláděte do vody, kde začne plavat. Plavání zprostředkované spinálními okruhy ve věku P1 se od plavání dospělého jedince liší, hlavním rozdílem je asynchronnost končetin. Primitivní plavání všech čtyř končetin jde vyvolat v prvním týdnu života, u zadních končetin do P15 (Muir, 2000).

Shriner et al. (2009) popsali podrobně vývoj chůze v jednotlivých časových obdobích od P0 do P30. V textu níže shrnu jejich výzkum a rozdělení a obohatím o poznatky jiných autorů.



Obrázek 5. Zjednodušené schéma vývoje chůze u potkana druhu *norvegicus* v prvním postnatálním měsíci; Shriner et al., 2009

P0-P6

Novorozený potkan zaujímá pozici v pronaci. Pozice je stabilní a dokáže ji řídit bez větších oscilací ve frontální rovině. Čenich je stále v kontaktu s podložkou a oči jsou zavřené (Lelard et al., 2006). Ramenní i pánevní pletence nejdou elevovat od podložky. Končetiny nejsou longitudinálně s osou těla. Končetiny jsou laterálně od trupu drženy v ulnární deviaci a prsty zůstávají otevřené a extendované (Shriner, 2009). Při přijímání potravy dochází na končetinách k stretchingovému reflexu, kdy dojde k natažení celých končetin (Krinke, 2000).

Po narození dochází ke zrání kortikospinálních drah. Dráhy dosahují thorakolumbální úrovně až v P6 a jejich vývoj pokračuje až do P15, někdy i déle (Muir, 2000; Shriner et al., 2009). V tomto období se vyskytují na končetinách asynchronní pohyby řízené na spinální úrovni, které jsou indikovány sensorickým pravděpodobně čichovým stimulem, po kterém dochází k natočení těla za ním (Shriner et al., 2009; Brocard et al., 1999).

V P4 se objevuje první horizontální pohyb hlavy v ose krční páteře a v P5 první vertikální pohyb hlavou zahrnující izolovaný pohyb v atlanto-kraniálním kloubu (Lelard et al., 2006; Brocard et al., 2009; Geisler, 1993).

P7-P10

Ve věku P8 výrazně stoupá aktivita pohybů hlavy. Dochází k elevaci ramenních pletenců od podložky. Ve věku P9 se končetiny přesunují blíže k ose těla a jsou schopny unést váhu přední části těla. Díky biomechanickým změnám se mění postavení cervikální, thorakální a lumbální páteře, křivky se prohlubují a krční páteř začíná být držena více vertikálně (Lelard et al., 2006; Geisler, 1993).

V této lokomoční fázi hovoříme o pivotování. Pivotování probíhá v abduktor-adduktorovém vzoru. Přední část těla je předními končetinami držena nad podložkou. Pohyb hlavy do strany je následován abdukci čelistní končetiny a addukci záhlavní končetiny. Zadní končetiny jsou stále převážně pasivní. Tělo je stabilizováno díky pohybům hlavy a krku. (Shriner et al., 2009; Geisler, 1993) na konci tohoto období v P10 uvádí začínající schopnost plazení v podobě 2-4 kroků (viz níže).

Prsty předních končetin jsou stále nediferencované a je na nich možno vyvolat obdobu úchopového reflexu. Nediferencovanou aktivitu způsobuje polyneurální inervace. Svalové vlákno přijímá podnět z dvou či více motoneuronů. U předních končetin mizí polyneurální inervace na prstech v P10, u celých zadních končetin později (Shriner et al., 2009). Polyneurálně jsou zásobeny i svaly středu těla, tato inervace mizí okolo P9 u mm. intercostales.

P11-P14

V P11 se přední i zadní končetiny přesouvají blíže longitudinální ose (Lelard et al., 2006). Objevuje se nová motorická dovednost – plazení. V tomto období dochází k velkému vzestupu lokomoční aktivity díky otevření očí v P12.

Otevření očí má klíčovou úlohu ve vývoji postury. Hlava je většinu času vzpřímená, nedotýká se podložky. Při pohybu se krční páteř napřímí a při odpočinku je téměř ve vertikále. Mezi hlavou a krkem je dosaženo maximální ventrální flexe. Ke změnám flexe a extenze v celé délce páteře dochází synchronicky (Lelard et al., 2006). Do postury je více zapojena diaphragma, v období P14 mizí její polyneurální inervace (Geisler, 1993).

Plazení v P11, Geisler (1993) uvádí P10, je lokomoce řízená všemi čtyřmi končetinami. Břicho není v kontaktu s podložkou, čenich se již po P12 nedotýká podložky. Ze začátku je pohyb trhavý, zvíře dokáže udělat jen pár kroků. Výsledkem je „stop and go“ motorické chování. Od dospělé chůze se tento model liší a dospělý jedinec se již k němu nevrací. Páteř je

na rozdíl od dospělé chůze konkávní, k napřímení dochází až později. Pohyby hlavy při pohybu jsou jen v horizontální rovině, vertikální rovina je umožněna jen při odpočinku. Při chůzi dochází k výchytkám páteře ve frontální rovině, chybí kontrola trupu a zadních končetin. Zadní končetiny jsou abdukovány v exorotaci (Shriner et al., 2009; Geisler, 1993). Ačkoliv jsou přítomné volní pohyby v zadních končetinách, protože kortikospinální zrání dosáhlo v P11 úroveň lumbální páteře, dokonalá regulace flexorových a extenzorových skupin není ještě plně k dispozici. Stále se v oblasti vyskytuje polysynaptická inervace a svalová vlákna, kortikospinální a rubrospinální systém není zralý (Shriner et al., 2009).

P15-P18

V tomto období dochází v motorice k velkému pokroku. Dozrávají kortikospinální a rubrospinální dráhy a chůze začíná mít podobu chůze dospělého jedince.

V P15 dozrává inervace na úrovni m. soleu a m. gastrocnemia, P16-17 mizí polyneurální inervace na úrovni prstů zadních končetin a tím je umožněn plný úchop na všech končetinách. V P18 se poprvé objevuje aktivita rubrospinálního traktu (Muir, 2000; Shriner et al., 2009) Při stožení zůstávají zadní končetiny addukované a exorotace je menší. Při chůzi jsou pohyby končetin i trupu plynulejší a trup zůstává při běhu napřímen (Geisler, 1993). Stabilizaci páteře zajišťuje hluboké zádové svalstvo, které má podobný vývoj jako svalstvo dolních končetin. V období P15 se začíná aktivita zádového svalstva synchronizovat s fázičnou aktivitou zadních končetin (Gramsbergen et al., 1998; Muir, 2000).

P19-P26

Tato fáze nezralé chůze je charakteristická periodami s výrazně zvýšenou rychlostí chůze, v testech se ale vzhledem k rychlosti objevuje větší množství chyb než u dospělých jedinců (Shriner et al., 2009).

Na začátku tohoto období se stále zvyšuje koordinace posturálních svalů a synchronizace svalů při fázičném cyklickém pohybu. Mezi P21-P26 má 90 % krokového cyklu svalovou souhru mezi svaly zadních končetin a trupu (Gramsbergen, 1998). V P20 je již umístění a orientace předních končetin úplně shodné s postojem dospělého jedince, zadní končetiny mají latenci 5 dní (stále jsou ve větší abdukci a exorotaci). V tomto stádiu zůstává širší báze (Shriner et al., 2009).

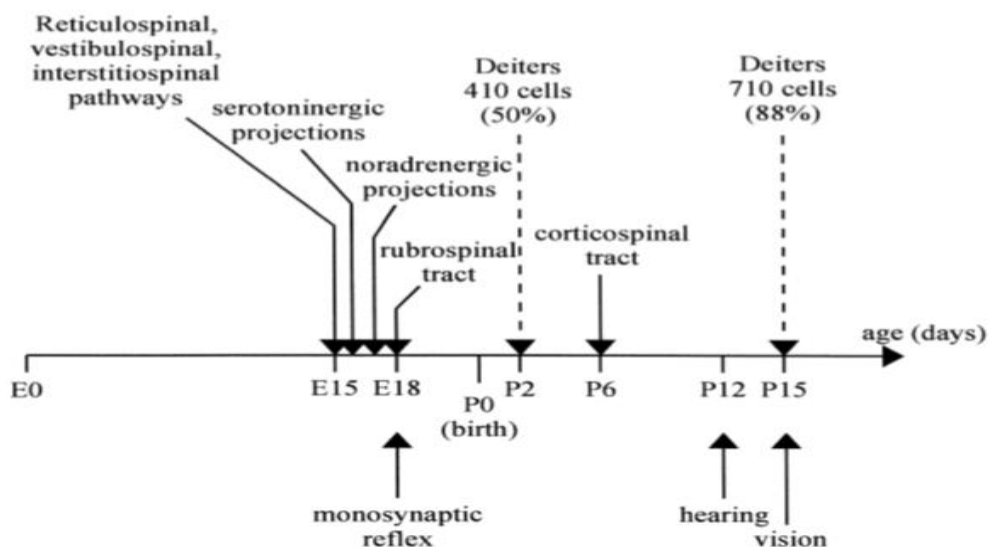
P27 a dále

Mezi P27 a P30 je plně dosaženo chůze dospělého jedince. Posledním krokem je zúžení báze, která je dána vzdáleností mezi chodidly. Širší báze se během dalšího života v koordinované chůzi může objevit v případě ohrožení posturální stability (Shriner et al., 2009).

Poznámky k motorické ontogenezi

Motorická ontogeneze a motorika obecně je ovlivněna více faktory – sval samotný, dozrávání nervových okruhů a senzoričkových drah. Podíl na zvýšení svalové síly a vytrvalosti může být dán i změnou složení svalových vláken, ke které dochází na začátku tohoto období. Před narozením nenacházíme diferenciaci vláken dle jejich metabolismu. Do P8 dochází k diferenciaci pomalých a rychlých myosinových řetězců. Během vývoje přibývá rychlých glykolytických vláken a až v P21 nacházíme konečnou diferenciaci dle metabolických vlastností na svalová vlákna SO, FOG I, FOG II a FG (Punkt et al., 2004).

Schopnost diferenciaci svalových skupin je určována rekrutováním motoneuronů, ke kterému dochází, jak bylo uvedeno výše, během prvních dvou týdnů života. Proces je dán více faktory, mezi něž patří změny membránových vlastností, regrese elektrických spojů mezi těly motoneuronů a polyneurální inervace svalových vláken. Volní motorika je dále v prvních dvou týdnech dána dozráváním kortikospinálních, vestibulospinálních a rubrospinalních drah (Gramsbergen et al., 1998; Muir, 2000).



Obrázek 6. Schematická škála vývoje descendentních drah u potkana v embryonálním a postnatálním věku; Clarac et al., 1998

Vertikální šipky na obrázku 6 ukazují čas, kdy první axony dosáhnou lumbální oblasti. Buňky Deitrova jádra reprezentují vestibulospinální axony (Clarac et al., 1998).

Pro udržení postury a orientaci v prostoru je nezbytný senzoričtý systém, při jeho nezralosti dochází k nekompletní či neefektivní koordinaci, což se také může podílet na vývoji motoriky. Pro stabilitu je využívána kombinace vizuální, proprioceptivní a vestibulární aference. Novorozené mládě potkana má k dispozici pouze olfaktorický systém, nedozrálý vestibulární aparát a částečně propriocepti (Clarac et al., 1998). Vývoj finální anatomie receptorového aferent-eferentního systému u potkana pokračuje až do konce třetího postnatálního týdne (Brocard et al., 1999).

Vestibulární aparát je plně funkční až 2-3 týdny po narození. Propriocepce je zastoupena po narození monosynaptickým napínacím reflexem (Clarac et al., 1998). Kožní receptory jsou již vyvinuty, párování aferentních a centrálních neuronů není zralé, ale minimální přenos nemůže být v raném postnatálním období vyloučen (Brocard et al., 1999).

Potkan na rozdíl od člověka disponuje dalším stabilizačním prvkem – ocasem. Mezi P7-10 začíná být ocas vzpřimován při chůzi, mezi P11-18 je stabilně držen nízko nad podložku, k aktivnímu švihnutí dochází v případě ztráty rovnováhy nebo pádu. Od P19 je tato schopnost dále uchována, při běhu je napřímen do paralely s podložkou (Shriner et al., 2009).

2 CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem práce bylo zjistit, jestli má opakované podávání antagonisty NMDA receptoru vliv na vývoj motoriky laboratorního potkana. K ovlivnění byla použita látka Ro 25-6981, specifický antagonist NR2 podjednotky, ve dvou rozdílných dávkách.

Potkani byli testováni motorickými testy volenými dle jejich stáří. Pro určení změn ve vývoji jsme zvířata testovali do dosažení rané dospělosti v sedmi předem určených časových bodech jejich vývoje. Potkany s aplikovanou dávkou látky jsme srovnávali s kontrolní skupinou potkanů, následně jsme ještě porovnávali skupiny s rozdílnou dávkou mezi sebou.

Hypotéza 1

H0: Motorika potkanů v rámci jedné skupiny se ve vývojových stupních nezmění.

HA: Motorika potkanů v rámci jedné skupiny se ve vývojových stupních změní alespoň v jednom z motorických testů.

Hypotéza 2

H0: Motorika potkanů se nezmění v závislosti na dávce opakovaně podané látky.

HA: Motorika potkanů se změní v závislosti na dávce opakovaně podané látky alespoň v jednom z motorických testů.

Hypotéza 3

H0: Změny v motorice potkana po opakovaném podání látky nepřetrvávají do rané dospělosti.

HA: Změny v motorice potkana po opakovaném podání látky přetrvávají do rané dospělosti alespoň v jednom z motorických testů.

