

UNIVERZITA KARLOVA

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

HODNOCENÍ VLIVU FENYTOINU NA VÝVOJ MOTORIKY
LABORATORNÍHO POTKANA MOTORICKÝMI TESTY A
ANALÝZOU PLAVÁNÍ

Diplomová práce

Autor: Bc. Kateřina Matoušková, obor fyzioterapie

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

Praha 2017

Bibliografický záznam

MATOUŠKOVÁ, Kateřina. Hodnocení vlivu fenytoinu na vývoj motoriky laboratorního potkana motorickými testy a analýzou plavání. Praha, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství. 54 s. + přílohy. Vedoucí práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Souhlasím s půjčováním diplomové práce v rámci knihovních služeb.

Abstrakt:

Fenytoin je dlouho známé antiepileptikum s dobrými antikonvulzivními efektem, ale také s prokázanými vedlejšími účinky na motoriku při dlouhodobém užívání.

V této práci jsme se zabývali účinky fenytoinu na motorické schopnosti a koordinaci potkana po akutním podání fenytoinu. V teoretické části práce jsou uvedeny prokázané účinky fenytoinu popsané na lidech i na zvířecím modelu. Práce také obsahuje přehled motorického vývoje potkana a porovnání s vývojem člověka. Kromě vývoje lokomoce je popsán i vývoj plavání. V experimentální části práce jsme porovnávali tři skupiny potkanů po deseti. Porovnávali jsme vyšší dávku fenytoinu (60 mg/kg), nižší dávku fenytoinu (30 mg/kg), kontrolní skupinu, které bylo podáno rozpouštědlo. U každé skupiny bylo provedeno kontrolní měření před podáním látky.

Testování probíhalo ve stáří 12., 18. a 25. den po narození zvířat. Účinky fenytoinu jsme hodnotili motorickými testy a analýzou plavání. Výsledky naší práce ukázaly prokazatelné narušení motoriky a koordinace po podání fenytoinu na motorických testech u 12denních a 25denních mládřat.

Klíčová slova: fenytoin, motorický vývoj, laboratorní potkan, plavání, motorické testování

Abstract:

Phenytoin is well-known antiepileptic drug with high anticonvulsant effect but also with proven side effects on motor activities associated with its long-term use. This thesis summarizes side effects of phenytoin on motor skills and coordination of rats after acute phenytoin treatment. Theoretical part includes proven effects of phenytoin on human and animal model. Knowledge about motor skills development of rats and comparison with human motor skills development is also included in the thesis. Apart from locomotion development, swimming development is also described. We compared three groups of rats in the experiment. Each group consisted of ten rats. We compared group with dosage 60 mg/kg, 30 mg/kg, control group and vehicle group. Each group was tested before application for control.

We tested animals on postnatal day 12, 18 and 25. Effects of phenytoin were evaluated by motor skills testing and swimming analyses. The results of this thesis have proved impaired motor skills and coordination after phenytoin treatment of 12 and 25 days old rats.

Keywords: phenytoin, motor skill development, laboratory rat, swimming, motor skill testing

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 11. 8. 2017

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu profesorovi Pavlu Marešovi za trpělivost a cenné rady při psaní této práce a Irince Nešev za pomoc s praktickou částí. Dále bych chtěla poděkovat svým blízkým za podporu.

Obsah

Úvod.....	10
1 Přehled poznatků.....	11
1.1 Epilepsie.....	11
1.1.1 Patogeneze epilepsie	12
1.1.2 Terapie epilepsie	13
1.1.3 Historie AED a léčby epilepsie	14
1.1.4 Dělení antiepileptik podle mechanismu účinku	15
1.1.4.1 Sodíkové kanály	15
1.1.4.2 Kalciové kanály	16
1.1.4.3 Kyselina gama-aminomáselná.....	16
1.1.4.4 Kyselina glutamová	17
1.2 Fenytoin	17
1.2.1 Mechanismus účinku fenytoinu.....	18
1.2.3 Farmakokinetika a farmakodynamika fenytoinu.....	18
1.2.4 Použití fenytoinu	19
1.2.5 Nežádoucí účinky a lékové interakce PHT.....	20
1.3 Motorický vývoj laboratorního potkana a jeho korelace s vývojem člověka	24
1.3.1 Vývoj sensorických funkcí potkana.....	24
1.3.2 Vývoj vzpřimování potkana	25
1.3.3 Vývoj lokomoce potkana.....	27
1.3.3.1 0-14 dnů po narození.....	28
1.3.3.2 15 dnů po narození	29
1.3.3.3 18-21 dnů po narození	29
1.3.3.4 25 dnů po narození až do dospělosti.....	29
1.3.4 Vývoj plavání laboratorního potkana.....	29
1.3.4.1 Plavání s dominantními pohyby předních končetin	30
1.3.4.2 Plavání s pohybem předních i zadních končetin	31
1.3.4.3 Plavání s dominantními pohyby zadních končetin.....	32
1.3.4.4 Poloha hlavy při plavání	33
2 Cíle a hypotézy.....	34

3	Metodika.....	35
3.1	Rešerše	35
3.2	Experimentální část práce	35
3.2.1	Laboratorní zvířata	35
3.2.2	Aplikace fenytoinu	35
3.2.3	Statistické zpracování dat	36
3.2.4	Analýza plavání	36
3.2.5	Baterie motorických testů.....	37
3.2.5.1	Bar holding test.....	37
3.2.5.2	Test chůze po pravidelném a nepravidelném vodorovném žebříku	38
4	Výsledky.....	40
4.1	Bar holding test.....	40
4.2	Test chůze po pravidelném horizontálním žebříku.....	40
4.3	Test chůze po nepravidelném horizontálním žebříku	41
4.4	Plavání	42
5	Testování hypotéz	44
6	Diskuse	45
7	Závěr.....	48
	Referenční seznam.....	49
	Přehled příloh	54
	Přílohy	55

Seznam zkratek

AED = antiepileptic drugs, antiepileptika

AV ČR = Akademie věd České republiky

CNS = centrální nervová soustava

ILAE = International League Against Epilepsy

LPK = levá přední končetina

LZK = levá zadní končetina

PHT = fenytoin

PPK = pravá přední končetina

PZK = pravá zadní končetina

Úvod

Tato diplomová práce pojednává o působení fenytoinu na motoriku a koordinaci po akutním podání. Fenytoin patří mezi nejstarší antiepileptika, ale pro své antikonvulzivní účinky je nadále využitelný. Indikován je při terapii status epilepticus a má dobře funguje i na terapii epileptických záchvatů v novorozeneckém věku.

Teoretická část práce obsahuje informace o epilepsii jako onemocnění a o způsobech léčby, přehled antiepileptik a popis jejich mechanismů účinku. Podrobněji jsou popsány účinky fenytoinu a jeho využití. Dnes není fenytoin pro četné vedlejší jako lék první volby doporučován u nás ani v zahraniční literatuře. Pro svou dobrou dostupnost a nízkou cenu se ale využívá v rozvojových zemích. V této práci jsme se zaměřili především na ovlivnění motoriky. Dlouhodobé užívání fenytoinu má prokazatelné neurotoxické účinky na buňky mozečku, dochází ke strukturálním a funkčním změnám granulárních a Purkyňových buněk. Klinicky se to projevuje poruchami rovnováhy, ataxií a celkovým narušením koordinovaného pohybu. Tato práce se zabývá účinky fenytoinu na motoriku po akutním podání. Popsali jsme změny v testech na souši i závěry pozorování plavání potkana. Podařilo se prokázat, že i po jedné dávce fenytoinu jsou patrné odchylky od kontrolní skupiny. Tyto odchylky se projevily více v testech visu na hrazdě a při hodnocení chůze po horizontálních žebřících než ve vodním prostředí. Odchylky byly patrné i při plavání, ale nepodařilo se nám je dostupnými metodami kvantifikovat.

Experimentální část práce byla provedena na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky v letech 2016 a 2017.

1 Přehled poznatků

1.1 Epilepsie

Epilepsie je onemocnění mozku způsobující trvalou predispozici generovat epileptické záchvaty. Mezinárodní společnost proti epilepsii (Internacional League Against Epilepsy, ILAE) ji definuje výskytem minimálně dvou neprovokovaných záchvatů vyskytujících se s odstupem více než 24 hodin (*Fisher et al., 2005*). Tato definice je ale nedostatečná pro zvláštní klinické případy (centrální mozková příhody, infekce centrálního nervového systému, trauma centrálního nervového systému apod.). U pacienta po takovém poškození je riziko opakování záchvatu srovnatelné s pacientem po dvou epileptických záchvatech (*Hesdorffer et al., 2009*). Proto původní definici ILAE v roce 2014 rozšířila i pro zvláštní okolnosti. Epilepsie je tedy onemocnění mozku definované některou z následujících podmínek: výskyt alespoň dvou neprovokovaných záchvatů s odstupem minimálně 24 hodin, jeden neprovokovaný záchvat a pravděpodobnost dalších záchvatů podobná všeobecnému riziku opakování (60 %) po dvou neprovokovaných záchvatech, které se objevily v posledních 10 letech, nebo diagnóza epileptického syndromu (*Fisher et al., 2014*).

Epilepsie je onemocnění postihující všechna věková stadia. Prevalence epilepsie je 500 až 2 000 pacientů na 100 000 obyvatel (*Hauser, 1994*). Během života epileptický záchvat prodělá 2-5% populace (*Bell, Sander, 2001*). V České republice se odhaduje počet nemocných epilepsií na 100 000 (*Rektor a Ošlejšková, 2010*). Incidence u dětí je 50-100 případů na 100 000 dětí za rok. Nejčastější výskyt je v prvním roce života (*Hauser, 1994*). Téměř 1% dětí do 15 let prodělá více než dva neprovokované epileptické záchvaty (*Sýkora, 2008*).

Čím mladší věk pacienta při nástup epilepsie, tím mohou být horší projevy nemoci. Rozlišují se čtyři vývojová stadia pro dětský věk. V určitých věkových stádiích se vyskytují záchvaty s typickými rysy pro dané období. V prvních třech měsících života je novorozenecké stádium. Záchvaty jsou v tomto období způsobeny často vrozenými strukturálními nebo difúzními patologiemi CNS, vrozenými metabolickými vadami a dalšími genetickými syndromy a mívají špatnou prognózu. Od tří měsíců do čtyř let věku se vyskytují provokované záchvaty. Typickou příčinou jsou febrilní křeče způsobené horečkou. Další příčinou mohou být strukturální léze CNS a genetické syndromy. Mezi čtvrtým a desátým rokem věku se vyskytují idiopatické epileptické syndromy, např. dětské absence a benigní rolandické epilepsie. Stoupá frekvence komplexních parciálních záchvatů, které se začínají

podobat záchvatům u dospělých. Od tohoto období do adolescence se objevují primární generalizované záchvaty s tonicko-klonickými křečemi, např. juvenilní myoklonická epilepsie (Arzimanoglou et al., 2004).

Po prvním neprovokovaném záchvatu je riziko dalšího 40 – 52% (Berg et al., 1991), po dvou neprovokovaných záchvatech je v následujících čtyřech letech riziko dalšího 73% (Hauser et al., 1998). Dopad na kvalitu života, zátěž na rodinu a blízké a výdaje na léčbu epilepsie jsou značné.

Klasifikace epileptických záchvatů se nadále vyvíjí. Záchvaty lze dělit na generalizované (postihují obě hemisféry) a fokální (vyskytují se pouze na jedné hemisféře). Generalizované záchvaty lze dále dělit na absence („petit mal“) a záchvaty s motorickou složkou (např. „grand mal“ charakterizovaný výskytem tonicko-klonických křečí). Motorickým projevem záchvatu mohou být tonické, klonické, atonické, myoklonické křeče nebo jejich kombinace. Fokální záchvat může být motorický nebo non-motorický (Fisher et al., 2014).

1.1.1 Patogeneze epilepsie

Epileptický záchvat charakterizují abnormální, nekontrolované výboje v mozku. Epileptogenní neurony mají poruchu na autosomatických inhibičních synapsích (Seidl, Obenberger, 2015). Iritační zóna (ložisko) je síť vzájemně propojených neuronů. Jde o více či méně rozsáhlé oblasti v mozku, které mají zvýšenou excitabilitu. Tyto neurony jsou funkčně pozměněné a mezi záchvaty generují asynchronní epileptickou aktivitu, která je zachytitelná na EEG. Záchvat se klinicky projeví, když dojde k synchronické epileptické aktivitě (Rektor a Ošlejšková, 2010).

Oblast, ze které záchvat vychází, se nazývá epileptogenní zóna. Epileptická aktivita se odtud šíří do dalších struktur (Rektor a Ošlejšková, 2010). Častý je vznik sekundárních a terciálních ložisek v druhé hemisféře nebo v amygdale a hipokampu. Projevy záchvatu jsou determinovány strukturami, které jsou zasaženy. Poruchy vědomí jsou při záchvatu způsobeny vlivem na ascendentní systém retikulární formace a na talamus (Seidl a Obenberger, 2015).

1.1.2 Terapie epilepsie

K terapii epilepsie se využívá především medikamentózní léčba antiepileptiky. K chirurgickému řešení se přistupuje v případě, že je konzervativní terapie neúspěšná (*Rektor a Ošlejšková, 2010*).

Léčba epilepsie je symptomatická. Antiepileptika ovlivňují antikonvulzivně záchvatovou aktivitu, účinek na patologické procesy v mozku způsobující záchvat je ale sporný (*Rektor a Ošlejšková, 2010*).

Terapie antiepileptiky bývá nasazena, až po stanovení diagnózy epilepsie. První prodělaný záchvat nemusí být způsoben epilepsií, a proto důležité zvážit indikaci terapie. Stejně tak u záchvatů vyskytujících se vzácně, pokud benefity podání antiepileptik nevyváží možné nežádoucí účinky, mohou být indikována pouze režimová opatření. Důslednost v oblasti životosprávy je při terapii epilepsie velmi důležitá. Pacient musí dodržovat pravidelný spánkový režim, nesmí pít alkohol a měl by se vyhýbat situacím, které by mohly provokovat záchvat (*Rektor a Ošlejšková, 2010*).

Nejprve je nasazena monoterapie nízkou úžinou dávkou. Kvůli riziku lékových interakcí, se ke kombinaci s dalším lékem se přistupuje až při neúspěšné monoterapii. Rektor a Ošlejšková (2010) uvádějí jako lék první volby karbamazepin a valproát. Od fenytoinu se pro nežádoucí účinky začíná upouštět.

Typ záchvatu/syndromu	GBP	LEV	LTG	PGB	TPM	ZNS	CBZ	VPA	PHT	RUF	SUX
Parciální	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Sekundárně generaliz.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Absence	-	?	+	?	?	?	-	+	-	-	+
Myoklonické	-	+	+	?	?	?	-	+	-	-	-
Lennox-Gastaut		?	+	?	+	?	0	+	0	+	-
Westův syndrom**	-	?	+	0	+	0	0	+	0	0	0

CBZ – carbamazepin; VPA – valproát; PHT – fenytoin; GBP – gabapentin; LEV – levetiracetam; LTG – lamotrigin; PGB – pregabalin; TPM – topiramat; ZNS – zonisamid; RUF – rufinamid; SUX – suxinimid; + prokázaný účinek; ? účinek možný, zatím testován; 0 neúčinné; - možné zhoršení; * LTG může zhoršovat myoklonické záchvaty u některých pacientů; ** v terapii jsou využívány ACTH/kortikoidy, vigabatrin

Tab. 1 – Nejčastěji užívaná antiepileptika a jejich využití při léčbě epileptických záchvatů (*Rektor a Ošlejšková, 2010*)

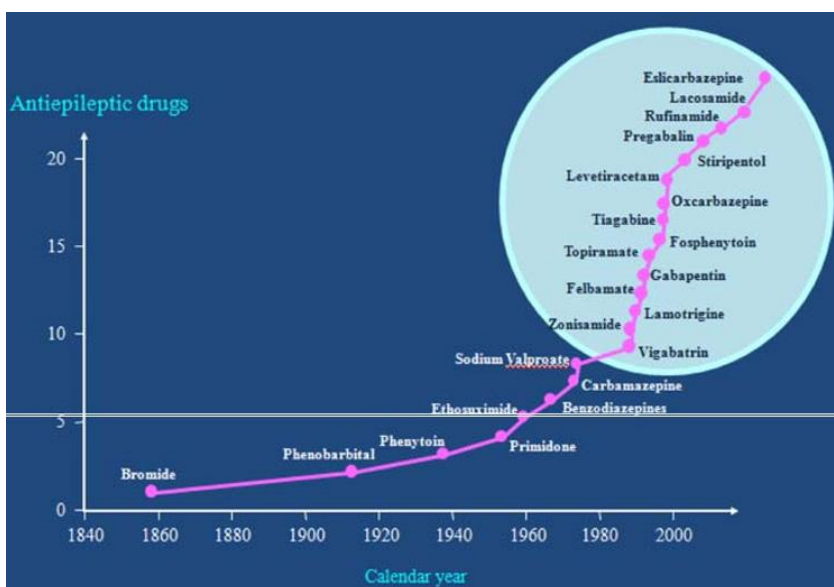
U dětí je léčba také zahájena monoterapií, ale často jsou záchvaty způsobeny epileptickými syndromy, v rámci kterých se může vyskytovat více typů záchvatů najednou. V takovém případě je nutné použití různých antiepileptik (Komárek, 2007).

Léčba antiepileptiky (AED) je ve většině případů úspěšná, ale asi u 30 % pacientů přetrvávají nekontrolovatelné křeče i přes nastavenou léčbu (Kwan a Brodie, 2000). V takovém případě, kdy je epilepsie rezistentní na terapii antiepileptiky, je možné použít chirurgické řešení. Operační řešení je také indikováno, pokud je třeba odstranit epileptoformní strukturu, např. tumor (Rektor a Ošlejšková 2010).

1.1.3 Historie AED a léčby epilepsie

První zmínky o moderní léčbě epilepsie jsou z poloviny 19. století, kdy Charles Locock léčil u mladých žen „hysterickou epilepsii“ použitím bromidu draselného. Účinnost bromidu draselného jako účinného antiepileptika nebyla prokázána, ale i dnes se spekuluje o jeho využití při léčbě dětských pacientů s epilepsií (Korinthenberg, 2007). Nejstarším z antiepileptik je fenobarbital. Je využíván i dnes, díky nízkým nákladům na výrobu nejvíce předepisován v rozvojových zemích (Kwan a Brodie, 2004).

Moderní éra antiepileptik začala v roce 1975, kdy byl ve Spojených státech založen Program pro vývoj antiepileptik. Bylo prozkoumáno více než 28 000 chemických sloučenin a jejich použití při léčbě epilepsie. Vhodné sloučeniny byly dále testovány na zvířecích modelech (Smith et al., 2007). Nástup jednotlivých antiepileptik v průběhu minulého století je znázorněn na obrázku č. 1 (Brodie, 2010).



Obr.1 - Chronologie zavádění AED za posledních 150 let (Brodie, 2010)

Antiepileptika je možné dělit na 1. a 2. generaci a na nová antiepileptika, nebo podle mechanismu jejich účinku. Mezi antiepileptika 1. generace patří fenobarbital, fenytoin, primidon a etosuximid. Tato antiepileptika mají ale často toxické a teratogenní účinky (*Burešová, 2007*). Teratogenní účinky fenytoinu na plod v průběhu gravidity dosahují až 6% (*Seidl a Obenberger, 2015*).

V 60. letech minulého století došlo k objevení nových antikonvulzivních látek, tzv. antiepileptika 2. generace. Mezi ně řadíme karbamazepin a valproát. Nejnovější skupina antiepileptik byla uvedena v 90. letech minulého století. Mezi antiepileptika 3. generace spadá např. lamotrigin, topimarát, gabapentin, levetiracetam a pregabalin (*Burešová, 2007*).

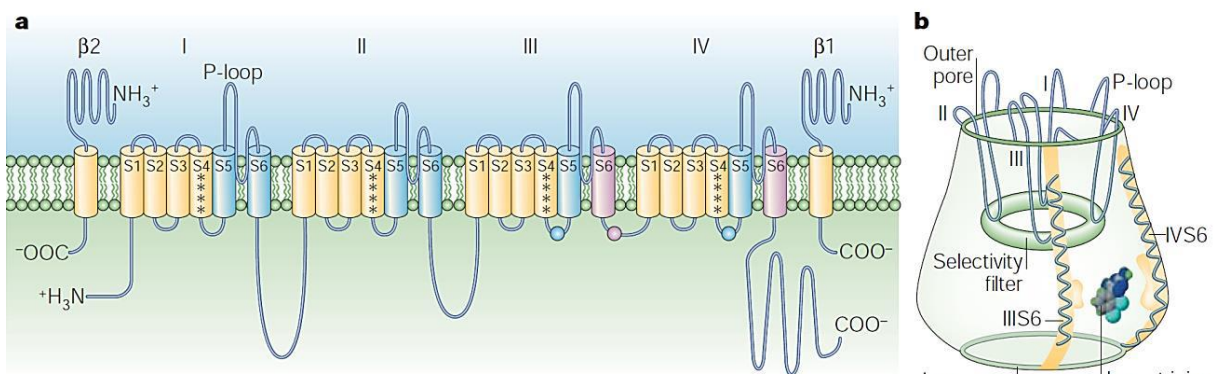
1.1.4 Dělení antiepileptik podle mechanismu účinku

Antiepileptika mají schopnost snížit excitaci neuronů nebo navýšit neuronální inhibici několika mechanismy. Působí na iontové kanály, posilují účinky kyseliny gama-aminomáselné, způsobují inhibici glutamátergních procesů a modifikují uvolňování neurotransmiterů (*Kwan a Brodie, 2007*). V následujících odstavcích představím některá antiepileptika a jejich sílovou strukturu.

1.1.4.1 Sodíkové kanály

Působení na sodíkové kanály v mozku se využívá při terapii generalizovaných parciálních záchvatů, zejména tonicko-klonických křečí (*Rogawski a Löscher, 2004*). Antiepileptika se naváží se na kanálek v inaktivním stavu a snižují jeho vodivost. Mezi takto působící antiepileptika patří na příklad fenytoin, karbamazepin a lamotrigin. Lakosamid ovlivňuje pomalou inaktivaci sodíkových kanálů, zatímco dříve zmíněné látky mají vliv na inaktivaci rychlou (*Beydoun et al., 2009*).

Sodíkové kanálky jsou tvořeny podjednotkami α a β . Podjednotka α tvoří centrální pór kanálu, podjednotka β reguluje excitabilitu (*Lasoň et al., 2013*). Při depolarizaci mění proteiny svou konfiguraci a tím dojde k otevření kanálu (*Rogawski a Löscher, 2004*)



Obr. 2 – AED a napětím řízené sodné kanály (Rogawski a Löscher, 2004)

Komentář:

a – primární struktura podjednotek napětím řízených sodíkových kanálů. Hlavní α -podjednotky lemují pomocné β -podjednotky. Modré válce (S5, S6) = pór. Hvězdičky na válci S4 = napětím řízený senzor. IIIS6 a IVS6 (růžové segmenty) = místa navázání léčiv, včetně AED blokujících napětím řízené sodíkové kanály

b - Systematické ztvárnění póru napětím řízeného sodíkového kanálu. Segmenty S6 III a IV obsahují vazebná místa pro AED (zvýrazněno žlutou barvou). Přejato a se svolením pozměněno z REF.35 © (2001) American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

1.1.4.2 Kalciové kanály

Kalciové kanály se mechanismem funkce i strukturou blíží kanálům sodným (Lasoň *et al.*, 2013). Mezi antiepileptika působící na kalciové kanály patří etosuximid, gabapentin a pregabalin. Blokádu kanálů zabraňují depolarizaci a uvolnění neurotransmiterů. Etosuximid působí na T-typ kalciových kanálů. Gabapentin a pregabalin se vážou na podjednotku alfa2 delta kalciových kanálů aktivovaných vysokým napětím (Meldrum a Rogawski, 2007). Lamotrigin, topimarát, levetiracetam a zonisamid se také vážou na kalciové kanály, ale jinými mechanismy (Brodie, 2010).