3 METODIKA

Diplomová práce byla zpracovávána ve dvou etapách. V první etapě jsem sbírala poznatky z literatury a experimentálních prací, které jsou shrnuty v teoretické části práce. V druhé etapě jsme se věnovali výzkumné části práce. Výzkumná část práce je součástí grantového projektu P 304/12/G069 centra neurověd „Project of excellence in the field neuroscience“.

3.1 Zvířata

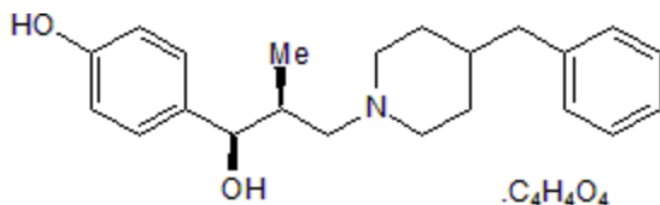
Experiment byl prováděn na samcích albinotických laboratorních potkanů kmene Wistar z chovu Akademie věd ČR ve věku P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61. P0 je zaznamenán jako den narození. Zvířata byla během procesu testování umístěna v příručním zvěřinci se stálými podmínkami: teplotou 22 ± 1 °C, vlhkostí 60 ± 5 % a denním cyklem 12:12 hod světlo:tma. Světlá část začínala v 6:00 a končila v 18:00. Zvířata byla testována pokaždé mezi 14 a 17 hodinou. Voda a potrava byly k dispozici ad libidum kromě doby testování. Ve zvěřinci byla zvířata ve standardní kleci se svou matkou a sourozenci do věku P21, od P21 pouze se sourozenci.

K testování bylo využito 30 samců ze 3 vrhů. V každému vrhu po 10 ti zvířatech byly zastoupeny všechny 3 skupiny (kontrolní zvířata, 2 skupiny zvířat s aplikací látky) tak, aby ve výsledku bylo v každé skupině otestováno 10 zvířat v každém věku.

Pokus byl schválený odbornou komisí Fyziologického ústavu AV ČR v souladu se zákonem České národní rady č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

3.2 Látka

K pokusu byl využit Ro 25-6981 maleat z Tocris Bioscience. Chemický vzorec látky je ($\alpha R, \beta S$)- α -(4-Hydroxyphenyl)- β -methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidinepropanol maleat.



Obrázek 7. Chemický vzorec Ro 25-6981 maleatu; Tocris Bioscience

Ro 25-6981 je specifický antagonist NR2B podjednotky NMDA receptoru. Na NMDA se navazuje výhradně na N-koncovou doménu podjednotky (Lynch et al., 2000), řadí se mezi nekompetitivní antagonisty. Blokáda způsobená Ro 25-6981 je závislá na relativní úrovni aktivace NMDA receptoru, výhodou je pomalejší nástup a zotavení z receptorové blokády a lepší inhibice kanálu i za zvýšené koncentrace agonisty. Látka je testována hlavně jako neuroptektant při glutamátové toxicitě a kombinované oxygeno-glukózové deprivaci (Fischer, 1997).

Ro 25-6981 byl před podáváním rozpouštěn v solném roztoku za mírného ohřívání v koncentraci 1 mg/ml. Mláďatům byl roztok podáván v rozmezí věku P7 až P11 intraperitoneálně v dávce 1 mg/kg a 3 mg/kg dle daného rozřazení do skupin. Kontrolní skupině byl podáván fyziologický roztok v objemu 1ml/kg.

3.3 Testování motoriky

Testování motoriky probíhalo ve věku P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61 vždy ve stejnou denní dobu. Zvířata byla na dobu testování odebrána matce a umístěna v kleci na vyhřívané podložce k udržení jejich tělesné teploty. Testování probíhalo ve speciální místnosti bez hluku a s tlumeným světlem. Dle věku byla zvířata jednou osobou testována vždy stejnou sadou testů ve stejném pořadí. Byl použit test pohybu ve vymezeném neznámém prostoru (Open-field), vzpřimovací reflex, negativní geotaxe, visu na hrazdě za horní končetiny, pravidelného a nepravidelného horizontálního žebříku a test na rotarodu.

	Open-field	Vzpřimovací reflex	Negativní geotaxe	Vis na hrazdě	Pravidelný žebřík	Nepravidelný žebřík	Rotarod
P12	*	*	*	*			
P15	*	*	*	*			
P18	*	*	*	*			
P21	*	*	*	*	*	*	
P25	*	*		*	*	*	
P31	*			*	*	*	
P61	*			*	*	*	*

Tabulka 3. Sady testů použité pro daný věk; vlastní zpracování

3.3.1 Open field

Pohyb po neznámém ohraničeném prostoru je jednoduchým testem spontánní pohybové aktivity. Zvíře je umístěno v černém ohraničeném prostoru tvaru čtverce a z vrchu je snímáno kamerou. Prostor jsme rozdělili do 16 ti čtverců, středové 4 sektory jsou definovány

jako střed. Mláďata ve věku P12, P15, P18, P21 a P25 jsme testovali v prostoru s rozměry 50 × 50 cm, zvířata ve věku P31 a P61 v prostoru 80 × 80 cm po dobu 5 minut. Zvíře je položeno do středu prostoru. Přirozeně dochází k jeho rychlému přesunu k okraji prostoru a prozkoumávání hranic. Postupně se úzkost zvířete snižuje tak, že začíná prozkoumávat střed prostoru. Program následně vyhodnotí vzdálenost, kterou zvíře uběhlo, čas a frekvenci výskytu zvířete ve středu prostoru. Nevýhodou testu je možné ovlivnění motoriky zvířete jeho emocionalitou a motivací, proto je nezbytné doplnit tento test jinými testy motoriky (Brooks a Dunnett, 2009; Karl et al., 2003).

Pohyb zvířat v open fieldu byl nahráván pomocí kamery a následně zpracováván (stříh videí, hodnocení) v programu EthoVision, který je k dispozici v Oddělení vývojové epileptologie AV ČR.

3.3.2 Test vzpřimovacího reflexu

Vzpřimovací reflex testuje vestibulární aparát a posturální reaktivitu, patří mezi základní neurologické reflexy. Vzpřimovací reflex je přítomen od konce prvního postnatálního týdne, jeho vývoj je ukončen až v 2-3 postnatálním týdnu (Geisler, 1993; Muir, 2000). Potkan je při testu položen do supinační polohy tzn. hřbetem na podložku a končetinami nahoru. Během sekundy by se měl samostatně obrátit zpět do pronační polohy tak, aby byly všechny čtyři končetiny v kontaktu s podložkou (Sanchez et al., 2012). U dvou nejstarších skupin jsme tento test neměřili, protože zvířata se otočila již v ruce a bylo prakticky nemožné položit je na záda na podložku.

3.3.3 Negativní geotaxe

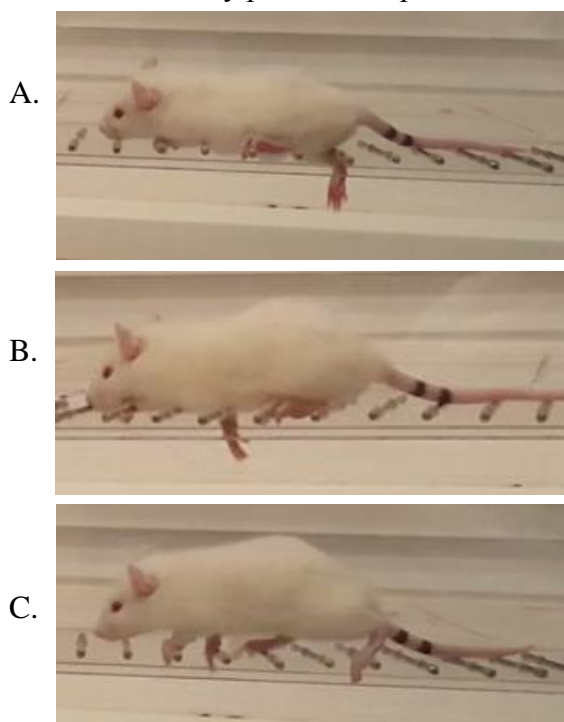
Negativní geotaxe je vázaná na funkci vestibulárního aparátu a propriocepce, reakce je závislá na organizované motorické odpovědi (Sanchez et al., 2012; Raminez a Spear, 2010). Zvíře bylo v našem pokusu položeno do středu fixní nakloněné roviny o rozměrech 18,5 × 17,8 cm a sklonu 30° hlavou dolů. Abnormální poloha hlavy vůči tělu stimuluje změnu polohy těla o 180°. Měřili jsme čas, za který se zvíře stihne o 180° otočit. Tento pokus není ovlivnitelný motorickým učením. Zvířata od věku P25 jsme netestovali, protože se neotočí, ale rovnou z nakloněné plošiny slezou.

3.3.4 *Vis na hrazdě*

Test visu na hrazdě je specifický test na sílu úchopu předních končetin zvířete (Brooks a Dunnett, 2009). Mláďata jsme zavěšovali za přední končetiny na 28,5 cm dlouhou horizontálně upevněnou dřevěnou kulatou tyč o průměru 10 mm do výšky 27 cm nad podložkou a měřili jsme dobu, po kterou se zvířata udrželi. Neochota zvířat držet se byla částečně eliminována hloubkou, hrazda byla vždy v takové výšce, aby se ocas nedotýkal dopadové plochy a zvířata neměla možnost prozkoumat prostor pod sebou a řízeně seskočit.

3.3.5 *Horizontální žebřík*

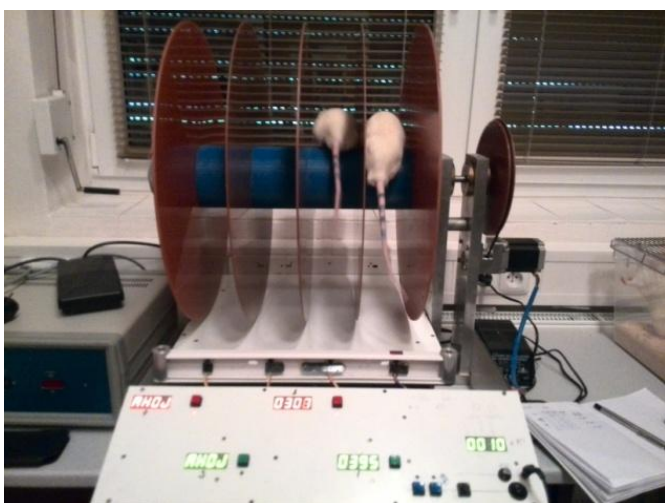
Běh po horizontálně uloženém žebříku testuje koordinaci předních a zadních končetin zvířete (Cummings et al., 2007). Tento test vyžaduje zrakovou kontrolu a aktivitu kortikospinálních a rubrospinalních drah, které dozrávají mezi P15 a P18, proto jsme tento test používali až od věku P21 (Muir, 2000). Mláďata jsme testovali na žebříku dlouhém 90 cm s pravidelně (rozestup příček 2 cm) a nepravidelně umístěnými příčkami (rozestup příček 1-4 cm). Koridor se žebříkem ústí do hnízda se sourozenci a stěny byly od sebe na šířku těla mláděte, abychom minimalizovali možnost jeho otočení a běhu v protisměru. Hodnotili jsme počet chyb a dobu, za kterou se mláďata dostala do hnízda, maximální čas byl omezen na 2 min. Chyba byla definována jako šlápnutí končetinou do prostoru mezi příčkami nebo sklouznutím nohy pod úroveň příček.



Obrázek 8. Mláďe ve věku P21 na pravidelném žebříku. A. přešlap zadní končetinou, B. přešlap přední končetinou, C. chůze bez přešlapu; vlastní zpracování

3.3.6 Rotarod

Rotarod je mechanicky poháněný přístroj, na kterém se testuje motorická koordinace, rovnováha a neuromuskulární funkce. Pro úspěšnost testu je nezbytná intaktnost cerebelárních funkcí a motorické koordinace. Přístroj, který rychlost otáček (4-40 ot./min) postupně zvyšuje, se nazývá akcelerod, je citlivější na deficit motorických funkcí (Karl et al., 2003; Gates et al., 2011). Námi použitý rotarod byl válec o průměru 6 cm s vrásčitým povrchem proti skluzu zvířete. Rotarod byl rozdělen do 4 částí o šíři 8,5 cm k testování 4 zvířat. Zvolili jsme začáteční rotaci 10 otáček za minutu, kterou jsme po 60 sekundách běhu zvýšili během 5 ti sekund na 15 otáček za minutu. Měřili jsme čas od začátku běhu do pádu zvířete z rotarodu. Časový limit byl 120 sekund.



Obrázek 9. Rotarod se zvířaty; vlastní zpracování

3.4 Statistické zpracování dat

Veškerá data získaná při testování byla analyzována ve statistickém programu SigmaStat (firmy Systat). Pomocí deskriptivní statistiky určené pro statistické soubory s jedním argumentem byla otestována normalita distribuce hodnot. Pro zhodnocení výsledků byla použita analýza rozptylu RM (repeated measurement) ANOVA, která je určena speciálně pro opakovaná měření na týchž subjektech. Odlišnost naměřených hodnot jednoho testu u 3 různých skupin jsme zjišťovali jednocestnou analýzou rozptylu (one way ANOVA). V případě rozdílu jsme použili párové srovnání Holm-Sidakovým testem. Hladina významnosti byla stanovena na 5 % ($P < 0,05$).

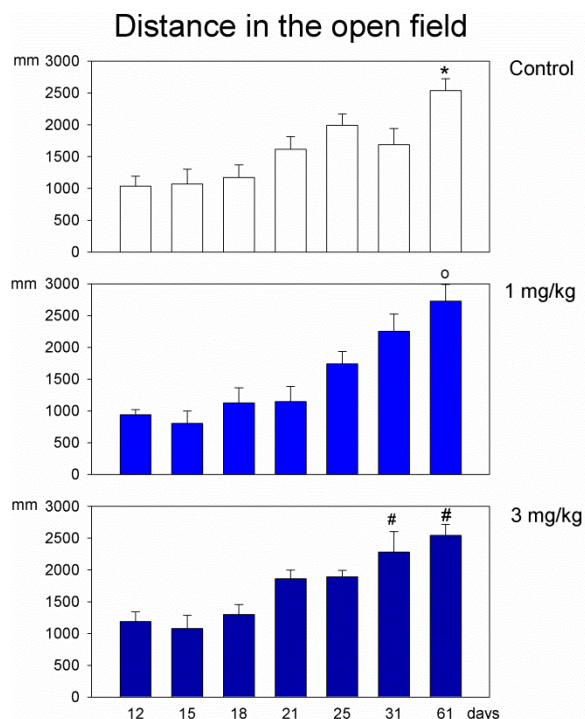
4 VÝSLEDKY

4.1 Open field

Testování zvířat v open fieldu jsme dělali u všech věkových skupin (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61). Pomocí počítačového programu jsme hodnotili vzdálenost, kterou zvířata za 5 minut uběhla, čas, který strávila v centrální části plochy, frekvenci, s jakou se do centra vracela, a jejich rychlost.

Vzdálenost v open fieldu

Nejmladší mláďata za daný čas uběhla okolo 1 m, dospělá uběhla více než 2,5 m. Na grafech můžeme vzhledem k věku vidět ve zdolané vzdálenosti vzestupnou tendenci. Po vyhodnocení výsledků se uběhnutá vzdálenost ve věkovém rozložení signifikantně liší ve věku P61 u všech skupin a ve věku P31 ve skupině v 3mg/kg látky. V kontrolní skupině je statisticky významný rozdíl od nejstarších mláďat proti všem mladším. Ve skupině s aplikací 1 mg/kg látky se nejstarší mláďata liší od mláďat věku P12, P15, P18, P21 a P25. Ve skupině se 3 mg/kg látky se významně liší dvě nejstarší skupiny od skupin ve věku P12, P15 a P18.



Obrázek 10. Vzdálenost, kterou zvířata naběhala; vlastní zpracování

Graf ukazuje vzdálenost, kterou zvířata naběhala v celém poli.

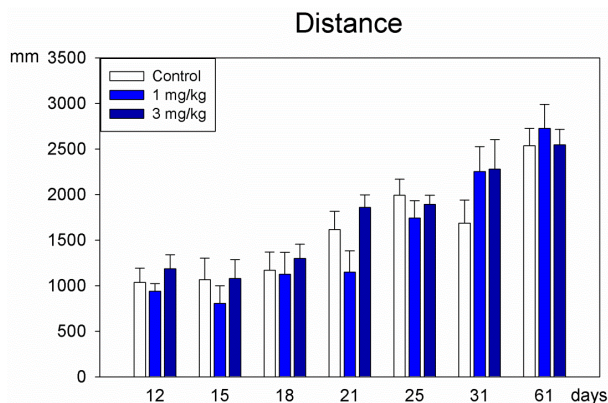
Bílý graf znázorňuje zvířata kontrolní skupiny; světle modrý graf znázorňuje zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; tmavě modrý graf znázorňuje zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

Osa y popisuje vzdálenost, kterou zvířata uběhla, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Symbole značí signifikantní rozdíly ve skupině: * = proti ostatním, o = proti P12-P25, # = proti P12-P18.

Když jsme porovnali zvířata podle množství aplikované látky vždy v jednom věku, nenašli jsme žádné signifikantní odchylky. Látka v tomto testu nemá významný vliv na uběhnutou vzdálenost.



Obrázek 11. Porovnání výsledků průměrně uběhnuté vzdálenosti; vlastní zpracování

Obrázek ukazuje porovnání výsledků průměrně uběhnuté vzdálenosti ve vztahu jednotlivých skupin zvířat.

Bílé sloupce znázorňují zvířata kontrolní skupiny; světle modré sloupce znázorňují zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; tmavě modré sloupce znázorňují zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

Osa y popisuje vzdálenost, kterou zvířata uběhla, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

cm	P12	P15	P18	P21	P25	P31	P61
Co	1034 ± 158	1067 ± 235	1170 ± 199	1615 ± 201	1992 ± 178	1687 ± 254	2538 ± 178
1 mg/kg	940 ± 82	805 ± 194	1126 ± 239	1149 ± 235	1741 ± 192	2252 ± 272	2727 ± 262
3 mg/kg	1187 ± 153	1079 ± 205	1298 ± 159	1860 ± 138	1893 ± 99	2280 ± 321	2545 ± 172

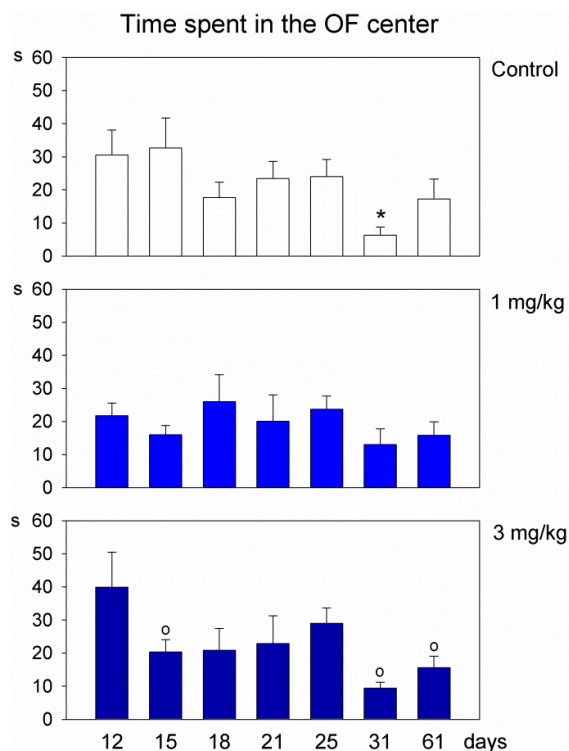
Tabulka 4. Průměrná vzdálenost ± střední chyba (s) v open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování

Čas v centru

Centrální pole bylo definováno u menší arény používané pro potkany ve věku P12, P15, P18, P21 a P25 i pro větší arény pro potkany ve věku P31 a P61 tak, aby bylo přímo úměrné celkovým rozměrům. Arény jsme vždy rozdělili do 16 ti čtverců, centrální byly 4 čtverce, jejichž ani jedna strana nebyla součástí obvodu.

V kontrolní skupině čas v centru strávila signifikantně kratší dobu proti všem ostatním zvířatům zvířata ve věku P31. Ve skupině s aplikací 1 mg/kg látky nebyly žádné statisticky významné rozdíly. Ve skupině se 3 mg/kg látky strávila kratší čas v centru zvířata ve věku P12, P31 a P61 proti nejmenším mláďatům.

Z níže znázorněného obrázku 12 vyplývá, že při srovnání zvířat dle množství podané látky nebyly nalezeny signifikantní odchylky v žádném věku a ani tendence ve skupině 15 ti denních mláďat nedosáhla úrovně statistické významnosti.



Obrázek 12. Čas, který zvířata průměrně strávila v centrální části prostoru; vlastní zpracování

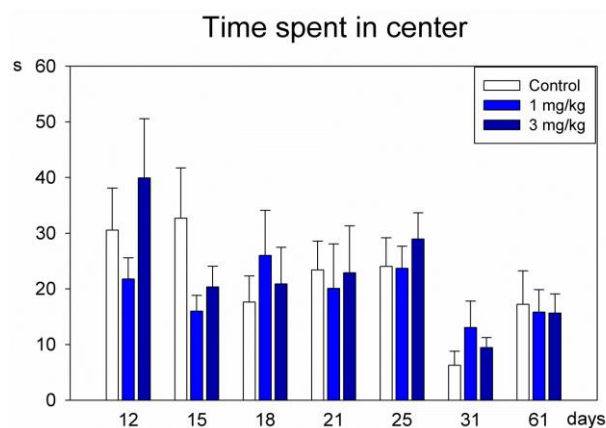
Graf ukazuje čas, který zvířata průměrně strávila v centrální části prostoru.

Bílý graf znázorňuje zvířata kontrolní skupiny; světle modrý graf znázorňuje zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; tmavě modré grafy znázorňuje zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

Osa y popisuje čas, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Symboly značí signifikantní rozdíly ve skupině: * = rozdíl proti všem, o = rozdíl proti P12.



Obrázek 13. Porovnání času stráveného v centrální části pole dle aplikace látky; vlastní zpracování

Obrázek ukazuje porovnání času stráveného v centrální části pole dle aplikace látky v jednom věku.

Bílé sloupce znázorňují zvířata kontrolní skupiny; světle modré sloupce znázorňují zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; tmavě modré sloupce znázorňují zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

Osa y popisuje vzdálenost, kterou zvířata uběhla, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

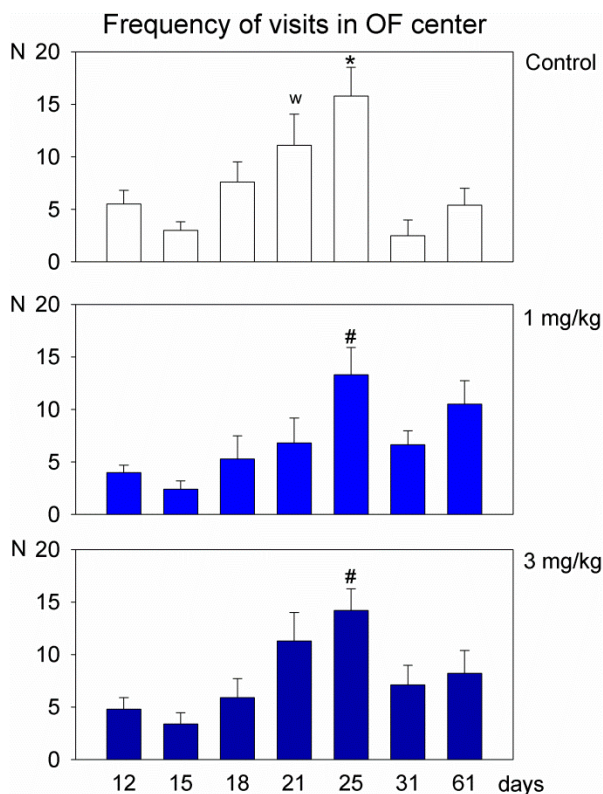
	P12	P15	P18	P21	P25	P31	P61
Co	30,6 ± 7,54	33,8 ± 9,05	17,6 ± 4,69	23,4 ± 5,18	24 ± 5,17	6,3 ± 2,5	17,2 ± 5,98
1 mg/kg	21,78 ± 3,8	16 ± 2,82	26 ± 8,11	20,1 ± 7,86	23,7 ± 3,98	13,1 ± 4,73	15,8 ± 4,06
3 mg/kg	39,9 ± 10,7	20,3 ± 3,72	20,9 ± 6,59	22,9 ± 8,46	29 ± 4,7	9,4 ± 1,81	15,7 ± 3,42

Tabulka 5. Průměrná čas ± střední chyba (s) strávený v centrálním poli open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování

Frekvence návštěv centra

Frekvence výskytu potkana v centrálním poli je číslo, které ukazuje, kolikrát potkan přes centrální pole přeběhl. Toto chování je ukazující na celkovou aktivitu zvířete, je hodně ovlivněno jeho anxiétou.

V rámci vývoje můžeme vidět v kontrolní skupině statisticky významné rozdíly ve věku P21 a P25. Věk P25 má větší rozdíl návštěv centra oproti všem ostatním věkovým skupinám s výjimkou P21. Zvířata věku P21 navštívila centrum statisticky vícekrát než ve věku P31. Zvířata s aplikovanou látkou v obou dvou dávkách byla signifikantně aktivnější ve věku P25 proti mláďatům P12, P15, P18 a P31. U kontrolní skupiny i skupin s aplikovanou látkou můžeme pozorovat tendenci vzrůstu aktivity ve věku P25, kdy za celý čas navštívila centrum v průměru 14krát.



Obrázek 14. Průměrná frekvence návštěv centrálního pole dle věku; vlastní zpracování

Graf vyobrazuje průměrnou frekvenci návštěv centrálního pole dle věku.

Bílý graf znázorňuje zvířata kontrolní skupiny; světle modrý graf znázorňuje zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; tmavě modré grafy znázorňuje zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

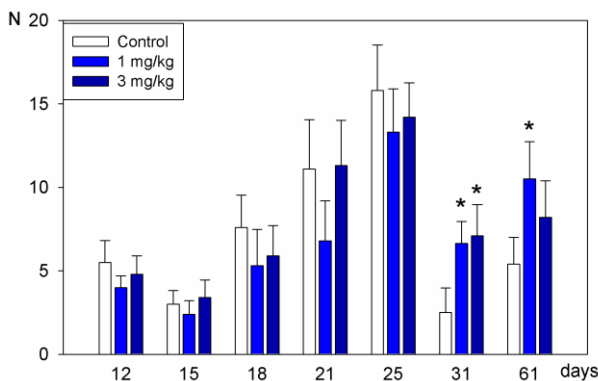
Osa y popisuje čas, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Symbole značí signifikantní rozdíly ve skupině: W = rozdíl P21 proti P31, * = rozdíl P25 proti všem ostatním s výjimkou P21, # = rozdíl P25 proti P12, P15, P18 a P31 v obou skupinách.

Při statistickém zpracování dat dle dávky látky v jednom věku jsme našli proti kontrolní skupině signifikantní rozdíly ve frekvenci návštěv centra ve věku P31 a P61 u skupiny s 1 mg/kg látky a ve věku P61 i u skupiny s dávkou 3 mg/kg látky.