1.1.4.3 Kyselina gama-aminomáselná

Posílení inhibice přenosu nervových vzruchů v mozku, kterou zprostředkovává neurotransmitter kyselina gama-amino-máselná (GABA), je velmi podstatný, protože GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem v mozku savců (Lasoň *et al.*, 2013). Antiepileptika působící na receptory GABA fungují na několika mechanismech.

Barbituráty a benzodiazepiny zvyšují odpověď na synapsí uvolněnou GABA. Valproát pozměňuje syntézu GABA, vigabatrin upravuje metabolismus, tiagabin blokuje opětovné vstřebávání GABA na synapsi. GABA se váže na metabotropní GABA_B receptor a GABA_A receptor, který je farmakologicky významnější (Landmark, 2007).

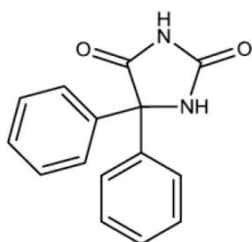
Na GABA_A receptor cílí benzodiazepin, fenobarbital, gabapentin nebo topiramát (Landmark, 2007). Felbamát, topimarát a levetiracetam také modulují odpověď na GABA_A receptorech (Sills a Brodie, 2001).

1.1.4.4 Kyselina glutamová

Kyselina glutamová je nejvýznamnější excitační neurotransmitter na bázi aminokyseliny v centrální nervové soustavě. Blokádou dochází ke snížení nervového přenosu, a tedy záchvatové aktivity (Dingledine et al, 1999). Fenobarbital, valproát a topimarát antagonisticky působí receptor AMPA (inotropní receptor, na který se váže kyselina α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolopropionická) a na kainátový receptor a snižují tak záchvatovou aktivitu (Lasoň et al., 2013). Přímou inhibicí exocytózy neurotransmiteru kyseliny glutamové působí levetiracetam (Landmark, 2007).

1.2 Fenytoin

Fenytoin je slabou kyselinou patřící mezi hydantoiny (Gallop, 2010).



Obr. 3 – chemická struktura fenytoinu (Doležal et al., 2013)

Fenytoin byl objeven a poprvé syntetizován jako derivát barbiturátu v Německu profesorem Heinrichem Biltzem už v roce 1908. Následně byl v roce 1923 resyntetizován farmaceutickou společností Parke-Davis v Detroitu. Sloučenina byla dále zkoumána a v roce 1936 byly objeveny její antikonvulzivní vlastnosti (Shorvon, 2009). A ve stejném roce byl podán prvnímu pacientovi (Brodie, 2010).

Fenytoin je často předepisovaným antiepileptikem během i po epileptickém záchvatu (Gallop, 2010). Brodie ve své práci z roku 2010 uvádí, že i po objevení nových antiepileptik je fenytoin pravděpodobně nejpředepisovanějším antiepileptikem ve Spojených státech (Brodie, 2010).

1.2.1 Mechanismus účinku fenytoinu

I přes to, že bylo antikonvulzivní působení fenytoinu objeveno před 80 lety, jeho přesný mechanismus účinku není zcela objasněn (*Hesseling a Kopsky, 2017*). Na konci 70. a v 80. letech byl popsán tlumivý vliv na sodíkové kanály (*Matsuki et al., 1984*). O pár let později v roce 1985 byly ale účinky fenytoinu vysvětlovány stabilizačním efektem na membránách neuronů vlivem na tok iontů přes kanály. Autoři poukazovali také na to, že účinky fenytoinu byly popsány na odlišné koncentraci látky v plasmě, než jaká je při terapeutické dávce. Při různé koncentraci se může efekt na receptory lišit (*Rall a Schleiffer, 1985*). Nové účinky na receptory v různých koncentracích jsou objevovány i dnes, 80 let od objevení. Na příklad v roce 2015 byla popsána silná afinita fenytoinu v terapeutické dávce k estrogenovému alfa receptoru (*Fadiel et al., 2015*).

Je patrné, že pole působení fenytoinu je široké. Působí na Na^+ , K^+ a Ca^{2+} iontové kanály, ovlivňuje membránové potenciály a koncentraci aminokyselin (*Gallop, 2010*). Fenytoin podněcuje rychlou inaktivaci sodíkových kanálů. Dochází k uzavření intracelulárního ústí kanálu krátkou smyčkou aminokyselinového rezidua (*Rogawski a Löscher, 2004*). Terapeutická dávka blokuje firing neuronů a udržuje Na^+ kanály v inaktivním stavu (*Gallop, 2010*).

1.2.2 Podání fenytoinu

Fenytoin může být podáván perorálně nebo intravenózně. Při naléhavých situacích, kdy je třeba rychle tlumit záchvat, je výhodnější podání intravenózní (*Manthey a Barnes, 2003*). Intravenózní podání vede k rychlejšímu nástupu účinku, ale má větší riziko nežádoucích účinků, zejména na kardiovaskulární systém (*Earnest et al., 1983*).

Pro perorální podání je fenytoin dostupný ve formě tablet, sirupů (*Gallop, 2010*). Kvůli riziku nekrózy, tvorbě krystalků ve svaly a nevyzpytatelnou absorpci by neměl být podáván intramuskulárně a ani subkutánně (*Wilkensy a Lowden, 1973*).

1.2.3 Farmakokinetika a farmakodynamika fenytoinu

Rozpustnost fenytoinu ve vodě je omezená. Po perorálním podání dochází k pomalé absorpci. Po vstřebání se váže z 90% na plazmatické bílkoviny, především na albumin (*Grundmann, Kacířová, 2016*). U dospělých pacientů Kirschbaum uvádí vazbu na plazmatické proteiny 87 - 93%. U novorozenců nebo při renálním selhání je ale procento navázání nižší (*Kirschbaum et al., 1999*). Močí je vyloučeno méně než 5% látky v nezměněné formě.

Dávkování fenytoinu je značně individuální, protože mezi podanou dávkou a následnou koncentrací v plazmě není přímá úměra a terapeutická šíře je úzká. Dalším faktorem jsou také četné lékové interakce (*Grundmann, Kacířová, 2016*).

Koncentrace fenytoinu v séru je nejvyšší hodinu a půl až tři hodiny po podání (*Kirschbaum et al., 1999*).

Rychlost odbourávání se liší v průběhu vývoje. V časném dětství je metabolismus rychlejší než v dospělosti, a proto se využívá vyšších dávek antiepileptik. Na dospělou úroveň se dostává kolem 14. - 16. roku. Je třeba proto terapii kontrolovat a modifikovat, aby nebyla podávaná dávka neúměrná úrovni metabolismu, a tak nedošlo k projevům nežádoucích účinků (*Rektor a Ošlejšková, 2010*).

1.2.4 Použití fenytoinu

Ze studie mapující používaná antiepileptika ve Spojených státech amerických z roku 2016 vychází, že využívání fenytoinu se oproti dřívějšímu dotazníkovému šetření z let 2005 a 2001 snížilo. Stejně tak tomu bylo u valproátu a gabapentinu. V rámci studie byli dotazováni experti v léčbě epilepsie, určovali metodu volby pro různé druhy epileptických záchvatů i pro terapii dětí, žen ve fertilním věku, gravidních apod. (*Shih et al., 2016*).

Jako antikonvulzivum se dnes fenytoin využívá při terapii status epilepticus. Je využíváno až dvou dávek benzodiazepinů, po kterých následuje podávání fenytoinu, pokud záchvat přetrvává (*Meierkord et al., 2006*).

Po vážných poraněních mozku je fenytoin užíván k terapii časných (do 1 týdne) posttraumatických záchvatů (*Schierhout, 2001*).

Fenytoin se používá při terapii novorozeneckých záchvatů epileptické patogeneze. Dalšími často používanými antiepileptiky jsou fenobarbital, benzodiazepiny a midazolam (*Rektor a Ošlejšková, 2010*). Ze studie z roku 2015, která porovnávala účinnost fenytoinu, fenobarbitalu a lorazepamu vychází, že po podání jedné dávky antiepileptika byl pro stabilizování novorozeneckého záchvatu nejúčinnější lorazepam (89%), následně fenytoin (69%) a poté fenobarbital (63%). Pro stabilizování perzistujících neonatálních záchvatů byly všechna tři antiepileptika účinná u 1/3, u většiny pacientů bylo nutné využít kombinaci dalších antiepileptik. Vedlejší účinky po podání byly u všech tří skupin. U skupiny, které byl podán lorazepam, se nežádoucí účinky objevily u 14 % pacientů. Vyskytovala hypotonie a ospalost. U skupiny, které byl podán fenobarbital, se nežádoucí účinky objevily u 30,5 % pacientů.

Vyskytovala se především ospalost. U skupiny, které byl podán fenytoin, se nežádoucí účinky objevily u 11 % pacientů (4 pacientů z 36). U tří pacientů se vyskytla tromboflebitida a u jednoho nystagmus. Nejvyšší počet úmrtí byl zaznamenán ve skupině, které byl podáván fenobarbital (33 %), následovala skupina, které byl podáván lorazepam (19,4 %), nejnižší počet úmrtí byl ve skupině s fenytoinem (8,3 %). Ze studie se jako nejúčinnější antiepileptikum pro terapii novorozeneckých záchvatů jeví lorazepam, který je následován fenytoinem. Nejméně účinný je fenobarbital, který má také nejvíc nežádoucích účinků (*Solanki et al., 2015*).

Není vhodné používat fenytoin pro terapii záchvatů způsobených alkoholem, otravou, při eklampsii a preeklampsii, po centrální mozkové příhodě a při záchvatech způsobených tumorem (*Gallop, 2010*).

Je zřejmé, že u terapie epileptických záchvatů je ve vyspělých zemích fenytoin pomalu nahrazován jinými antiepileptiky, ale je možné, že bude využitelný v terapii jiných onemocnění. Prozatím bylo použití fenytoinu prozkoumáno u více než sta onemocnění. Zatím slibně se jeví použití u rakoviny prsu a zánětu očního nervu (*Hesselink, Kopsky, 2017*).

1.2.5 Nežádoucí účinky a lékové interakce PHT

Fenytoin podporuje vznik volných radikálů a tím dochází ke zvýšení oxidačního stresu, který má neurotoxické účinky. Dochází k poškození nervových buněk a narušení jejich funkce (*Liu et al., 1997*). Neurotoxický účinek postihuje především buňky mozečku a způsobuje strukturální změny. Je popisováno abnormální zvětšení dendritů Purkyňových buněk (*Mallow et al., 1980*). Dlouhodobé užívání fenytoinu může způsobovat atrofii mozečku. (*De Marcos et al., 2003*) a může vést k rozvoji cerebelární ataxie. Na špatnou schopnost rovnováhy si stěžovalo 68 % pacientů, kteří dlouhodobě užívali fenytoin, u 52 % byla ataxie klinicky prokázána (*Shanmugarajah et al., 2013*).

Není vhodné, aby fenytoin užívaly ženy těhotné nebo těhotenství plánující. Fenytoin totiž prochází placentou a může způsobovat fetální hydantoinový syndrom (*Nanda et al., 1989*).

Studie z roku 2010 v Číně porovnávala nežádoucí účinky fenytoinu, karbamazepinu, valproátu lamotriginu při monoterapii po dobu dvou let. U fenytoinu popisovali u 16,9 % nechutenství, u 13,6% nauzeu, u 10,2 % únavu a vyčerpání, u 5,1 % tremor, u 8,5 % nystagmus, dále se objevovaly ztráty paměti, tuhnutí dásní, somnolence, nespavost (*Zeng et al., 2010*). Glauser popisuje somnolenci u 29,8 % pacientů a u 10,6% apatii (*Glauser et al.,*

2004). Popisovány jsou také negativní účinky na schopnost rychle reagovat na podnět, paměť a koncentraci (*Meador et al., 1995*) a snížení schopnosti učení. Testování probíhalo 30 minut po podání fenytoinu (*Shannon a Love, 2007*).

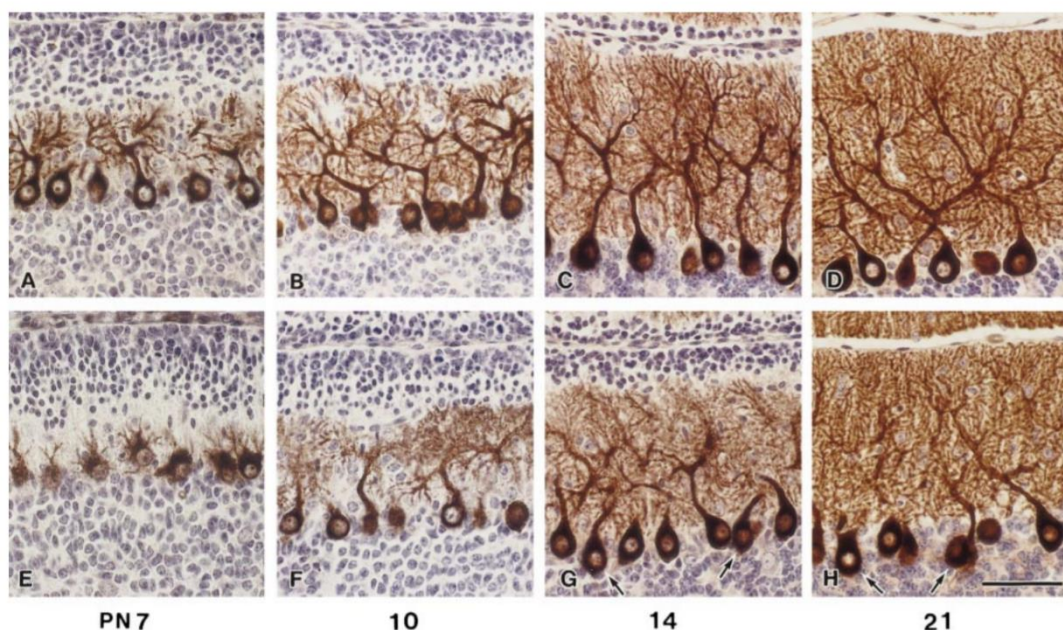
Mezi závažné nežádoucí účinky patří vliv na kardiovaskulární systém, zejména výrazná hypotenze, bradyarytmie a srdeční zástava (*Gallop, 2010*). Jelikož je fenytoin špatně rozpustný ve vodě, podává se parenterálně v roztoku 40% propylenglykolu, 10% ethanolu a hydroxidu sodného. Propylenglykol má silnou vagální aktivitu, a proto je pravděpodobné, že nežádoucí účinky na kardiovaskulární systém způsobuje právě propylenglykol (*Earnest et al., 1983*).

V místě intravenózní aplikace může docházet k méně závažným komplikacím, jako je zarudnutí, bolestivost nebo pocit pálení. Výjimečně se ale může vyskytnout závažný purple glove syndrome (*Burneo et al., 2001*).

Perorální podání má nežádoucích účinků méně. Může se objevit nevolnost nebo zvracení (*Winter et al., 2006*).

Pro přesnější popis neurotoxických účinků fenytoinu na mozkovou tkáň se používají zvířecí modely. V následujících odstavcích některé studie mapující vliv fenytoinu na CNS popíší.

Po orálním podání fenytoinu myším mláďatům 2. až 4. den po narození bylo provedeno vážení a histologie mozkové tkáně. Hmotnost mozku i mozečku byla signifikantně snížena oproti kontrolní skupině. Na histologickém preparátu bylo možné popsat chabé vyvinutí Purkyňových buněk mozečku, viz obr. 4 (*Ohmori et al., 1999*).



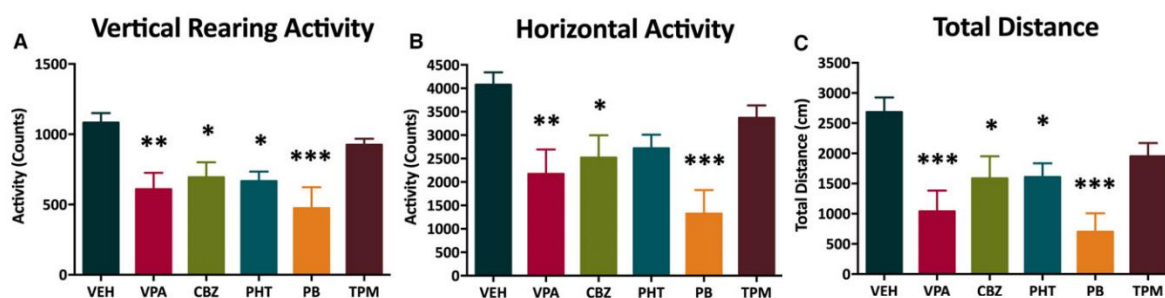
Obr. 4 – Histologický preparát zobrazující vermis cerebelli myši 7., 10., 14. a 21. den po narození (*Ohmori et al., 1999*); Komentář: A-D = kontrolní skupina, E-H = skupina, které byl podán fenytoin; měřítko: A-D = 50 μ m

Efekt fenytoinu a dalších antiepileptik na motoriku dospělých potkanů byl popsán ve studii Patricka Forcelliho z roku 2011. Mláďatům byla podávána antiepileptika 7., 8., 9., 11., 12. a 13. den po narození. Následně bylo hodnoceno spontánní chování a motorické dovednosti. Při testu na akcelerujícím rotarodu (otáčející se válec), který testuje motorickou koordinaci, byly prokázány signifikantně horší výsledky u potkanů, kterým byl podáván fenytoin, nebo lamotrigin. Snímání spontánní aktivity v open fieldu ukázalo odlišnost v chování. Potkani, kterým byl podáván fenytoin, se pohybovali více ve středu výběhu oproti kontrolním zvířatům, která se držela při stěnách. Testována byla také emoční paměť zvířat opakovaným hodnocením podmiňovaného strachu. Zvířata, kterým byl podán fenytoin reagovala na stresové podněty méně než kontrolní skupina. Podání fenytoinu tedy vedlo k horšímu učení. Schopnost učení byla snížena i při testu Morrisova vodního bludiště. V tomto testu je potkan umístěn do nádoby s vodou, ve které je plošina. Zvíře plošinu najde a instinktivně na ni vyleze. Při druhé části je hladina vody vyšší a plošina není vidět, ale je na stejném místě. Pokud si potkan dokázal zapamatovat při prvním pokusu, kde se plošina nachází, najde ji rychleji (*Forcelli et al., 2011*).

Vedlejší účinky fenytoinu jsou patrnější po dlouhodobém podávání, rozdíl se ale dají pozorovat po akutním podání. Barker-Haliski et al. (2016) popisovali efekt antiepileptik po akutním podání na kognitivní a motorické schopnosti potkanů Sprague-Dawley (100-125 g) a

myši CF-1 (13-15g). Potkanům bylo podáno intraperitoneálně 1,5 mg/kg, 15 mg/kg a myším 7 mg/kg fenytoinu. Zvířata byla testována na Morrisově vodním bludišti a byla hodnocena jejich aktivita v open fieldu. Rychlost plavání ani vzdálenost, kterou potkan urazil, než se dostal na plošinu, nebyly významně rozdílné od kontrolní skupiny. Při opakovaném testování ale byla u všech zkoumaných antiepileptik včetně fenytoinu zvýšená latence v nalezení plošiny.

Fenytoin statisticky významně narušil spontánní aktivitu v open fieldu. Testování probíhalo 10 minut a byla hodnocena (uražená vzdálenost), vertikální aktivita (stavění se na zadní) a horizontální aktivita. Rozdíly byly ve vzdálenosti, kterou potkani ušli, a v četnosti stavění se na zadní (viz obr. 5).



Obr. 5 – Aktivita potkanů Sprague-Dawley v open fieldu; signifikantně významné výsledky u fenytoinu (PHT) oproti kontrolní skupině s rozpouštědlem (VEH) jsou u vertikální aktivity a uražené vzdálenosti; převzato z Epilepsia © ILAE (Barker-Haliski et al., 2016)

1.3 Motorický vývoj laboratorního potkana a jeho korelace s vývojem člověka

Pohyb je funkcí nervové soustavy a je ukazatelem její zralosti. Vývoj nervové soustavy, a tedy i motoriky, je determinovaný geneticky zakódovaným programem. Reflexy a motorické dovednosti dozrávají postupně, vyvíjí se i spontánní a cílená hybnost (*Vojta, 1995*). Na rozdíl od člověka se mládě potkana rodí s motorickými a senzoryckými funkcemi na jiném stupni vývoje. Lze ale určit alespoň několik společných prvků. Mláďata savců se liší ve stupni zralosti, s jakou přicházejí na svět. Podle stadia vývoje je můžeme dělit na druhy altriciální, která jsou plně závislá na péči matky, a prekociální, které se rodí vyspělejší. Altriciální mláďata jsou po narození málo vyvinutá, rodí se se zalepenýma očima, prakticky bez ochlupení a typicky ve vícečetném vrhu (*Clancy, Darlington a Finlay, 2001*).

Embryogeneze potkana trvá 21 dní. Stejně jako lidé jsou mláďata potkana po narození velmi nezralá, rodí se holá, neslyší, mají zalepené oči. Díky senzoryckému deficitu a nevyvinutým posturálním funkcím je jejich pohybová aktivita velmi chudá (*Jamon, 2006*). Stav vývoje motoriky v době narození lze porovnat s pozdním druhým trimestrem gravidity člověka (*Clancy, Darlington a Finlay, 2001*). Senzorycké schopnosti dozrávají později. Na světelný podnět mláďata potkana reagují mezi desátým a dvanáctým dnem, obdobnou reakci lze pozorovat u novorozeného dítěte. Po narození dochází k myelinizaci nervových vláken, nedochází ale k apoptóze nervových buněk jako u člověka. Rozdíl počtu neuronů potkana před a po narození není významný (*Westerga a Gramsbergen, 1990*).

Při testování motorických schopností se využívá pozorování spontánní hybnosti a posturálních reakcí. Vývoj motoriky postupuje kranio kaudálně a směřuje ke kvadrupedální lokomoci (*Altman a Sudarshan, 1975*).

Mezi 21. a 25. dnem po narození představuje vrchol hravého období a lze toto období přirovnat k mladšímu školnímu věku člověka (*Alaverdashvili et al., 2005*). Vývoj mozečku končí mezi 10. a 21. dnem, kdy maturují granulární buňky mozečku (*Westerga a Gramsbergen, 1990*), tedy v obdobném stáří jako u člověka. Pohlavní zralosti potkan dosahuje mezi 35. a 50. dnem po narození. 60. den po narození potkan dosahuje dospělosti (*Nejedlý, 1965*).