Visits of center - frequency



Obrázek 15. Porovnání frekvencí návštěv centrálního pole dle aplikace látky v daném věku; vlastní zpracování

Obrázek ukazuje porovnání frekvencí návštěv centrálního pole dle aplikace látky v daném věku.

Bílé sloupce znázorňují zvířata kontrolní skupiny; světle modré sloupce znázorňují zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; tmavě modré sloupce znázorňují zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

Osa y popisuje vzdálenost, kterou zvířata uběhla, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61).

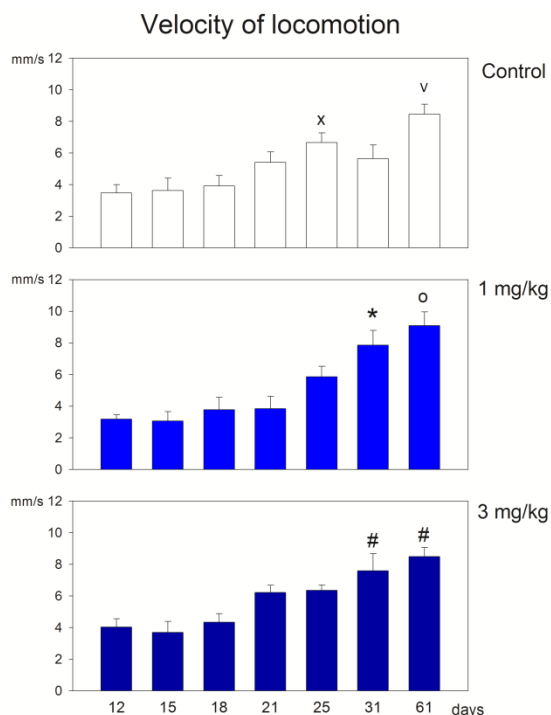
Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru. Symbol značí signifikantní odchylku: * = rozdíl od kontrolní skupiny.

	P12	P15	P18	P21	P25	P31	P61
Co	5,5 ± 1,31	3 ± 0,83	7,6 ± 1,93	11,1 ± 2,96	15,8 ± 2,73	2,5 ± 1,48	5,4 ± 1,61
1 mg/kg	4 ± 0,7	2,4 ± 0,81	5,3 ± 2,19	6,8 ± 2,39	13,3 ± 2,61	6,6 ± 1,32	10,5 ± 2,24
3 mg/kg	4,8 ± 1,09	3,4 ± 1,05	5,0 ± 1,8	11,3 ± 2,71	14,2 ± 2,05	7,1 ± 1,88	8,2 ± 2,2

Tabulka 6. Průměrná frekvence ± střední chyba (s) výskytu v centrálním poli open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování

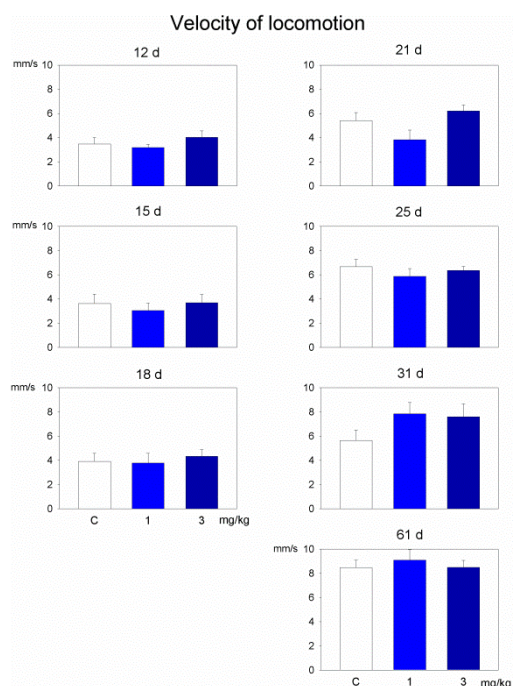
Rychlost

Při pohledu na grafy můžeme pozorovat ve vývoji vzestupnou tendenci ve změně rychlosti ve všech třech skupinách. V kontrolní skupině nastupuje statisticky významný rozdíl o něco dříve, P25 má významnou odchylku od P12-P18, kdy zvířata vyvíjela průměrnou rychlost 6,67 mm/s. Ve věku P31 byl u kontrolní skupiny mírný pokles. První významná odchylka se u dalších skupin nachází až v P31, kdy zvířata věku P31 s 1 mg/kg látky byla statisticky rychlejší než ve věku P12-P21 s rychlostí 7,85 mm/s a zvířata se 3 mg/kg látky byla rychlejší než ve věku P12-P18 s rychlostí 7,6 mm/s. Ve věku P61 se zvířata ze všech skupin byla schopna pohybovat přibližně stejnou průměrnou rychlostí 8,5-9 mm/s.



Obrázek 16. Průměrná rychlost zvířat v open fieldu; vlastní zpracování

Statistické porovnání rozdílů podle množství podané látky v daném věku nepřineslo žádné signifikantní odchylky.



Obrázek 17. Průměrná rychlost zvířat dle množství podané látky v daný věk; vlastní zpracování

Graf vyobrazuje průměrnou rychlost zvířat v open fieldu.

Bílý graf znázorňuje zvířata kontrolní skupiny; světle modrý graf znázorňuje zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; tmavě modré grafy znázorňuje zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

Osa y popisuje průměrnou rychlost, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P61).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Symbole značí signifikantní rozdíly ve skupině: X = rozdíl P25 proti P12-P18, V = rozdíl P61 proti P12-P21, o = rozdíl P61 proti P12-P25, * = rozdíl P31 proti P12-P21, # = rozdíl P31 a P61 proti P12-P18.

Grafy zobrazují průměrnou rychlost zvířat dle množství podané látky v daný věk. Věk je uveden nad každým dílčím grafem.

Na ose x je popsáno množství aplikované látky, na ose y je popsána rychlost v mm/s.

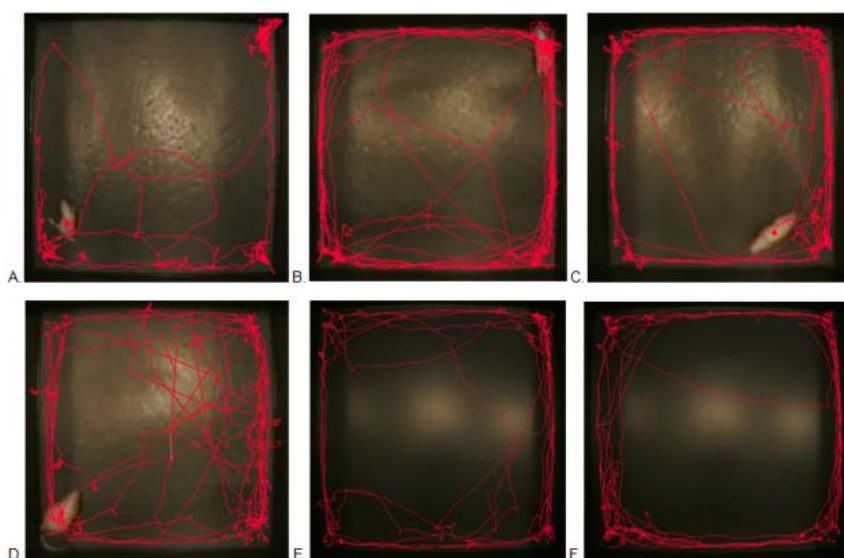
Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

	P12	P15	P18	P21	P25	P31	P61
Co	3,47 ± 0,53	3,23 ± 0,78	3,92 ± 0,67	5,4 ± 0,67	6,67 ± 0,6	5,65 ± 0,85	8,46 ± 0,62
1 mg/kg	3,18 ± 0,27	3,05 ± 0,61	3,78 ± 0,8	3,84 ± 0,79	5,87 ± 0,65	7,85 ± 0,93	9,09 ± 0,87
3 mg/kg	4,04 ± 0,52	3,69 ± 0,7	4,34 ± 0,53	6,22 ± 0,47	6,37 ± 0,33	7,6 ± 1,07	8,49 ± 0,57

Tabulka 7. Průměrná rychlost ± střední chyba (s) pohybu v open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování

Subjektivní hodnocení

Potkani mají určité vzorce chování a v novém prostoru se chovají specificky. Vložením do arény jsme je uvedli do nového a neznámého prostředí. Ze začátku zvířata prozkoumávají prostor okolo stěn a v rozích, kde se cítí bezpečněji. Zpravidla arénu několikrát oběhnou a popř. označují, teprve poté se pouští do volného prostoru, který nejprve rychle přebíhají a až ke konci se někteří odváží zůstat ve středu delší dobu. Výjimkou v tomto případě byla mláďata ve věku P12, která jsou ještě slepá (mají splepená oční víčka). Když se tato mláďata vydala do středu nevidíce nebezpečí, strávila tam mnohem více času než mláďata ve věku P15, což bylo pravděpodobně dáno slepotou a menší hybností. Na grafech tento jev můžeme pozorovat v mírně sestupné nebo stávající tendenci v času a frekvenci zvířat P12 na P15, ačkoliv bychom s věkem čekali tendenci vzrůstající už od počátku. Rychlost pohybu se z věku P12 na P15, kdy do hry vstupuje další sensorický vjem, statisticky nemění, subjektivně jsme mohli pozorovat změnu charakteru pohybu. Slepá mláďata se pohybovala pomalu a stále, starší se pohybovala rychleji, ale pohyb více střídala se zastavením, tím si vysvětlujeme stejný výsledek v přepočtu mm/s za celý pobyt zvířete v aréně. Čím byla zvířata starší, tím se pohybovala rychleji.



Obrázek 18. Trasa potkanů v prvních 5 ti minutách po uvedení zvířat do open fieldu ve věku A. P12, B. P15, C. P18, D. P25, E. P31, F. P61; Vlastní zpracování

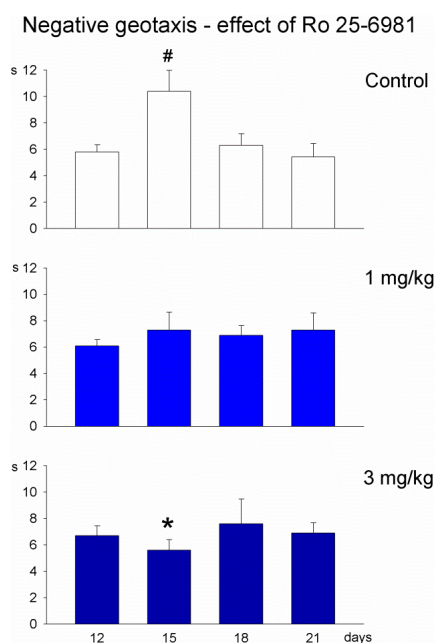
Další tendence můžeme pozorovat ve změně frekvence návštěv středu. U zvířat ve věku P21 a P25 je vidět nárůst počtu, toto období je pro zvířata typické jejich zvědavostí a nebojácností. V P31 a v P61 jsme pozorovali pokles návštěv i času stráveného v centru, zatímco uběhnutá vzdálenost udržovala vzestupnou tendenci. Předpokládáme, že tento jev je způsoben nárůstem anxiety u starších jedinců a zároveň větším rozměrem prostoru.

4.2 Test vzpřimovacího reflexu

Tento test jsme dělali u zvířat ve věku P12, P15, P18, P21 a P25. Všechna zvířata vykonala test v požadovaném čase 1s v každém věku. Jedno zvíře z kontrolní skupiny ve věku P12 potřebovalo na otočení 2 s, v dalším věku se ale doba zkrátila a vzhledem k ostatním je tato hodnota statisticky nevýznamná.

4.3 Negativní geotaxe

Negativní geotaxi jsme testovali u zvířat ve věku P12, P15, P18 a P21. Ve věku P12, P18 a P21 podávala zvířata s různým množstvím podané látky srovnatelné výkony mezi 5,8-7,3 s. Signifikantní rozdíl jsme našli u zvířat ve věku P15, v tomto věku potřebovala zvířata kontrolní skupiny signifikantně delší čas pro vykonání úkolu než ve všech ostatních dnech, průměrně se otočila za 10,4 s. Zvířatům P15 s aplikací 3 mg/kg látky stačil čas kratší ve srovnání se zvířaty téže skupiny ve věku P21, na otočení jim stačilo průměrně 5,6 s.



Obrázek 19. Výsledky pokusu negativní geotaxe; vlastní zpracování

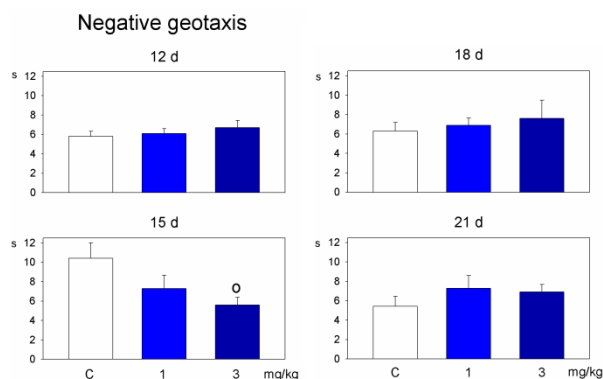
Graf znázorňuje výsledky pokusu negativní geotaxe.

Bílé grafy znázorňují zvířata kontrolní skupiny; světle modré grafy znázorňují zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; modré grafy znázorňují zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

Osa y popisuje čas, který zvířata potřebovala k vykonání úkolu, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru. Symboly značí signifikantní změny: # = rozdíl proti všem ostatním ve skupině, * = rozdíl P15 proti P21.

Porovnáním výsledků podle podané látky v daný den statisticky potvrdil rozdíl ve věku P15, kdy zvířatům s vyšší dávkou Ro 25-6981 stačil v porovnání s kontrolní skupinou významně kratší čas k vykonání úkolu.