1.3.1 Vývoj senzoryckých funkcí potkana

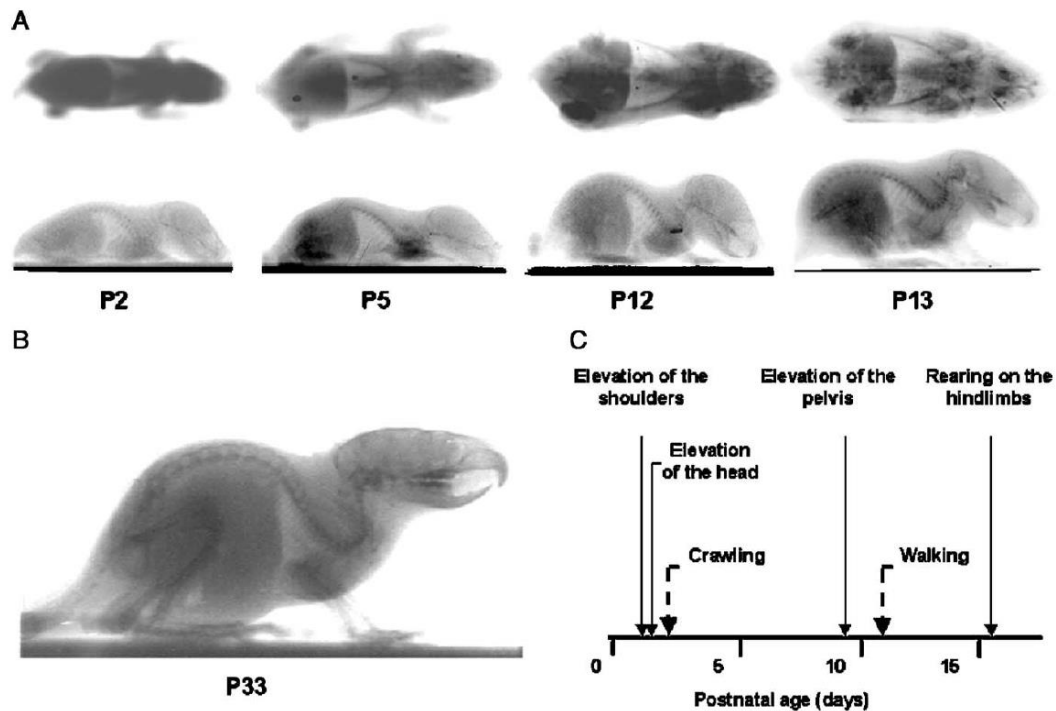
Novorozená mláďata nevidí a neslyší. Ostatní senzorycké funkce jsou také nezralé. K nalezení matky, aby se mohlo krmit, mládě využívá zejména čich a posléze i vestibulární

systém. Čichové ústrojí je ale při narození také nevyzrálé (*Clarac et al., 1998*). Schopnost rozlišení pachů mláďat je nižší a postupně se zdokonaluje. Čenichání „sniffing“ je charakteristické chování potkana a dá se pozorovat brzy po narození (*Welker, 1964*). Altman a Sudarshan (*1975*) popisují reakci na čichový podnět (čenichání a orientace směrem k matce a sourozencům) ojedinele od 2. dne. Postupně se frekvence čenichání zvyšuje až do 18 dne, kdy dochází k fázi plató.

Vestibulární systém se dotváří i postnatálně. V prvních dnech po narození dozrávají vláskové buňky vestibulárního systému. Mezi 6. a 9. dnem myelinizují aferentní vestibulární vlákna. Od 14. dne se myelinizují eferentní vestibulární vlákna a jsou plně vyvinuta na konci třetího týdne života. Sluch dozrává 12. den po narození (*Clarac et al., 1998*). Oči se mláďatům rozlepují 14. - 15. den po narození (*Altman a Sudarshan, 1975*). Vnímání propriocepce a podnětů z vestibulárního systému v prvním týdnu života ukazuje reakce v „body tilt“ testu, kdy je potkan umístěn na plošinu, které je následně sklopena o 45°. Test ukázal uniformní reakci 6 denních, kdy náklon vyvolal stabilizační reakci, která spočívala v bilaterální extenzi dolních končetin. Extenze je realizována v kyčelním, kolenním i hlezenním kloubu. Vyvažování je ale patrné hned po narození, ale extenze zadních končetin je jen částečná (*Brocard et al., 1999*).

1.3.2 Vývoj vzpřimování potkana

Novorozená mláďata zaujímají pronační pozici. Hlava je přizvednutá, nejde však o aktivní pohyb, ale pouze pasivní zakřivení páteře. Končetiny volně extendované (viz obr. 6). Aktivní elevace hlavy začíná 8. den po narození (*Jamon a Clarac, 1998*), ojedinele se může odlehčení hlavy od podložky objevovat už od 4. dne (*Altman a Sudarshan, 1975*). Nejprve se objevují horizontální pohyby krční páteře s hlavou položenou na podložce, od 5. dne potom vertikální pohyby krční páteře a atlanto-kraniálního skloubení (*Lelard, Jamon et al., 2006*).



Obr. 6 – Rentgenový snímek klidové pozice potkana 2., 5, 12., 13. a 33. den po narození (Lelard et al., 2006)

Ramena od druhého týdne života zůstávají v elevaci téměř stále a končetiny se postupně přibližují k ose těla. Mezi 6. a 11. dnem po narození je postavení krční páteře více horizontálně než v prvním týdnu života. Je to způsobeno změnou nastavení páteře, zejména větší extenzí cervikotorakálním přechodu a vzrůstající ventrální flexí v cervikokraniálním přechodu. Od 9. dne přední končetiny dokážou udržet váhu přední části těla. Od 13. dne dochází ke vzpřímení zadní části těla a elevaci pánve.

U 14 denních potkanů se objevuje pohyb do vertikály – „rearing“. Jde o vzpřímení na zadních končetinách s cílem uvolnit přední končetiny pro manipulaci (Clarac et al., 1998). Stavění se na zadní značí funkční maturaci zadních končetin, zpočátku se zvířata staví s oporou předních končetin. Během třiminutového pozorování v open fieldu Altman a Sudarshan (1975) popisují četnost vzpřímení na zadních více než jedenkrát od 18. dne po narození a nadále roste do dospělosti.

Od 15. dne po narození tráví většinu dne vzpřímení na všech čtyřech.

Na konci druhého týdne života se začínají rozlepovat oči, k úplnému otevření dochází 14. - 15. den po narození (Altman a Sudarshan, 1975). Po otevření očí se pohyb hlavy v sagitální rovině děje převážně v atlantookcipitálním skloubení.

1.3.3 Vývoj lokomoce potkana

Mezi motorické schopnosti zvířat patří také řada automatických pohybových vzorů, na příklad dýchání, lokomoce (chůze, plavání, běh atd.), žvýkání, polykání atd. Tyto automatizované činnosti řídí centrální generátory pohybu. Ty jsou definovány jako vzájemně propojené sety neuronů, které dokáží generovat bazální výstupní vzor zásadní pro pohyb bez jakékoliv aferentního vstupu z motorického aparátu. CPG obratlovců zřizují nejnižší úroveň motorické kontroly. Utvářejí se v průběhu embryonálního vývoje a jsou funkční hned po narození. Mohou být detekovány již po dvou týdnech embryonálního vývoje (*Archavsky, 2016*).

Strukturální a funkční podoba CPG je geneticky determinovaná. Spinální mechanismy pro kontrolu pohybu zadních končetin se u potkana nachází v segmentech Th12 – L6, pro kontrolu lokomoce v segmentech L1 – L2 (*Archavsky, 2016*), centrální generátory pohybu řídící rytmus lokomoce se nacházejí v segmentech L1-L4 (*Deliagina et al., 1983*) ventrolaterálně v šedé hmotě míchy (*Orlovsky a Feldman, 1972*). Přesný mechanismus lokomočního rytmu a zdroje signálu je zatím neznámý (*Archavsky, 2016*).

Po narození dochází k diferenciaci svalových vláken na pomalá a rychlá. Motoneurony, které inervují končetiny, se začínají diferencovat během embryogeneze mezi 11. a 13. dnem dále vyvíjejí během dvou týdnů po narození (*Tanaka et al., 1992*).

Pro vývoj lokomoce je nezbytné, aby kosterní svaly plnily antigravitační funkci a zároveň umožňovaly pohyb. Geisler et al. (*1993*) dělí vývoj po narození na tři fáze: 4. - 5. den po narození, kdy se objevuje pouze elevace hlavy a hledací pohyby, od 6. do 13. dne jsou mláďata schopná ujit pár kroků s odlehčeným trupem od podložky a od 16. dne se vyvíjejí komplexní motorické vzory jako lokomoce, stavění se na zadní a péče o srst. Pro popis motorického vývoje laboratorního potkana jsem vycházela hlavně ze dvou studií. H. C. Geisler, J. Westerga a A. Gramsbergen (*1993*) pozorovali od 2. do 20. dne po narození tři smíšené vrhy potkanů, dva po sedmi a jeden po 10 mláďatech. Sledovali spontánní hybnost mláďat ve výběhu 100x15 cm po 10 minut každý den.

Podrobnou studii o vývoji potkana udělali J. Altman a K. Sudarhan (*1975*). Sledovali také mláďata potkanů obou pohlaví od narození po dospělost. Zvířata byla pozorována každý den po 3 minuty v open fieldu (výběh 50x50 cm).

1.3.3.1 0-14 dnů po narození

Mláďata se rodí velmi nezralá a jejich hlavními aktivitou je spánek, případně krmení a s tím spojené hledací pohyby k nalezení matky. Po narození jsou mláďata převážně nehybná a většinu času tráví v pronační pozici (Altman, Sudarshan, 1975). Naopak při krmení jsou častěji v supinační pozici, dle studie Davida Eliama (1998), která se zabývala popisem motorických vzorů 1 denních potkanů, ze 106 případů, kdy se mládě krmilo od matky, 102 případů (tj. 96.2 %) zaujímal supinační pozici.

Začínají se objevovat spontánní pohyby končetin, ale trup i končetiny přetrvávají na podložce. Prsty a přední tlapy sevřené, natažené a slouží jako pádla. Zatím ale jejich odraz nevede k pohybu vpřed. Chybí vzpřímení pánve přes zadní končetiny, a proto zadní končetiny vykonávají krouživé pohyby po podložce. Pohyby předních a zadních končetin není koordinovaný. Protože zadní končetiny zatím nejsou schopné nést váhu pánve, aby se vzpřímila nad podložku, pohyb nevede k lokomoci, ale dochází k rotaci těla v oblasti pánve, tzv. pivotování. Nejprve se vyvíjí odpichování „punting“ s nekoordinovaným pohybem předních končetin. Až později se objevuje vyspělejší forma pivotování šlapání „treading“, kdy je hlava držena nad podložkou a přední končetiny společně provádějí pohyb doprava nebo doleva (Altman, Sudarshan, 1975).

5. den dokáží mláďata zvednout hlavu a může se začít objevovat odlehčování trupu (Geisler, 1993). Altman a Sudashan (1975) popisují elevaci hlavy u všech pozorovaných mláďat od 8. dne, nejprve po krátkých intervalech, které se postupně prodlužují. Pivotování mění na plazení, které už slouží mláděti k pohybu vpřed. Ani při plazení nedochází k úplnému odlehčení trupu, jde pouze o odrazy končetinami vedle těla (Altman a Sudarshan, 1975, Geisler et al., 1993).

Cyklus plazení Eliam (1998) popisuje tak, že po kroku zadní končetinou (PZK), následuje krok ipsilaterální přední končetinou (PPK) a potom krok kontralaterální zadní končetinou (LZK) následovaný přední končetinou (LPK). Od 10. dne dochází ke krátkodobému odlehčení trupu a zmenšení opěrné báze jen na tlapy a prsty (Altman, Sudarshan, 1975).

První kroky se objevují 12. - 13. den (Jamon a Clarac, 1998), ale trup není dostatečně stabilizován a chůze je neobratná a roztřesená. Přední končetiny jsou drženy v abdukci a zevní rotaci. Od 14. dne po narození se začaly objevovat pohyby spojené s péčí o srst a stoj na zadních s oporou o přední končetiny (Geisler et al., 1993).

1.3.3.2 15 dnů po narození

Na konci druhého týdne po narození nastávají výrazné změny v motorice. Mláďatům se rozlepují oči a svalstvo trupu je dostatečně vyvinuto na to, aby byl antigravitačně držen po celou dobu pozorování. S tím souvisí výrazné změny způsobu chůze. (*Altman, Sudarshan, 1975*).

Od 15. dne tráví potkan většinu času na čtyřech a ukazuje velký repertoár motorických schopností (*Jamon a Clarac, 1998*). Ramenní a kyčelní klouby jsou drženy ve stejné výšce a trup začíná být stabilní. Pohyb končetin i trupu je plynulejší a celkově se zvyšuje tempo lokomoce (*Geisler, 1993*). Mláďata se začínají pohybovat vyspělým vzorem. Zpočátku je chůze opatrná, ale od 16. dne můžeme pozorovat i běh, při kterém ale může docházet k neobratným podklouznutím (*Altman, Sudarshan, 1975*). Přední končetiny jsou trvale addukovány a již nedochází k zevní rotaci v ramenních kloubech (*Geisler et al., 1993*).