Grafy ukazují čas zvířat potřebný pro zdolání negativní geotaxe dle množství podané látky v daný věk, věk je uveden nad každým dílčím grafem. Na ose x je popsáno množství aplikované látky, na ose y je popsán čas v sekundách. Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru. Symbol značí signifikantní změnu: O = rozdíl proti kontrolní skupině.

Obrázek 20. Čas zvířat potřebný pro zdolání negativní geotaxe; vlastní zpracování

	P12	P15	P18	P21
Co	5,8 ± 0,53	10,4 ± 1,59	6,3 ± 0,88	5,42 ± 1,02
1 mg/kg	6,1 ± 0,48	7,3 ± 1,36	6,9 ± 0,72	7,3 ± 1,3
3 mg/kg	6,7 ± 0,74	5,6 ± 0,72	7,6 ± 1,88	6,9 ± 0,78

Tabulka 8. Průměrný čas ± střední chyba (s) v testu negativní geotaxe ve věku P12, P15, P18, P21 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování

Subjektivní hodnocení

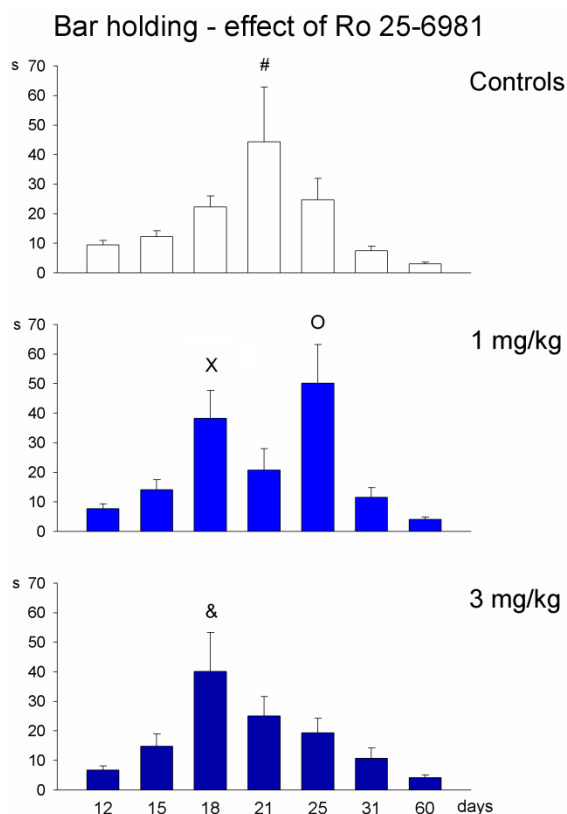
Ve věku P21 jsme nemohli vyhodnocovat výsledky 33% potkanů z kontrolní skupiny a ze skupiny se 3 mg/kg aplikované látky. V těchto případech se zvířata na plošině neotočila proti gravitaci, ale rovnou z ní seběhla dolů.

Na grafech vidíme minimální časový rozdíl mezi nejmladší a nejstarší skupinou potkanů, ačkoliv bychom očekávali zkracování času potřebného k otočení. Tento jev přičítáme tomu, že se zvířata po otevření očí s přibývajícím věkem více zajímají o okolí. Nakloněná rovina je neohrožuje, proto si mohou dovolit během otáčení hlavou nahoru více zkoumat prostředí okolo. S tím pravděpodobně souvisí i signifikantní rozdíly ve věku P15, kdy zvířata poprvé vidí. Antagonisté NMDA receptoru ovlivňují úzkost, což mohlo způsobit rychlejší reakce u skupiny se 3 mg/kg látky a znatelně pomalejší reakce u kontrolních zvířat.

4.4 Vis na hrazdě

Vis na hrazdě jsme testovali ve všech věkových kategoriích. V rámci každé skupiny se v průběhu vývoje potkana vyskytly signifikantní rozdíly. V kontrolní skupině byl statisticky významný vrchol v P21, kdy se potkani udrželi na hrazdě v průměru 44 s, rozdíl byl

významný proti věku P12, P15, P31 a P61. Skupina s 1 mg/kg látky měla dva statisticky významné vrcholy v P18 a P25, ve kterých potkani dosáhli v průměru 38 s a 50 s, tyto dva vrcholy se lišily bez statistické významnosti, rozdíly měly vůči všem ostatním testovacím dnům ve skupině. Skupina se 3 mg/kg látky byla statisticky významný vrchol ve věku P18, kdy byl průměrný čas 40 s, odchylku měl věku P12, P15, P25, P31 a P61.



Grafy ukazují průměrnou dobu, jakou se potkani byly schopni udržet zavěšení za horní končetiny na horizontální tyči.

Bílý graf znázorňuje zvířata kontrolní skupiny; světle modrý graf znázorňuje zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; modrý graf znázorňuje zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

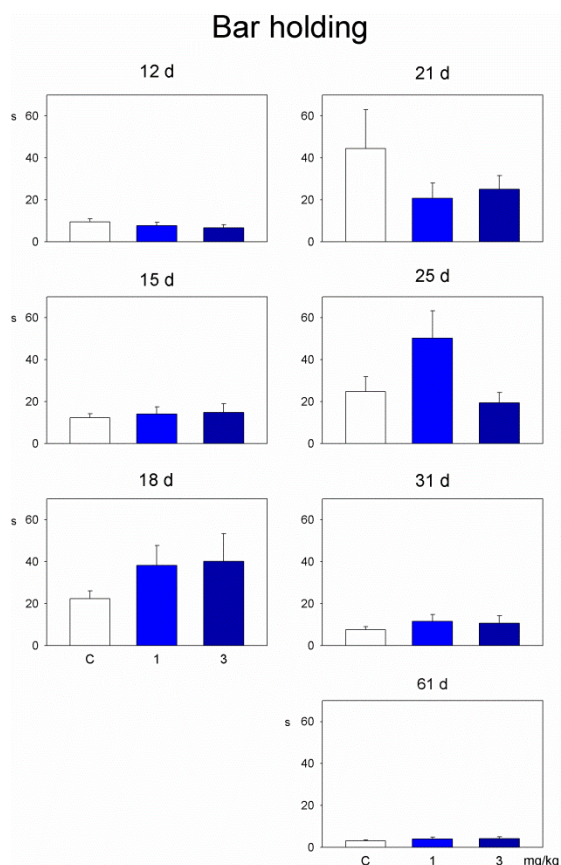
Osa y popisuje časový rozměr v sekundách, osa x popisuje věk zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P60).

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Symbole značí signifikantní rozdíly: # = rozdíl P21 proti P12, P15, P31 a P61, X = rozdíl P18 proti P12, P15, P21, P31 a P61, O = rozdíl P25 proti P12, P15, P21, P31 a P61, & = rozdíl P18 proti P12, P15, P25, P31 a P61.

Obrázek 21. Průměrná doba, jakou se potkani byly schopni udržet zavěšení za horní končetiny; vlastní zpracování

Statistické porovnání rozdílů podle množství podané látky v daném věku neukázalo u visu na hrazdě žádné signifikantní odchylky.



Grafy ukazují čas, po který se zvířata udržela na hrazdě, dle množství podané látky v daný věk, věk je uveden nad každým dílčím grafem.

Na ose x je popsáno množství aplikované látky, na ose y je popsán čas v sekundách.

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Obrázek 22. Čas, po který se zvířata udržela na hrazdě; vlastní zpracování

	P12	P15	P18	P21	P25	P31	P61
Co	9,5 ± 1,46	12,3 ± 1,99	22,3 ± 3,74	44,4 ± 18,56	24,8 ± 7,14	7,5 ± 1,47	3,1 ± 0,54
1 mg/kg	7,7 ± 1,59	14,1 ± 3,37	38,3 ± 9,41	20,8 ± 7,22	50,2 ± 13,07	11,5 ± 3,36	4,1 ± 0,75
3 mg/kg	6,7 ± 1,46	14,8 ± 4,18	40,1 ± 13,23	25,1 ± 6,49	19,4 ± 4,87	10,7 ± 3,52	4,2 ± 0,89

Tabulka 9. Průměrný čas ± střední chyba (s) v testu visu na hrazdě ve věku P12, P15, P18, P21, P25, P31 a P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování

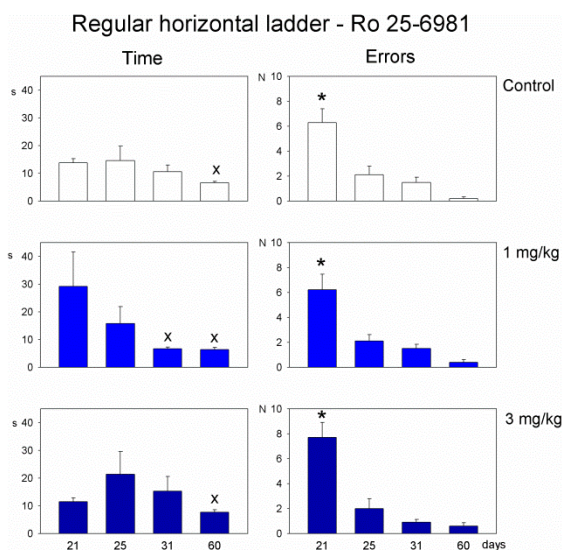
Subjektivní hodnocení

Původně jsme očekávali výkon zvířat úměrně stoupající s jejich věkem, ale z grafu můžeme pozorovat pokles výdrže po P21-P25. Přičítáme to zkušenostem, zlepšením prostorové orientace a samotným nárůstem velikosti. Hrazda byla upevněna vždy ve stejné výšce, ale jak zvíře rostlo, při zavěšení za přední končetiny se růstem ocas přibližoval k podložce, v P61 už docházelo u větších zvířat ke kontaktu špičky ocasu s podložkou. Potkaní si pravděpodobně již pamatovali opakující se situaci, kdy se jim po pádu z této tyče nic nestalo. Ve vyšším věku docházelo k řízeným seskokům, kterým předcházela pohled dolů a odhad situace. V P31 jsme pozorovali řízený seskok u 2 potkanů (6 %) ze skupiny 1 a 3 mg/kg aplikované látky a v P61 aktivně seskočilo 16 potkanů (53 %), kterých bylo 5 z kontrolní skupiny, 6 s 1 mg/kg látky a 5 se 3 mg/kg látky.

4.5 Pravidelný horizontální žebřík

Zvířata jsme na pravidelném žebříku testovali ve věku P21, P25, P31 a P61. Měřili jsme čas, za který žebřík zdolají, a počítali jsme počet chyb.

Doba potřebná k přeběhnutí žebříku se ve vývoji každé skupiny měnila, ve všech skupinách zvířata ve věku P61, ve skupině se 3 mg/kg látky i ve věku P31, přeběhla žebřík významně rychleji. Průměrně přeběhla žebřík za 6,4-7,7 sekundy, zatímco v mladším věku P21 potřebovala čas přibližně 4 krát delší. Statisticky významné rozdíly nalézáme v počtu chyb, kdy zvířata ve věku P21 udělala průměrně 6,2-7,7 chyb, při testování v P25 a dál se výrazně zlepšila na průměr 2-2,1 chyby.



Obrázek 23. Výsledky pokusu na žebříku s pravidelně uloženými příčkami; vlastní zpracování

Podle množství podané látky jsme našli proti kontrolní skupině signifikantní rozdíl ve věku P31, kdy zvířatům s aplikací 1 mg/kg látky stačil statisticky kratší čas k přeběhnutí žebříku, zatímco zvířata se 3 mg/kg látky udělala významně méně chyb.

Graf znázorňuje výsledky pokusu na žebříku s pravidelně uloženými příčkami.

Bílé grafy znázorňují zvířata kontrolní skupiny; světle modré grafy znázorňují zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; modré grafy znázorňují zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

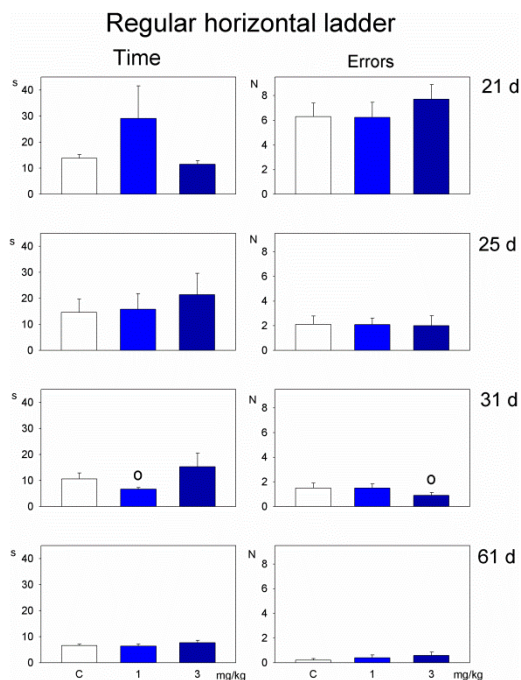
V levém sloupci grafy ukazují průměrný čas, který zvířata potřebovala ke zdolání překážky.

Osa y popisuje časový rozměr v sekundách, osa x popisuje věk zvířat (P21, P25, P31, P60).

Pravý sloupec ukazuje průměrný počet chyb, které při tom zvířata udělala.

Na ose y je počet vykonaných chyb, osa x popisuje věk zvířat.

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru. Symboly značí signifikantní změny: X = rozdíl proti P21, * = proti všem.



Obrázek 24. Čas zvířat potřebný pro zdolání pravidelného žebříku; vlastní zpracování

Grafy ukazují čas zvířat potřebný pro zdolání pravidelného žebříku (levý sloupec) a množství chyb (pravý sloupec) dle množství podané látky v daný věk, věk je uveden vpravo.

Na ose x je popsáno množství aplikované látky, na ose y je popsán čas v sekundách.

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Symbole značí signifikantní změny: O = proti kontrolní skupině.