1.3.3.3 18-21 dnů po narození

Hlava je v elevaci po celou dobu pozorování (*Altman, Sudarshan, 1975*). Dále se vyvíjí svaly a jejich funkce. Synchronizace pohybu končetin a kontrakce zádových svalů je důležitou součástí stabilizace trupu a vyspělé kvadrupedální lokomoce. K takové úrovni posturální kontroly dochází 21. den po narození, kdy je lokomoce mláďete shodná s lokomocí dospělého jedince (*Gramsbergen, 1998*). Pokud se mláďata pohybují po hrubém povrchu, obratnou lokomoci vidíme už okolo 16. dne, chůze a běh po hladkém povrchu je náročnější, a proto dozrává až mezi 19. a 20. dnem (*Altman, Sudarshan, 1975*).

1.3.3.4 25 dnů po narození až do dospělosti

Po třetím týdnu vývoje mláďete potkana je lokomoce shodná s dospělým jedincem. Vrcholí hravé období a velmi časté je zápasení mezi sourozenci. Potkan se dokáže přizpůsobit při pohybu po různých površích. Dochází také ke zdokonalení komplexních motorických vzorů, jako je skákání (*Altman, Sudarshan, 1975*).

1.3.4 Vývoj plavání laboratorního potkana

Za normálních podmínek se chůze u mláďete potkana objevuje až okolo 12. dne po narození i přes to, že centrální generátory pohybu jsou funkční dříve. Svaly jsou ale natolik slabé, že nedokáží zajistit posturální držení v gravitačním poli. Vývoj rytmických pohybů končetin můžeme sledovat při plavání, protože pohyb ve vodě není tak namáhavý (*Bekoff et al., 1979, Shapiro et al., 1970*). Reflex plavání je u potkana vrozený a při ponoření do vody

jsou plavací pohyby končetin patrné už u novorozeného mláděte (*Bekoff a Trainer, 1979*). Některá mláďata dokázala plavat už hodinu po narození (*Cazalets et al., 1990*). Stupeň vývoje plavání odráží maturaci mozkového kmene a míchy, a proto je hodnocení plavání využíváno pro posouzení stadia vývoje (*Shapiro et al., 1970*).

Podrobně se popisem plovacího vzoru potkana se zabýval *Cazalets et al. (1990)* pomocí elektromyografické analýzy plovacích pohybů mláďat hned po narození. Sledovali vývoj plavání u 100 potkanů 3., 8. a 15. den po narození.

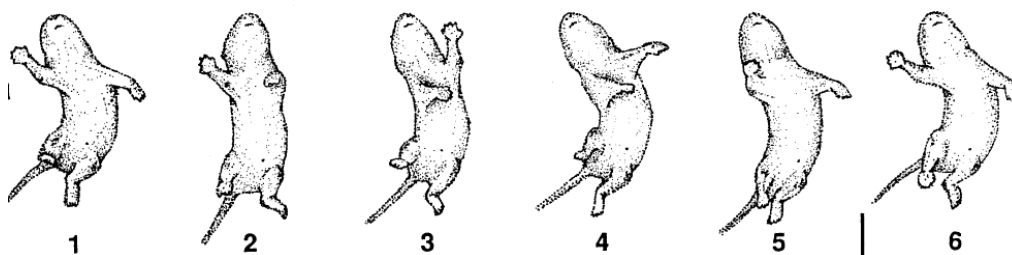
Detailně je plovací vzor potkana popsán také v práci *Nakajima et al. (1998)*. Cílem studie bylo zdokumentovat vliv para-chlorophenylalaninu (PCPA) na postnatální motorický vývoj. Porovnávali plavání kontrolní skupiny pocházející z normální gravidity s potkany, jejichž matkám byl během gravidity podáván PCPA. V této práci budu popisovat pouze fyziologický vývoj plavání kontrolní skupiny zvířat.

Vývoj motorického vzoru plavání pro přední a zadní končetiny není lineární, nevyvíjejí se stejně (*Cazalets, 1990*). Vývoj koordinace plovacích pohybů probíhá rostrokaudálně. Přední končetiny jsou používány postupně méně a méně a v dospělém vzoru můžeme vidět jejich minimální zapojení (*Shapiro et al., 1970*). Vývoj plavání potkana lze rozdělit do tří fází. V první fázi převažuje pohyb předních končetin, ve druhé se pohybují přední i zadní a ve třetí dominuje pohyb zadních končetin.

1.3.4.1 Plavání s dominantními pohyby předních končetin

V počáteční fázi, do 2. dne po narození, dominuje pohyb předních končetin (*Cazalets et al., 1990; Nakajima et al., 1998*). Záběry předních končetin jsou neobratné a nepravidelné (*Nakajima et al., 1998*).

Plovací cyklus potkana starého 1 den (viz obr. 7) začíná natažením přední končetiny (PPK) do maximální ventrální flexe, potom se končetina postupně pohybuje zpět, do maximální extenze. Flexi přední končetiny (PPK) doprovází extenze kontralaterální přední končetiny (LPK). Zapojení zadních končetin se objevuje zřídka (*Nakajima et al., 1998*). Osa těla je vyklenuta doprava nebo doleva (*Cazalets, 1990*).

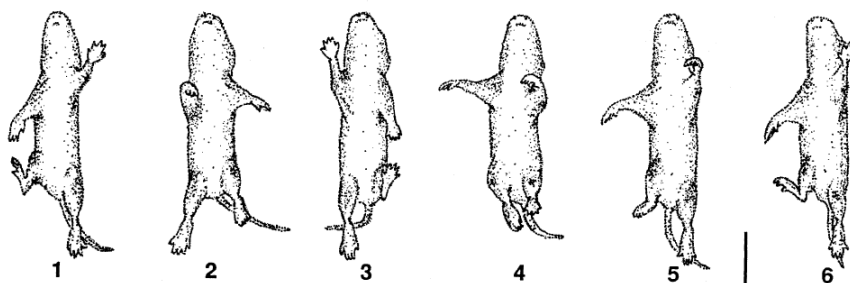


Obr. 7: Znárodnění jednoho plavacího cyklu u 1 den starého potkana (*Nakajima et al., 1998*)

1.3.4.2 Plavání s pohybem předních i zadních končetin

Druhá fáze začíná 3. den po narození. Začíná se pozvolna objevovat koordinovaný pohyb předních a zadních končetin (*Nakajima et al., 1998*). 8 denní mláďata používají k pohybu všechny čtyři končetiny (*Cazalets, 1990*).

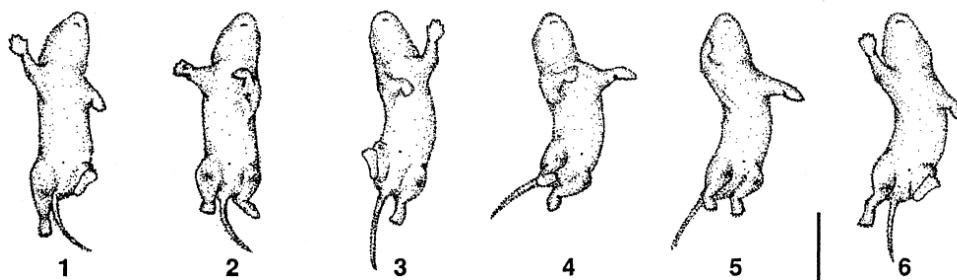
Plovací cyklus 3 dny starého potkana (viz obr. 8) začíná maximální ventrální flexí přední končetiny (PPK), tento pohyb doprovází maximální extenze kontralaterální přední končetiny (LPK), flexe kontralaterální zadní (LZK) a extenze homolaterální zadní končetiny (PZK) (*Nakajima et al., 1998*).



Obr. 8: Znárodnění jednoho plavacího cyklu u 3 dny starého potkana (*Nakajima et al., 1998*)

Rytmus záběrů zadními končetinami pozvolna nabývá na pravidelnosti. Nejprve frekvence pohybů končetin malá (1-2 Hz), postupně se zvyšuje a ve stáří 8 dnů je 2-3 Hz. Postupně se také prodlužuje doba, kdy potkan vydrží plavat (*Cazalets, 1990*).

6 denní mláďata předvádějí koordinovaný pohyb předními i zadními končetinami (viz obr. 9). Síla temp zadních končetin je zřetelně vyšší než u 3 denních mláďat. Přední část těla je držena výš než zadní a některá mláďata dokáží udržet čenich nad hladinou. Osa těla je přímá (*Nakajima et al., 1998*).



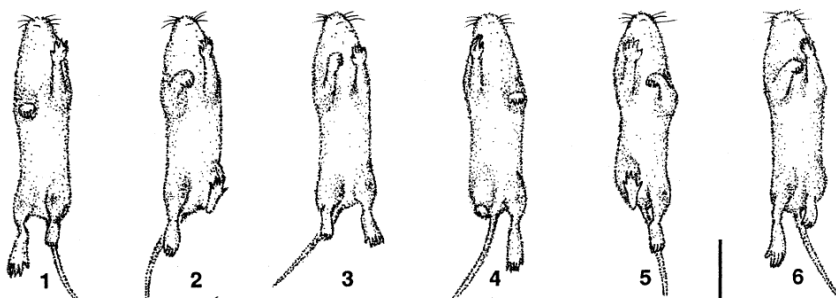
Obr. 9: Znárodnění jednoho plavacího cyklu u 6 dní starého potkana (*Nakajima et al., 1998*)

I když začnou být tempa pravidelná, aktivita centrálních generátorů pohybu spouštějící pohyb předních končetin zůstává dál nepravidelná až do úplného dozrání dospělého vzoru, kdy se přední končetiny na plavání nepodílejí. Odlišný druh kontroly a samostatný vývoj předních a zadních končetin může být na vrub rozdílnému používání končetin ve specifických motorických aktivitách. Zadní končetiny jsou hnací silou při lokomoci, jsou zásadní pro skoky, běh i plavání, kdežto přední jsou uzpůsobeny plnit rozmanité úkony často vyžadující úchopovou funkci (*Cazalets, 1990*).

1.3.4.3 Plavání s dominantními pohyby zadních končetin

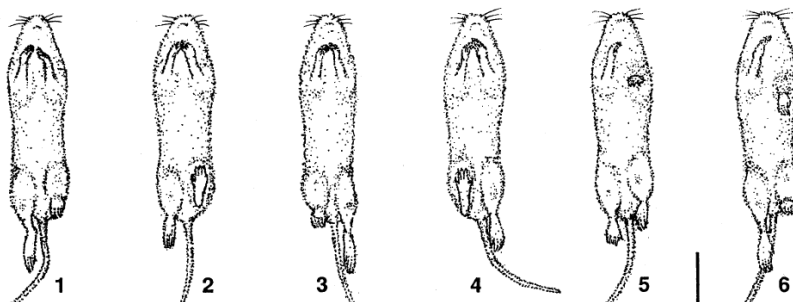
Třetí fáze nastupuje na konci 2. týdne života, Clarac et al. (1998) uvádí mezi 12. a 15. dnem po narození. Nakajima et al. (1998) popisují přechod k dospělému vzoru plavání mezi 12. a 17. dnem po narození. Dominantní jsou pohyby zadních končetin (*Nakajima et al., 1998*). Přední končetiny jsou během plavání extendované před tělem, jsou používány zřídka, jen pro prvních pár temp a při přiblížení ke kraji bazénu. Trup je stabilní a exkurze páteře nejsou tak znatelné jako v předešlých fázích vývoje (*Cazalets et al., 1990*).

Plavací cyklus 14 denního potkana (viz obr. 10) charakterizuje držení předních končetin blízko u těla. Využívány jsou pouze distální části, oproti dřívějšímu vzoru klesá rozsah pohybu. Flexi přední končetiny (PPK) doprovází extenze kontralaterální zadní končetiny (LZK). Osa těla je rovnoběžná s vodní hladinou a čenich je držen nad vodou (*Nakajima et al., 1998*). Frekvence temp zadních končetin vzrůstá na 3-4 Hz a je shodná s dospělým vzorem (*Cazalets, 1990*).