Čas(s)	P21	P25	P31	P61
Co	13,8 ± 1,46	14,6 ± 5,13	10,6 ± 2,34	6,6 ± 0,51
1 mg/kg	29,1 ± 12,47	15,8 ± 6,06	6,6 ± 0,64	6,4 ± 0,8
3 mg/kg	11,5 ± 1,38	21,3 ± 8,23	15,3 ± 5,24	7,7 ± 0,93
chyby	P21	P25	P31	P61
Co	6,3 ± 1,1	2,1 ± 0,67	1,5 ± 0,4	0,2 ± 0,13
1 mg/kg	6,2 ± 1,24	2,1 ± 0,52	1,5 ± 0,34	0,4 ± 0,22
3 mg/kg	7,7 ± 1,19	2 ± 0,8	0,9 ± 0,23	0,6 ± 0,26

Tabulka 10. Průměrný čas a chyby ± střední chyba v testu pravidelného žebříku ve věku P21, P25, P31 a P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou. V první části je popsán čas, v druhé části tabulky počet chyb; vlastní zpracování

Subjektivní hodnocení

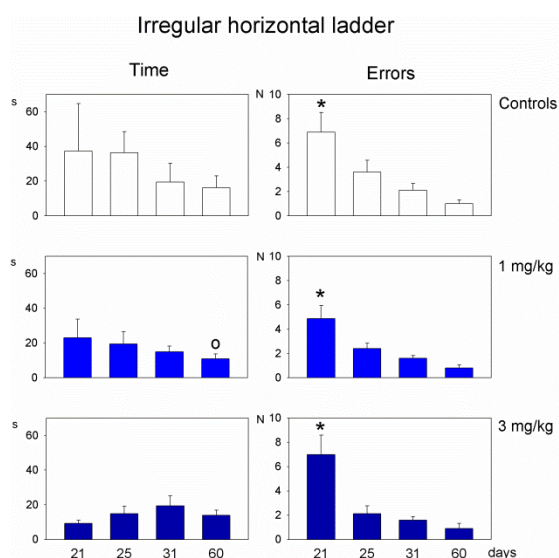
Všechna zvířata se lepšila s věkem, v čase není signifikantní rozdíl, velký pokrok ale pozorujeme v eliminaci chyb bez ohledu na množství podané látky. Velký počet chyb v P21 přisuzujeme nové motorické dovednosti a situaci, do které bylo zvíře bez přípravy uvedeno.

Průměrný čas je hlavně v prvních dvou testování ve věku P21 a P25 ovlivněn dvěma faktory: úniky potkanů ze žebříku a nezdoláním žebříku v určeném čase. Ve věku P21 byla zvířata malá a ve snaze rychle uniknout z nové situace se některým podařilo protáhnout se mezi příčkami v průběhu trasy. Uniknout se podařilo 7 potkanům (23 %), 2 byli z kontrolní skupiny, 2 s 1 mg/kg látky a 3 se 3 mg/kg látky. Nezdolání žebříku se často pojilo i přes naši snahu s otočením potkana do protisměru, snahou uniknout jinudy nebo ztrátou motivace. Ve věku P21 nedošlo do cíle a zůstalo v dráze 5 zvířat (17 %), 2 kontrolní zvířata, 2 s 1 mg/kg

látky a 1 se 3 mg/kg látky, ve věku P25 nedošla 4 zvířata (13 %), 2 potkani z kontrolní skupiny, 1 s 1 mg/kg látky a 1 se 3 mg/kg látky. Ve věku P31 nedošel jen jeden potkan ze skupiny s aplikací 1mg/kg látky.

4.6 Nepravidelný horizontální žebřík

Zvířata, která jsme testovali na pravidelném žebříku, byla v zápětí testována i na nepravidelném žebříku. Čas potřebný ke zdolání žebříku je ve vývoji i v porovnání mezi skupinami statisticky odlišný ve skupině s 1 mg/kg látky, kdy nejstarším zvířatům stačil v porovnání s nejmladšími kratší čas. Statisticky významný rozdíl je v počtu přešlapů, které zvířata udělala. V kontrolní skupině je signifikantní rozdíl ve věku P21 vzhledem k P31 a P60, ve skupinách s aplikací látky je významný rozdíl věku P21 k P25, P31 a P60, kdy zvířata udělala v prvním dnu téměř dvojnásobné množství chyb.



Obrázek 25. Výsledky pokusu na žebříku s nepravidelně uloženými příčkami; vlastní zpracování

U nepravidelného žebříku se na rozdíl od pravidelného ukázaly statisticky významné rozdíly ve věku P25. Ve srovnání s kontrolní skupinou v tomto věku potkani s aplikací 3 mg/kg látky přebíhali žebřík rychleji a potkani s aplikací 1 mg/kg látky udělali méně chyb.

Graf znázorňuje výsledky pokusu na žebříku s nepravidelně uloženými příčkami.

Bílé grafy znázorňují zvířata kontrolní skupiny; světle modré grafy znázorňují zvířata, kterým byl aplikován 1 mg/kg látky Ro 25-6981; modré grafy znázorňují zvířata, kterým byly aplikovány 3 mg/kg látky Ro 25-6981.

V levém sloupci grafy ukazují průměrný čas, který zvířata potřebovala ke zdolání překážky.

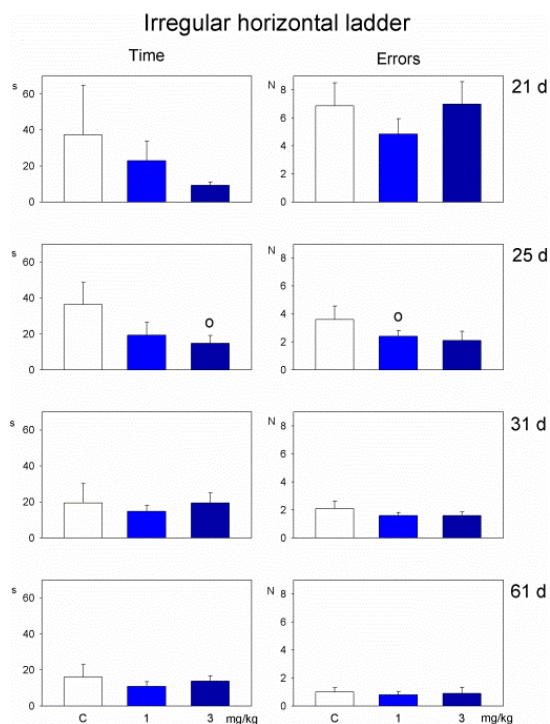
Osa y popisuje časový rozměr v sekundách, osa x popisuje věk zvířat (P21, P25, P31, P60).

Pravý sloupec ukazuje průměrný počet chyb, které při tom zvířata udělala.

Na ose y je počet vykonaných chyb, osa x popisuje věk zvířat.

Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru.

Symbole značí signifikantní změny: O = rozdíl P61 proti P21, * = rozdíl P21 proti všem.



Obrázek 26. Čas zvířat potřebný pro zdolání nepravidelného žebříku a počet chyb; vlastní zpracování

Grafy ukazují čas zvířat potřebný pro zdolání nepravidelného žebříku (levý sloupec) a množství chyb (pravý sloupec) dle množství podané látky v daný věk, věk je uveden vpravo. Na ose x je popsáno množství aplikované látky, na ose y je popsán čas v sekundách. Nad každým sloupcem je znázorněna střední chyba průměru. Symboly značí signifikantní změny: O = proti kontrolní skupině

čas (s)	P21	P25	P31	P61
Co	37,3 ± 27,4	36,3 ± 12,1	19,4 ± 10,8	16,1 ± 6,9
1 mg/kg	23 ± 10,7	19,4 ± 7,1	14,8 ± 3,3	10,9 ± 2,6
3 mg/kg	9,3 ± 1,8	14,8 ± 4,5	19,4 ± 5,6	13,9 ± 2,9
chyby	P21	P25	P31	P61
Co	6,8 ± 1,6	3,6 ± 1	2,1 ± 0,5	1 ± 0,3
1 mg/kg	4,8 ± 1,1	2,4 ± 0,4	1,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2
3 mg/kg	7 ± 1,5	2,1 ± 0,6	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,4

Tabulka 11. Průměrný čas a chyby ± střední chyba v testu nepravidelného žebříku ve věku P21, P25, P31 a P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou. V první části je popsán čas, v druhé části tabulky počet chyb; vlastní zpracování

Subjektivní hodnocení

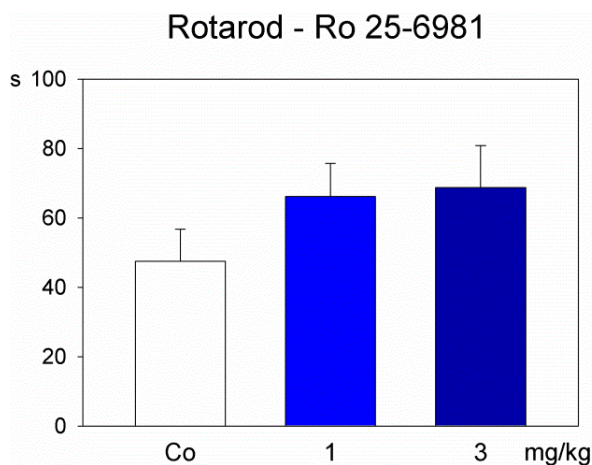
U nepravidelného žebříku jsme očekávali mnohem větší rozdíly v čase i v chybách proti testu pravidelného žebříku. Podobné výsledky přisuzujeme tomu, že nepravidelný žebřík byl testován ihned po pravidelném, tudíž byla zvířata více orientována, měla se situací již zkušenost a lépe se adaptovala na prostředí.

U nepravidelného žebříku jsme se potýkali s podobným chováním potkanů tzn. s útekem mezi příčkami i s nezdoláním trasy. Ve věku P21 z trasy uniklo 8 potkanů (27 %), 3 z kontrolní skupiny a, 2 s aplikací 1 mg/kg látky 3 s aplikací 3 mg/kg látky. Do cíle nedošlo 9 potkanů (30 %), 2 z kontrolní skupiny, 3 s aplikací 1 mg/kg látky a 4 se 3 mg/kg látky. Ve

věku P25 unikl z trasy jen jeden potkan s aplikací 3 mg/kg látky a nedošli 2 potkani (6 %), 1 z kontrolní skupiny a 1 ze skupiny se 3 mg/kg látky. K únikům došlo vždy u těch potkanů, kterým se podařilo uniknout i z pravidelného žebříku. Nárůst počtu potkanů, kteří nedošli (17 % na pravidelném žebříku, 30 % ne nepravidelném žebříku), způsobil pravděpodobně strach, protože většina jich skončila v první třetině trasy, po které následovala v příčkách první ze dvou největších mezer (4 cm, nejmenší rozestup 1 cm).

4.7 Rotarod

Test rotarodu jsme používali pouze u nejstarších zvířat ve věku P61, test byl omezen na 120 s. Ve výsledcích nejsou mezi skupinami žádné signifikantní rozdíly.



Obrázek 27. Výsledky pokusu potkanů P61 na rotarodu; vlastní zpracování

Subjektivní hodnocení

Test v maximálním časovém rozsahu dokončilo 5 zvířat (16 %), jedno z kontrolní skupiny, 2 s aplikací 1 mg/kg látky 2 s aplikací 3 mg/kg látky. Výhodou tohoto testu bylo to, že se neopakoval a zvířata nebyla ovlivněna předchozí zkušeností, pravděpodobně by zjistila, že pád z válce není bolestivý a neměla by motivaci udržet se na válci co nejdelší dobu.

4.8 Testování hypotéz

Hypotéza 1

H0 byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám motoriky ve vývojových stupních ve všech skupinách.

HA se potvrdila.

Hypotéza 2

H0 byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám motoriky závisících na dávce opakovaně podávané látky.

HA se potvrdila.

Hypotéza 3

H0 byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám motoriky přetrvávající do rané dospělosti po opakovaném podání látky.

HA se potvrdila.

5 DISKUZE

Výsledky ukazují, že látka Ro 25-6981 nemá výrazné nežádoucí účinky. Z hlediska motorického vývoje jsme nenašli ve skupinách žádné výrazné změny v tendencích růstu či poklesu motoriky vzhledem k tendenci kontrolní skupiny. Změny probíhaly plynule a nelišily se více než o jeden testovací věkový stupeň.

Při porovnání potkanů v jednotlivých dnech podle množství aplikované látky bylo bez signifikantních rozdílů 6 motorických testů z 10 (včetně open-fieldu). Bez rozdílu byla v open-fieldu uběhnutá vzdálenost, doba pobytu v centru a rychlost. Ze cvičení vyšel bez odchylek test vzpřimování, vis na hrazdě a rotarod. Přítomné signifikantní změny nebyly typické pro věk ani dávku aplikované látky, nacházely se v testech:

- frekvence návštěv centra – lišila se ve věku P31 u zvířat s 1 i 3 mg/kg látky a u zvířat s 1 mg/kg látky ve věku P61,
- negativní geotaxe – zvířata ve věku P15 se 3 mg/kg látky měla kratší čas,
- pravidelný žebřík – ve věku P31 měla zvířata s 1 ml/kg látky kratší čas a se 3 ml/kg látky měla méně chyb,
- nepravidelný žebřík – ve věku P31 měla zvířata se 3 ml/kg látky kratší čas a se 1 ml/kg látky měla méně chyb.

Změny přetrvávající do dospělosti byly přítomny jen v jednom z testů. Ve věku P61 vyšla pozitivně frekvence návštěv centra open fieldu u zvířat s aplikací 1 ml/kg látky, která byla signifikantně větší. Rozdíl mohl být způsoben i anxiolytickým účinkem, který antagonisté NMDA receptoru mají, v tom případě by nárůst nebyl fatální změnou a hodnotili bychom ho jako pozitivní vedlejší efekt látky. Stejně můžeme jako pozitivní hodnotit i zkrácení časů v testu negativní geotaxe a obou žebříků.