Obr. 10: Znárodnění jednoho plavacího cyklu u 14 dní starého potkana (*Nakajima et al., 1998*)

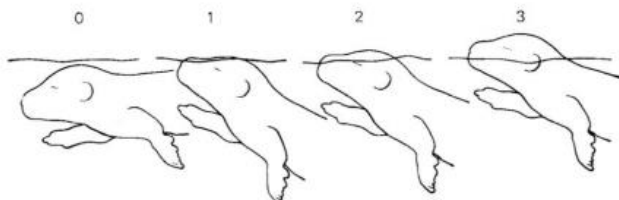
Stereotyp plavání postupně maturuje, je plynulejší a efektivnější. U 22 denních mláďat je dospělý vzor plavání plně vyvinutý (viz obr. 11). Plovací pohyb je realizován silnými záběry zadních končetin (*Nakajima et al., 1998*).



Obr. 11: Znárodnění jednoho plavacího cyklu u 22 dní starého potkana (*Nakajima et al., 1998*)

1.3.4.4 Poloha hlavy při plavání

Čím starší mláďe potkana je, tím více se snaží držet hlavu a čenich nad vodou. Poloha hlavy je jedním z faktorů určení vspělosti vzoru plavání. V případě, že má mláďe čenich pod vodou, plavání je nezralé. Mláďe s plně vyvinutým juvenilním vzorem plavání by mělo udržet čenich nad hladinou. Shapiro et al. (1970) popisují schopnost udržet hlavu nad vodou od 12. dne po narození.



Obr. 12 – Hodnocení polohy hlavy a čenichu (*Shapiro et al., 1970*)

2 Cíle a hypotézy

Cílem této diplomové práce bylo uvést přehled nežádoucích účinků fenytoinu na motoriku, popsat vývoj posturálního držení, lokomoce a plavání laboratorního potkana a následně porovnat výsledky měření provedeného v rámci této práce s poznatky z nashromážděné literatury a výsledky bakalářské práce, na kterou tato diplomová práce navazuje.

Hypotéza 1

H_0 Motorické dovednosti potkanů nejsou po podání PHT signifikantně změněny oproti kontrolní skupině.

H_A Motorické dovednosti potkanů jsou po podání PHT ovlivněny oproti kontrolní skupině signifikantně alespoň v jednom testu.

Hypotéza 2

H_0 Koordinace plavání potkanů není po podání fenytoinu signifikantně změněna oproti kontrolní skupině.

H_A Koordinace plavání potkanů je po podání fenytoinu signifikantně odlišná oproti kontrolní skupině.

Hypotéza 3

H_0 Motorické schopnosti skupiny s vyšší dávkou fenytoinu a skupiny s dávkou nižší se neliší.

H_A Vedlejší účinky jsou patrnější u skupiny s vyšší dávkou.

Hypotéza 4

H_0 Vedlejší účinky jsou stejně výrazné v průběhu vývoje.

H_A U mladších jedinců jsou vedlejší účinky po podání fenytoinu výraznější než u starších potkanů

3 Metodika

3.1 Rešerše

Vypracovali jsme rešerši odborné literatury cílené na motorický vývoj laboratorního potkana. Zaměřili jsme se také na vývoj plavacího vzoru mláďat potkana. Poznatky o vývoji potkana jsou uvedeny v kapitole 1.2.5. Z poznatků o vývoji potkana jsme vyhotovili baterii motorických testů a hodnotící protokol pro analýzu plavání.

Dále jsme provedli rešerši zabývající se antiepileptiky, především fenytoinem. V kapitole 1.2.5 jsou popsány vedlejší účinky na organismus a experimenty, které tyto účinky potvrzují. Zabývali jsme se zvláště experimentálními studiemi popisující efekt fenytoinu na vývoj motoriky u zvířecích modelů.

3.2 Experimentální část práce

3.2.1 Laboratorní zvířata

K provedení experimentu byli využiti samci potkanů kmene Wistar. Testovány byly tři věkové skupiny: 12 denní, 18 denní a 25 denní zvířata. Do 21. dne po narození jsou zvířata chována společně s matkou, poté jsou odstavena a oddělena od matky. Potkani byli umístěni ve zvěřinci se stabilním prostředím. Ve zvěřinci je udržován pravidelný světelný režim po 12 hodinách (6:00 – 18:00). Teplota je udržovaná na $22 \pm 1^\circ\text{C}$ a je držena konstantní vlhkost $55 \pm 5\%$. V průběhu celého testování bylo se zvířaty zacházeno s maximální ohleduplností.

Nejprve jsme provedli jedno přípravné měření bez aplikace látky pro každou věkovou kategorii pro seznámení se s testováním. Pro další měření byla mláďata rozdělena do tří skupin po deseti podle podané látky. Zvířata byla testována dvakrát. Nejprve proběhlo kontrolní testování a hodinu po aplikaci fenytoinu nebo rozpouštědla bylo provedeno druhé měření. Testování prováděl vždy stejný člověk, v neměnném pořadí a probíhalo vždy odpoledne mezi 14:00 a 17:00.

3.2.2 Aplikace fenytoinu

Po prvním měření byla potkanům aplikována dávka fenytoinu 60 mg/kg nebo 30 mg/kg. Fenytoin není rozpustný ve vodě, a proto bylo pro vyloučení účinku polyethylenglykolu nebo alkoholu kontrolní skupině podáno tříložkové rozpouštědlo (polyethylenglykol, alkohol, voda).

3.2.3 Statistické zpracování dat

Naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány na AV ČR analýzou provedenou softwarem SigmaStat (SigmaStat® SPSS). Pro porovnání více skupin dat byla použita analýzy rozptylu ANOVA. Pro srovnání dvou skupin dat byl použit t-test a Mann-Whittneyův test podle toho, zda data odpovídala normálnímu rozložení. Hladina statistické významnosti byla u všech testovaných dat stanovena na $P < 0,05$.

3.2.4 Analýza plavání

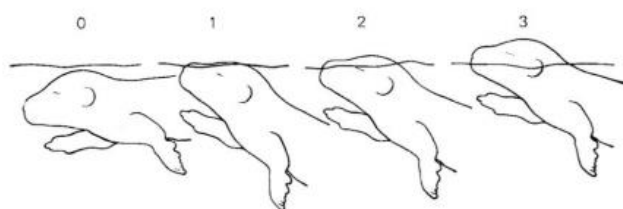
Pro hodnocení plavání byly využity dvě nádrže z průhledného plastu. Pro 12denní a 18denní mláďata byla využita menší nádrž o rozměrech 35x10x20 cm, 25denní mláďata byla pozorována v nádrži o rozměrech 50x15x30cm. Pro snazší pozorování a hodnocení byla zadní strana polepena černým papírem. V nádrži byla udržována konstantní teplota $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Nádrž byla naplněna tak, aby mláďata nedosáhla na dno a aby nemohla z nádrže vylézt.

Plavání bylo hodnoceno 12., 18. a 25. den po narození. Po dobu testování byla mláďata odebrána matce a umístěna do klece na elektricky vyhřívanou podložku, aby byl zajištěn jejich tepelný komfort. Nejprve byla mláďata zvážena a označena. Poté bylo provedeno první měření. Po měření bylo mláďe osušeno a byla mu aplikována dávka fenytoinu nebo rozpouštědla. Poté bylo na 60 minut vráceno do klece k matce. Po uplynutí hodiny bylo provedeno druhé měření.



Obr. 13 – Testování plavání (archiv autorky)

Testování bylo zaznamenáváno na kameru. Pro hodnocení jsme počítali, kolikrát mládě přeplavalo nádrž, a hodnotili jsme vyspělost plavání. Posuzovali jsme zapojení končetin do plavacího vzoru. Nejmladší typ plavání je s dominantním pohybem předních končetin (ohodnocen 1), střední je plavání všemi čtyřmi končetinami (ohodnocen 2), nejvyspělejší je plavání s dominantním pohybem zadních končetin (ohodnocen 3). Dále jsme posuzovali schopnost udržet hlavu a čenich nad vodou. K tomu jsme využili ohodnocení 0-3 dle Shapira viz obr. 14.



Obr. 14 – Hodnocení polohy hlavy a čenichu (*Shapiro et al., 1970*)

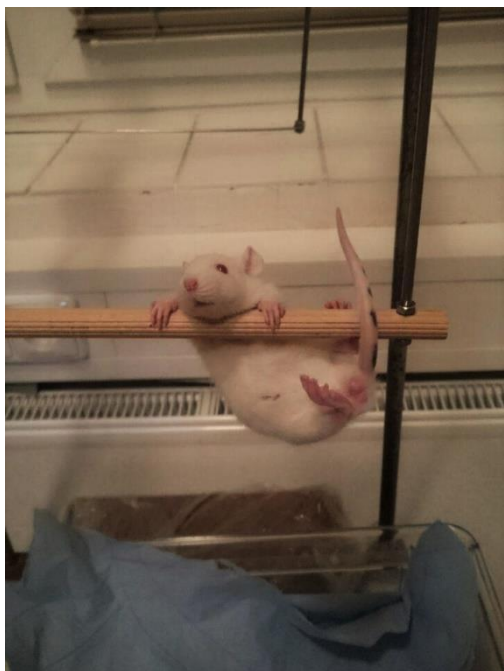
3.2.5 Baterie motorických testů

Pro hodnocení motorických schopností bylo využito tří testů a pozorování spontánní hybnosti, upravených podle úrovně vývoje zvířat. 12denní mláďata absolvovala pouze test bar holding, 18denní a 25denní mláďata jsme hodnotili bar holding testem a testem chůze po pravidelném a nepravidelném žebříku.

Měření probíhalo obdobně jako při hodnocení plavání. Nejprve byla mláďata zvážena a označena. Následně jsme provedli první měření. Poté byla aplikována dávka fenytoinu nebo rozpouštědla. Po 60 minutách, kdy bylo mládě vráceno do klece k matce, bylo provedeno měření druhé.

3.2.5.1 Bar holding test

Při tomto testu je zvíře umístěno za přední končetiny na hrazdu (viz obr. 15). Pod hrazdou je umístěn molitan, aby se zvířata nezranila. Hodnotí se čas, po který se potkan udrží na hrazdě. U starších mláďat s dobrou motorickou koordinací lze pozorovat vylezení na hrazdu a kvadrupedální lokomoci. Při testování jsme měřili čas, po který se zvíře udrželo na hrazdě. Limitem bylo 60 s.



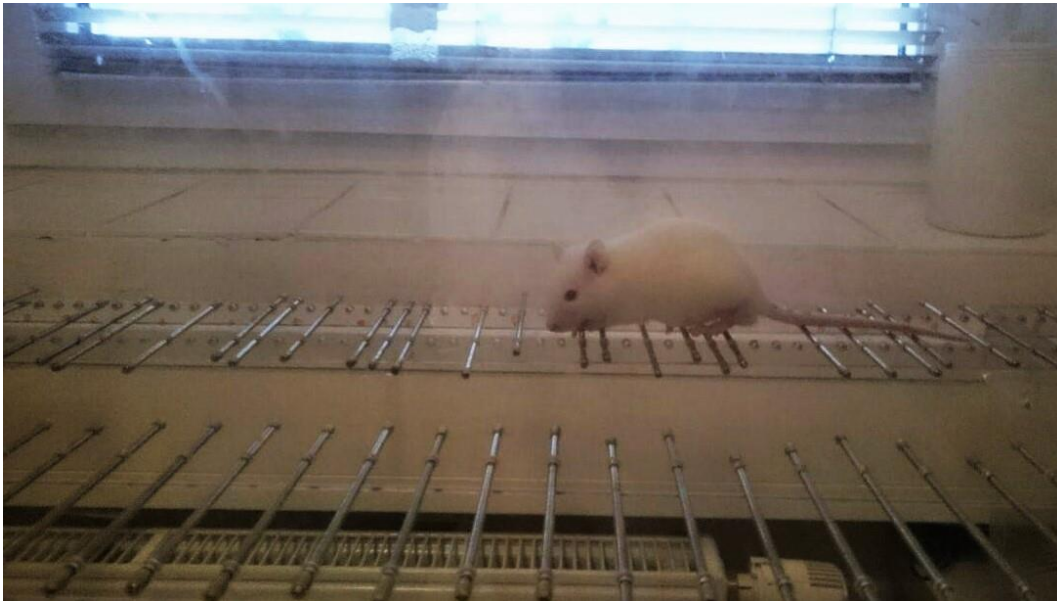
Obr. 15 – Bar holding test (*archiv autorky*)

3.2.5.2 Test chůze po pravidelném a nepravidelném vodorovném žebříku

Pro testování chůze po vodorovných žebřících se využívá konstrukce ze dvou plexiskel, které jsou spojeny kovovými příčkami. Žebřík tvořený příčkami je dlouhý 1 m a je umístěn 30 cm nad podložkou. Rozestoupení příček pravidelného žebříku je 1 cm, u nepravidelného jsou rozmístěny ve vzdálenosti od 1 do 5 cm podle neměnného schématu (*Metz et al., 2009*).