Látka Ro 25-6981 je v raném postnatálním období testována jako potenciální antikonvulzivum. Prokázán byl čistý antiepileptický účinek této látky u potkanů ve věku P12, v dalších postnatálních dnech P15 a P18 byl výraznější účinek ifenprodilu. Jev, který nemůžeme úplně vysvětlit, byl ve věku P25, kdy 1 mg/kg látky působil na zvířata více než 3 mg/kg látky (Szczurowska a Mareš, 2015). V našem výzkumu jsme tento fenomén nepozorovali. Pravděpodobně je způsoben změnou kompozice a lokalizace podjednotek. Do vývoje motoriky může zasahovat i vliv zrání ostatních receptorových systémů. Interakce mezi

systemy ještě nejsou prozkoumány, ale příkladem může být souvislost NMDA, dopaminových a nikotinových receptorů v nucleus accumbens dospělých jedinců (Liu et al., 2014; Kosowski, 2004).

Ke změnám NMDA podjednotek dochází i dále během puberty, jak uvádí Inta et al. (2016) ve své studii, kde porovnává působení látek (MK-801, Ro 25-6981) v období mezi P16 a P40. Zajímavé jsou v této studii uvedené rozdíly ve vývoji mezi pohlavími, protože většina prací pro tento věk je realizována na jednom pohlaví (samci). Bylo zjištěno, že určité změny, které se dají pozorovat v období puberty, nastupují u samic dříve než u samců. Studie byla zaměřena na hippocampus a kortikální oblasti (Inta et al., 2016). Ke změnám kompozice NR2b podjednotky dochází v tomto období např. v auditorním, vizuálním, somatosenzorickém cortexu (Hogsden a Dringenberg, 2006) i v jiných částech mozku.

V dospělém věku je pro Ro 25-6981 mnohem více studií. Studie, které zkoumaly mimo jiné i vliv látky na lokomoci neuvádějí zvýšení lokomoce po podání (Boyce et al., 2009; Haller et al., 2011; Lima-Ojeda et al., 2013; Fantin et al., 2013). Narušení motorické koordinace na rotarodu u potkanů se projevilo až s nejvyšší použitou dávkou 100 mg/kg (Boyce et al., 1999). Signifikantní odchylky v motorickém projevu byly přítomny až při srovnání s vyššími dávkami látky (1-30 mg/kg). Látka Ro 25-6981 neměla vliv na prostorovou a pracovní paměť (Higgins et al., 2003).

Látka funkčně nejpodobnější Ro 25-6981 je ifenprodil (1-piperidineetanol, α -(4-hydroxyphenyl)- β -metyl-4-(phenylmetyl)). Ifenprodil je specifický antagonist NR1/NR2b receptoru (Brittain et al. 2012). Po jednorázovém podání se zvyšuje lokomoce ve věku P12, v P18 už výrazný motorický vedlejší efekt není (Mareš a Mikulecká, 2009). V období adolescence byl zaznamenán po aplikaci pokles motorické aktivity, ale jen v souvislosti s facilitací sociálního chování, nikoliv s ovlivněním motorického systému (Morales et al., 2013; Morales et Spear, 2014).

Vedlejší účinek hyperlokomoce byl prokázán u nekompetitivních antagonistů NMDA kanálu (MK-801, ketamin) u dospělých jedinců (Irifune et al., 1995) i v raném postnatálním období (Pinar et al., 2015; Lecointre et al., 2015). Hyperlokomoce po aplikaci v časném neonatálním období navíc přetrvávala až do dospělosti (Lecointre et al., 2015). Mezi další důsledky aplikace nespecifických antagonistů patří např. stereotypní pohyby, narušení sociálních interakcí nebo poruchy paměti.

Měnící se obraz motorického vývoje je dán i zráním mozku, které probíhá posteroanteriorně, což souvisí se změnou generátoru pohybu. Výjimkou v anteroposteriorním zrání je cerebellum, které dozrává zároveň s neokortexem. Dle Llansoly (2005) se cerebellum liší i ve vývoji a působení NMDA receptorů. NMDA receptory se vyskytují hlavně na přenosu potenciálu do granulárních buněk a v raném vývoji do buněk Purkyňových. NMDA receptory v mozečku se od NMDA v ostatních oblastech mozku odlišují farmakologickou odpovědí. Agonisté mají větší afinitu ke glutamátovým vazebným místům, antagonisté mají naopak afinitu nižší než je tomu v jiných částech mozku (Llansola, 2005). Menší senzitivita NMDA receptorů může být dána tím, že postnatálně je v mozečku největší množství NR2b podjednotek v granulárních buňkách, ty jsou během prvního postnatálního týdne nahrazeny NR2c podjednotkami (Low a Wee, 2010).

Naše studie ukazuje, že látka Ro 25-6981 nemá žádné závažné vedlejší účinky na hrubou motoriku potkana. Látku je dále vhodné zkoumat pro významné antikonvulzivní účinky v raném postnatálním věku. Další výzkum by se měl zaměřit na změny jemné motoriky a možné ovlivnění učení a paměti během vývoje.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit vliv opakovaného podávání specifického antagonisty NMDA receptoru obsahující NR2b podjednotku na vývoj motoriky laboratorního potkana.

V teoretické části práce jsme shrnuli dosavadní poznatky o NMDA receptorech, čerpali jsme hlavně z experimentálních prací publikovaných v odborné literatuře, mezi další zdroje patřily rešeršní práce a odborné knihy. Dále jsme v této části práce popsali laboratorního potkana se zaměřením na vývoj motoriky, jejíž znalost je nezbytná pro vyhodnocení motorických testů.

V praktické části jsme se věnovali vlivu opakovaného podání Ro 25-6981 na vývoj spontánní lokomoce a motorické schopnosti. Testovali jsme 30 zvířat, která byla rozdělena do 3 skupin: skupina kontrolní, skupina s aplikací 1 mg/kg látky a s aplikací 3 mg/kg látky. Látka byla zvířatům aplikována opakovaně od 7. do 11. postnatálního dne, od 12. dne byla zvířata testována baterií testů příslušných vždy jejich věku až do období rané dospělosti. Při vyhodnocování jsme sledovali vývoj motoriky potkanů v jednotlivých skupinách, rozdílů v jednom věku dle množství aplikované látky a rozdílů motoriky přetrvávající do rané dospělosti. Testování ukázalo, že látka nemá významný vliv na hrubou motoriku laboratorního potkana. Mechanismus jejího účinku by se mohl stát základem pro věkově vázaná antiepileptika.

LITERATURA

BOYCE, S., A. WYATT a J. K. WEBB. 1999. Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology*. **38**(5), 611-623. DOI: 10.1016/S0028-3908(98)00218-4. ISSN 00283908.

BOZIC, M. a J. M. VALDIVIELSO. 2014. The potential of targeting NMDA receptors outside the CNS. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. **19**(3), 399-413. DOI: 10.1517/14728222.2014.983900. ISSN 14728222.

BRITTAİN, M. K., T. BRUSTOVETSKY, J. M. BRITTAİN, R. KHANNA, T. R. CUMMINS a N. BRUSTOVETSKY. 2012. Ifenprodil, a NR2B-selective antagonist of NMDA receptor, inhibits reverse Na⁺/Ca²⁺ exchanger in neurons. *Neuropharmacology*. **63**(6), 974-982. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.012. ISSN 00283908.

BROCARD, F., L. VINAY a F. CLARAC. 1999. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Developmental Brain Research*. **117**(1), 81-89. DOI: 10.1016/S0165-3806(99)00101-7. ISSN 01653806.

BROOKS, S. P. a S. B. DUNNETT. 2009-6-10. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience*. **10**(7), 519-529. DOI: 10.1038/nrn2652. ISSN 1471003x.

CELSE CONSTANTINO, L. 2014. The Role of NMDA Receptors in the Development of Brain Resistance through Pre- and Postconditioning. *Aging and disease*. **5**(6), 430-441. DOI: 10.14336/AD.2014.0500430. ISSN 21525250.

CLARAC, F., L. VINAY, J.-R. CAZALETS, J.-C. FADY a M. JAMON. 1998. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews*. **28**(1-2), 35-43. DOI: 10.1016/S0165-0173(98)00024-1. ISSN 01650173.

CUMMINGS, B., C. ENGESSERCESAR, G. CADENA a A. ANDERSON. 2007. Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behavioural Brain Research*. **177**(2), 232-241. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.11.042. ISSN 01664328.

DONALDSON, HH. The Relation of Myelin to the Loss of Water in the Mammalian Nervous System with Advancing Age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1916 Jul; **2**(7):350-356.

FANTIN, M., M. MARTI, Y. P. AUBERSON a M. MORARI. 2007. NR2A and NR2B subunit containing NMDA receptors differentially regulate striatal output pathways. *Journal of Neurochemistry*. **103**(6): 2200-2211. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04966.x. ISSN 00223042.

FANTIN, M., M. MORARI, F. TISON a P.-O. FERNAGUT. 2013. NR2B subunit blockade does not affect motor symptoms induced by 3-nitropropionic acid. *Neurological Research*. **33**(4), 444-447. DOI: 10.1179/1743132810Y.0000000002. ISSN 01616412.

FEDDER, K. a S. SABO. 2015. On the Role of Glutamate in Presynaptic Development: Possible Contributions of Presynaptic NMDA Receptors. *Biomolecules*. **5**(4), 3448-3466. DOI: 10.3390/biom5043448. ISSN 2218273x.

FISCHER, G. 1997. Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **283**(3), 1285-92. ISSN 00223565.

FIŠAR, Z. 2009. *Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. 2.*, přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 383 s. Psyché (Grada). ISBN 9788024727370.

FLORES-SOTO, M. E., V. CHAPARRO-HUERTA, M. ESCOTO-DELGADILLO, E. VAZQUEZ-VALLS, R.E. GONZÁLEZ-CASTAÑEDA a C. BEAS-ZARATE. 2012. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología*. **27**(5): 301-310. DOI: 10.1016/j.nrl.2011.10.014. ISSN 02134853.

FUKAYA, M., Y. HAYASHI a M. WATANABE. 2005. NR2 to NR3B subunit switchover of NMDA receptors in early postnatal motoneurons. *European Journal of Neuroscience*. **21**(5): 1432-1436. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03957.x. ISSN 0953816x.

GANONG, W. F. 2005. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd. Praha: Galén, xx, 890 s. ISBN 8072623117.

GATES, H., A.-M. MALLON a D.M. BROWN. 2011. High-throughput mouse phenotyping. *Methods*. **53**(4), 394-404. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.12.017. ISSN 10462023.

GEISLER, H. C. Development of posture in the rat. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* . 1993, 53 (4), 517-523.

GRAMSBERGEN, A., H. C. GEISLER, H. TAEKEMA a L. A. VAN EYKERN. 1999. The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. *Developmental Brain Research*. **112**(2), 217-228. DOI: 10.1016/S0165-3806(98)00184-9. ISSN 01653806.

GULI, X., T. TOKAY, T. KIRSCHSTEIN a R. KÖHLING. 2016. Status Epilepticus Enhances Depotentiation after Fully Established LTP in an NMDAR-Dependent but GluN2B-Independent Manner. *Neural Plasticity*. **2016**, 1-10. DOI: 10.1155/2016/6592038. ISSN 20905904.

HABERNY, K. A. Ontogeny of the N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor System and Susceptibility to Neurotoxicity. *Toxicological Sciences*. **68**(1): 9-17. DOI: 10.1093/toxsci/68.1.9. ISSN 10960929.

HALLER, J., R. NAGY, M. TOTH, K. G. PELCZER a E. MIKICS. 2011. NR2B subunit-specific NMDA antagonist Ro25-6981 inhibits the expression of conditioned fear. *Behavioural Pharmacology*. **22**(2), 113-121. DOI: 10.1097/FBP.0b013e328343d7b2. ISSN 09558810.

HIGGINS, G.A., T.M. BALLARD, J. HUWYLER, J. A. KEMP a R. GILL. 2003. Evaluation of the NR2B-selective NMDA receptor antagonist Ro 63-1908 on rodent behaviour: evidence for an involvement of NR2B NMDA receptors in response inhibition. *Neuropharmacology*. **44**(3), 324-341. DOI: 10.1016/S0028-3908(02)00402-1. ISSN 00283908.

HOGSDEN, J. L. a H. C. DRINGENBERG. 2009. Decline of long-term potentiation (LTP) in the rat auditory cortex in vivo during postnatal life: Involvement of NR2B subunits. *Brain Research*. **1283**, 25-33. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.06.001. ISSN 00068993.

INTA, I., E. DOMONKOS, N. PFEIFFER, R. SPRENGEL, M. BETTENDORF, U. E. LANG, D. INTA a P. GASS. 2016. Puberty marks major changes in the hippocampal and cortical c-Fos activation pattern induced by NMDA receptor antagonists. *Neuropharmacology*. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.03.023. ISSN 00283908.

IRIFUNE, M., T. SHIMIZU, M. NOMOTO a T. FUKUDA. 1995. Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **51**(2-3), 291-296. DOI: 10.1016/0091-3057(94)00379-W. ISSN 00913057.

KARL, T., R. PABST a S. VON HÖRSTEN. 2003. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Experimental and Toxicologic Pathology*. **55**(1), 69-83. DOI: 10.1078/0940-2993-00301. ISSN 09402993.

KOSOWSKI, A. R. 2004. The NR2B-Selective N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonist Ro 25-6981 [()-(R*,S*)- -(4-Hydroxyphenyl)- -methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidine Propanol] Potentiates the Effect of Nicotine on Locomotor Activity and Dopamine Release in the Nucleus Accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **311**(2), 560-567. DOI: 10.1124/jpet.104.070235. ISSN 00223565.

KRINKE, G. J. c2000. *Laboratory rat*. 1st ed. San Diego: Academic Press. Handbook of experimental animals. ISBN 01-242-6400-X.

LECOINTRE, M., C. VÉZIER, M. BÉNARD, et al. 2015. Age-dependent alterations of the NMDA receptor developmental profile and adult behavior in postnatally ketamine-treated mice. *Developmental Neurobiology*. **75**(3), 315-333. DOI: 10.1002/dneu.22232. ISSN 19328451.

LELARD, T., M. JAMON, J.-P. GASC, P.-P. VIDAL. 2006. Postural development in rats. *Experimental neurology*. **202**(1), 112-124. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.05.018. ISSN 00144886.

LIMA-OJEDA, J. M., M. A. VOGT, N. PFEIFFER, Ch. DORMANN, G. KÖHR, R. SPRENGEL, P. GASS a D. INTA. 2013. Pharmacological blockade of GluN2B-containing NMDA receptors induces antidepressant-like effects lacking psychotomimetic action and neurotoxicity in the perinatal and adult rodent brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. **45**, 28-33. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.04.017. ISSN 02785846.

LIU, X.-S., Y. HOU, T.-L. YAN, Y.-Y. GUO, W. HAN, F.-L. GUAN, T. CHEN a T. LI. 2014. Dopamine D3 Receptor-Regulated NR2B Subunits of N -Methyl- d -Aspartate Receptors in the Nucleus Accumbens Involves in Morphine-Induced Locomotor Activity. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. **20**(9), 823-829. DOI: 10.1111/cns.12276. ISSN 17555930.

LLANSOLA, M. 2005. Modulation of NMDA receptors in the cerebellum. 1. Properties of the NMDA receptor that modulate its function. *The Cerebellum*. **4**(3), 154-161. DOI: 10.1080/14734220510007996. ISSN 14734222.

LOW, C.-M. a K. S.-L. WEE. 2010. New Insights into the Not-So-New NR3 Subunits of N-Methyl-D-aspartate Receptor: Localization, Structure, and Function. *Molecular Pharmacology*. **78**(1): 1-11. DOI: 10.1124/mol.110.064006. ISSN 0026895x.

LYNCH, D. R., S. S. SHIM, K. M. SEIFERT, S. KURAPATHI, V. MUTEL, M. J. GALLAGHER a R. P. GUTTMANN. 2001. Pharmacological characterization of interactions of RO 25-6981 with the NR2B (ϵ 2) subunit. *European Journal of Pharmacology*. **416**(3), 185-195. DOI: 10.1016/S0014-2999(01)00868-8. ISSN 00142999.

MAREŠ, P. a A. MIKULECKÁ. 2009. Different effects of two N-methyl-d-aspartate receptor antagonists on seizures, spontaneous behavior, and motor performance in immature rats. *Epilepsy & Behavior*. **14**(1), 32-39. DOI: 10.1016/j.yebeh.2008.08.013. ISSN 15255050.

- MCCUTCHEON, J. E. a M. MARINELLI. 2009. Age matters. *European Journal of Neuroscience*. **29**(5), 997-1014. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06648.x. ISSN 0953816x.
- MILLER, O. H., L. YANG, Ch.-Ch. WANG, E. A. HARGRODER, Y. ZHANG, E. DELPIRE a B. J. HALL. 2014. GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *ELife*. **3**. DOI: 10.7554/eLife.03581. ISSN 2050084x.
- MORALES, M., E. I. VARLINSKAYA a L. P. SPEAR. 2013. Low doses of the NMDA receptor antagonists, MK-801, PEAQX, and ifenprodil, induces social facilitation in adolescent male rats. *Behavioural Brain Research*. **250**, 18-22. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.04.050. ISSN 01664328.
- MORALES, M. a L. P. SPEAR. 2014. The effects of an acute challenge with the NMDA receptor antagonists, MK-801, PEAQX, and ifenprodil, on social inhibition in adolescent and adult male rats. *Psychopharmacology*. **231**(8), 1797-1807. DOI: 10.1007/s00213-013-3278-3. ISSN 00333158.
- MOTHET, J.-P., M. LE BAIL a J.-M. BILLARD. 2015. Time and space profiling of NMDA receptor co-agonist functions. *Journal of Neurochemistry*. **135**(2), 210-225. DOI: 10.1111/jnc.13204. ISSN 00223042.
- MUIR, G. D. 2000. Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. *Brain Research Bulletin*. **53**(5), 719-726 . DOI: 10.1016/S0361-9230(00)00404-4. ISSN 03619230.
- PAOLETTI, P., C. BELLONE a Q. ZHOU. 2013-5-20. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. **14**(6): 383-400. DOI: 10.1038/nrn3504. ISSN 1471003x.
- PINAR, N., K. AKILLIOGLU, F. SEFIL, H. ALP, M. SAGIR a A. ACET. 2015. Effect of clozapine on locomotor activity and anxiety-related behavior in the neonatal mice administered MK-801. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. **15**(3). DOI: 10.17305/bjbms.2015.472. ISSN 1840-4812.
- PUNKT, K., A. NAUPERT a G. ASMUSSEN. 2004. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. *Acta Histochemica*. **106**(2), 145-154. DOI: 10.1016/j.acthis.2003.11.005. ISSN 00651281.
- RAMIREZ, R. L. a L. P. SPEAR. 2010. Ontogeny of ethanol-induced motor impairment following acute ethanol: Assessment via the negative geotaxis reflex in adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. **95**(2), 242-248. DOI: 10.1016/j.pbb.2010.01.013. ISSN 00913057.
- REGAN, M. C., A. ROMERO-HERNANDEZ a H. FURUKAWA. 2015. A structural biology perspective on NMDA receptor pharmacology and function. *Current Opinion in Structural Biology*. **33**, 68-75. DOI: 10.1016/j.sbi.2015.07.012. ISSN 0959440x.
- SANCHES, E. F., N. S. ARTENI, Ch. SPINDLER, F. MOYSÉS, I. R. SIQUEIRA, M. L. PERRY a C. A. NETTO. 2012. Effects of pre- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Research* . **1438**, 85-92. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.12.024. ISSN 00068993.
- SANZ-CLEMENTE, A., R. A. NICOLL a K. W. ROCHE. 2012. Diversity in NMDA Receptor Composition: Many Regulators, Many Consequences. *The Neuroscientist*. **19**(1): 62-75 . DOI: 10.1177/1073858411435129. ISSN 10738584.
- SHRINER, A., F. R. DREVER, G. A. METZ. 2009. The development of skilled walking in the rat. *Behavioural brain research*. **205**(2), 426-435. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.07.029. ISSN 01664328.

STEPHENSON A., F., S. L. COUSINS a A. V. KENNY. 2008. Assembly and forward trafficking of NMDA receptors (Review). *Molecular Membrane Biology*. **25**(4): 311-320. DOI: 10.1080/09687680801971367. ISSN 09687688.

STRONG, K. L., Y. JING, A. R. PROSSER, S. F. TRAYNELIS a D. C. LIOTTA. 2014. NMDA receptor modulators: an updated patent review (2013 – 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **24**(12), 1349-1366. DOI: 10.1517/13543776.2014.972938. ISSN 13543776.

SZCZUROWSKA, E. a P. MAREŠ. 2015. Different action of a specific NR2B/NMDA antagonist Ro 25-6981 on cortical evoked potentials and epileptic afterdischarges in immature rats. *Brain Research Bulletin*. **111**, 1-8. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2014.11.001. ISSN 03619230.

Tocris Bioscience: Ro 25-6981 maleate, Cat. No. 1594. Dostupné z: <https://www.tocris.com/disprod.php?ItemId=53008#.VxuH5fmLTIX>

VYKLIČKY, V, M. KORINEK, T. SMEJKALOVA, A. BALIK, B. KRAUSOVA, M. KANIAKOVÁ, K. LICHNEROVA, J. CERNY, J. KRUSEK, I. DITTERT, M. HORAK a L. VYKLIČKY. 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiological Research*. 63 Suppl 1, S191-S203. ISSN 08628408.

WENZEL, A., J. M. FRITSCHY, H. MOHLER, D. BENKE. 1997. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem* 68: 469-478.

ZHANG, X., Q. ZHANG, J. TU, Y. ZHU, F. YANG, B. LIU, D. BRANN a R. WANG. 2015. Prosurvival NMDA 2A receptor signaling mediates postconditioning neuroprotection in the hippocampus. *Hippocampus*. **25**(3), 286-296. DOI: 10.1002/hipo.22372. ISSN 10509631.

ZHUO, M. 2009. Plasticity of NMDA receptor NR2B subunit in memory and chronic pain. *Molecular Brain*. **2**(1): 4. DOI: 10.1186/1756-6606-2-4. ISSN 17566606.

ZHOU, Q., D. D. PRICE, R. M. CAUDLE a G. N. VERNE. 2009. Spinal NMDA NR1 subunit expression following transient TNBS colitis. *Brain Research*. 2015-11-24, 1279: 109-120. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.04.038. ISSN 00068993.

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Výskyt jednotlivých podjednotek v orgánech mimo CNS; Bozic a Valdivielso, 2014	18
Tabulka 2. Patologické stavy ve vztahu s NMDA receptory; vlastní zpracování	20
Tabulka 3. Sady testů použité pro daný věk; vlastní zpracování	31
Tabulka 4. Průměrná vzdálenost \pm střední chyba (s) v open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování	36
Tabulka 5. Průměrná čas \pm střední chyba (s) strávený v centrálním poli open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování	37
Tabulka 6. Průměrná frekvence \pm střední chyba (s) výskytu v centrálním poli open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování	39
Tabulka 7. Průměrná rychlost \pm střední chyba (s) pohybu v open fieldu ve věku P12, P15, P18, P21, P31, P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování	41
Tabulka 8. Průměrný čas \pm střední chyba (s) v testu negativní geotaxe ve věku P12, P15, P18, P21 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování	43
Tabulka 9. Průměrný čas \pm střední chyba (s) v testu visu na hrazdě ve věku P12, P15, P18, P21, P25, P31 a P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou; vlastní zpracování	45
Tabulka 10. Průměrný čas a chyby \pm střední chyba v testu pravidelného žebříku ve věku P21, P25, P31 a P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou. V první části je popsán čas, v druhé části tabulky počet chyb; vlastní zpracování	47
Tabulka 11. Průměrný čas a chyby \pm střední chyba v testu nepravidelného žebříku ve věku P21, P25, P31 a P61 u kontrolní skupiny a skupin s aplikovanou látkou. V první části je popsán čas, v druhé části tabulky počet chyb; vlastní zpracování	49

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Schematický (Flores-Soto et al., 2012) a krystalografický (Vyklícky et al., 2014) model stavby NMDA receptoru.....	12
Obrázek 2. Isoformy NR1 podjednotky; Flores-Soto et al, 2012	13
Obrázek 3. Vývoj podjednotek NMDA receptoru; Fukaya et al., 2005	17
Obrázek 4. Schéma odlišných vývojových stádií laboratorního potkana v prvních třech měsících života; McKutcheon a Marinelli, 2009.....	23
Obrázek 5. Zjednodušené schéma vývoje chůze u potkana druhu norvegicus v prvním postnatálním měsíci; Shriner et al., 2009	24
Obrázek 6. Schematická škála vývoje descendentních drah u potkana v embryonálním a postnatálním věku; Clarac et al., 1998.....	27
Obrázek 8. Mládě ve věku P21 na pravidelném žebříku. A. přešlap zadní končetinou, B. přešlap přední končetinou, C. chůze bez přešlapu; vlastní zpracování	33
Obrázek 9. Rotarod se zvířaty; vlastní zpracování	34
Obrázek 10. Vzdálenost, kterou zvířata naběhala; vlastní zpracování	35
Obrázek 11. Porovnání výsledků průměrně uběhnuté vzdálenosti; vlastní zpracování	36
Obrázek 12. Čas, který zvířata průměrně strávila v centrální části prostoru; vlastní zpracování	37
Obrázek 13. Porovnání času stráveného v centrální části pole dle aplikace látky; vlastní zpracování	37
Obrázek 14. Průměrná frekvence návštěv centrálního pole dle věku; vlastní zpracování.....	38
Obrázek 15. Porovnání frekvencí návštěv centrálního pole dle aplikace látky v daném věku; vlastní zpracování.....	39
Obrázek 16. Průměrná rychlost zvířat v open fieldu; vlastní zpracování	40
Obrázek 17. Průměrná rychlost zvířat dle množství podané látky v daný věk; vlastní zpracování.....	40
Obrázek 18. Trasa potkanů v prvních 5 ti minutách po uvedení zvířat do open fieldu ve věku A. P12, B. P15, C. P18, D. P25, E. P31, F. P61; Vlastní zpracování.....	41
Obrázek 19. Výsledky pokusu negativní geotaxe; vlastní zpracování.....	42
Obrázek 20. Čas zvířat potřebný pro zdolání negativní geotaxe; vlastní zpracování	43
Obrázek 21. Průměrná doba, jakou se potkani byly schopni udržet zavěšení za horní končetiny; vlastní zpracování	44
Obrázek 22. Čas, po který se zvířata udržela na hrazdě; vlastní zpracování	45
Obrázek 23. Výsledky pokusu na žebříku s pravidelně uloženými příčkami; vlastní zpracování	46
Obrázek 24. Čas zvířat potřebný pro zdolání pravidelného žebříku; vlastní zpracování.....	47
Obrázek 25. Výsledky pokusu na žebříku s nepravidelně uloženými příčkami; vlastní zpracování	48
Obrázek 26. Čas zvířat potřebný pro zdolání nepravidelného žebříku a počet chyb; vlastní zpracování	49
Obrázek 27. Výsledky pokusu potkanů P61 na rotarodu; vlastní zpracování.....	50