Testována byla 18denní a 25 denní mláďata. Pro 12denní jsou i příčky pravidelného žebříku příliš daleko od sebe, aby se po nich mláďata dokázala pohybovat. Chůze po nepravidelném žebříku je obtížnější na pozornost a koordinaci pohybu, proto byla testována nejprve chůze po pravidelném žebříku.

Po testování na hrazdě bylo mládě umístěno na začátek pravidelného žebříku. Na konci obou žebříků byla umístěna klec se sourozenci, aby mládě motivovala k pohybu. Hodnotili jsme čas, za který mládě překonalo žebřík, vzdálenost a počet chyb, které mládě udělalo. Pokud potkan nezdolal celou vzdálenost do 60 s, byla zaznamenána vzdálenost, kterou za tu dobu urazil. Jako chyba bylo počítáno sklouznutí z příčky nebo krok mimo příčku.

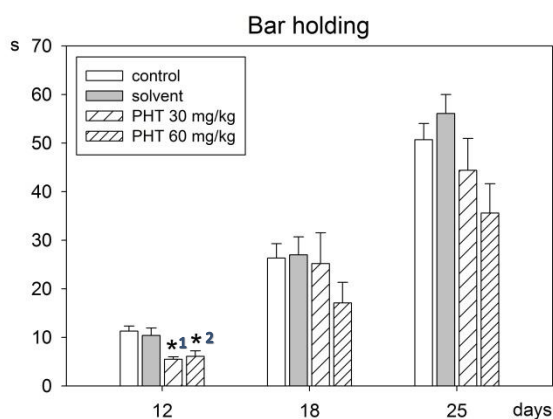


Obr. 16 – Test chůze po pravidelném a nepravidelném žebříku (*archiv autorky*)

4 Výsledky

4.1 Bar holding test

V testu visu na hrazdě jsme testovali všechna vývojová stádia. S přibývajícím věkem se postupně prodlužoval čas, po který se potkan udržel na hrazdě po celou dobu měření (60 s). Subjektivně bylo možné pozorovat největší dyskoordinaci předních a zadních končetin u mlád'at, kterým byl podán fenytoinu, zjm. vyšší dávka 60 mg/kg. Ale statisticky významné výsledky byly zaznamenány pouze u 12denních zvířat. Ta se udržela oproti kontrolní skupině, i oproti skupině, které bylo podáno rozpouštědlo, v obou dávkách fenytoinu kratší dobu (viz obr. 17). Rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou, které bylo podáno rozpouštědlo, nebyly významné.



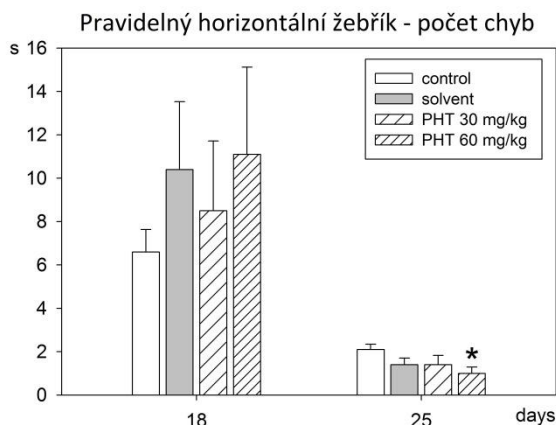
Obr. 17 – Sloupcový diagram ukazující výsledky bar holding testu u 12 - 25denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje čas (s), po který se zvířata udržela na hrazdě; * v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s 60 mg/kg PHT a kontrolní skupinou

4.2 Test chůze po pravidelném horizontálním žebříku

Chůzi po vodorovném žebříku jsme testovali u 18denních a 25denních mlád'at. Hodnotili jsme čas, který potkan potřeboval k překonání žebříku, vzdálenost žebříku v procentech, kterou urazil a počet chyb, které potkan udělal. Stejně jako u testu bar holding se stářím rostla schopnost potkanů test provést. 25denní mlád'ata urazila vzdálenost rychleji a udělala méně chyb než 18denní mlád'ata.

U zvířat, kterým byl podán fenytoin, byla patrná horší koordinace a tendence k více chybám. Statisticky významně se to projevilo u 25denních potkanů v počtu chyb mezi kontrolní skupinou a skupinou, které byl podán fenytoin 60 mg/kg (viz obr. 18). Mezi

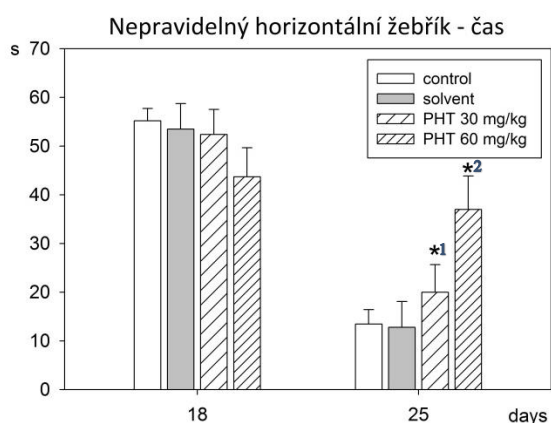
kontrolní skupinou a skupinou, které bylo podáno rozpouštědlo, nebyly zaznamenány významné rozdíly ani u jedné z věkových skupin.



Obr. 18 – Sloupcový diagram ukazující počet chyb při testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku u 15 a 25denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje počet chyb; * v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s 60 mg/kg PHT a kontrolní skupinou

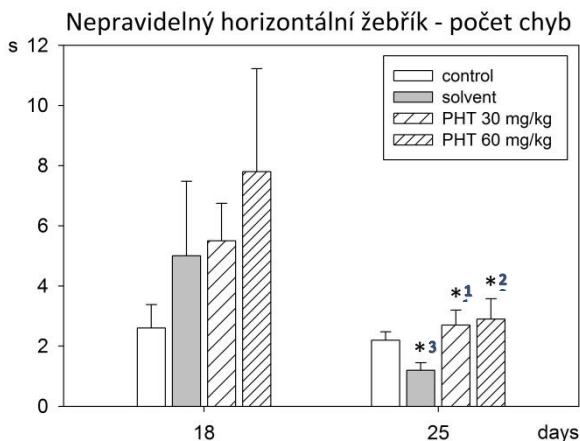
4.3 Test chůze po nepravidelném horizontálním žebříku

U testu chůze po nepravidelném žebříku jsme hodnotili stejně jako u pravidelného čas, vzdálenost a počet chyb. Pro velký rozptyl dat nebyly zaznamenány významné rozdíly u 18denních mláďat. U 25denních se signifikantní rozdíly ukázaly v čase, který zvířata potřebovala k překonání žebříku u obou skupin, kterým byl podán fenytoin, oproti kontrolním potkanům (viz obr. 19).



Obr. 19 - Sloupcový diagram ukazující počet chyb při testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku u 15 a 25denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje čas (s), za který zvíře žebřík přešlo; *¹ v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s 30 mg/kg PHT a kontrolní skupinou, *² v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s PHT 60 mg/kg a kontrolní skupinou

U 25denních se také ukázaly rozdíly v počtu chyb. Skupina, které bylo podáno rozpouštědlo, udělala méně chyb než kontrolní skupina. Naopak skupiny, kterým byl podán fenytoin chybovaly více (viz obr. 20).



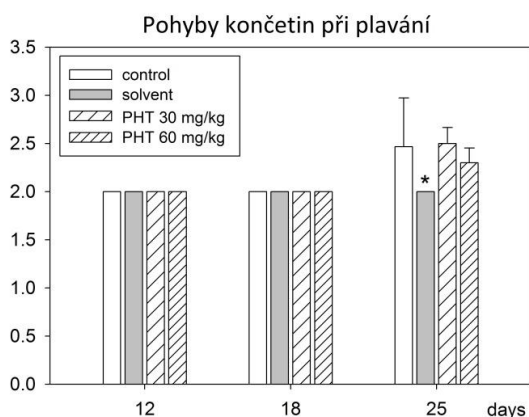
Obr. 20 - Sloupcový diagram ukazující počet chyb při testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku u 15 a 25denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje počet chyb; *¹ v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s 30 mg/kg PHT a kontrolní skupinou, *² v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s PHT 60 mg/kg a kontrolní skupinou, *³ v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s rozpouštědlem a kontrolní skupinou

4.4 Plavání

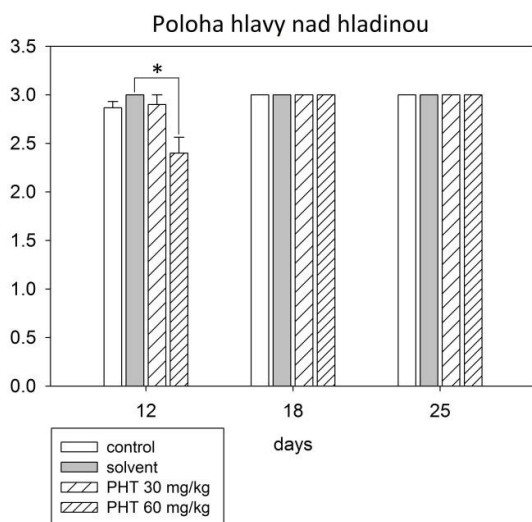
Hodnocení plavání jsme provedli u všech tří vývojových skupin. Posuzovali jsme zapojení předních a zadních končetin, schopnost držet hlavu nad vodní hladinou a počet přeplavání nádrže.

Při hodnocení pohybů končetin byly rozdíly mezi kontrolními zvířaty a skupinami, kterým byla podána vyšší dávka fenytoinu, subjektivně pozorovatelné. Koordinace končetin mláďat s fenytoinem se zdála horší než u kontrolního testování. Statisticky významný výsledek oproti kontrolní skupině se ukázal pouze při porovnání kontrolní skupiny se skupinou s rozpouštědlem (viz obr. 21).

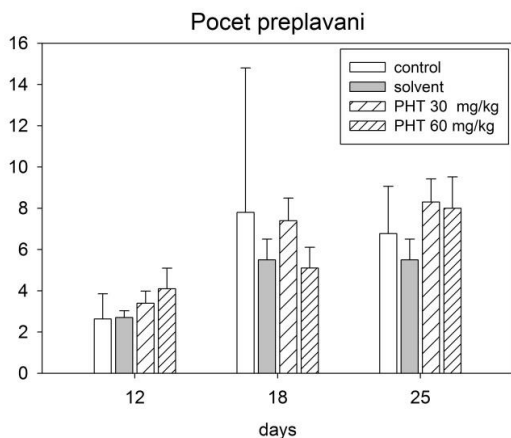
Poloha hlavy a čenichu nad hladinou vody se měnila pouze u nejmladších mláďat. U 12denních potkanů jsme zaznamenali signifikantní rozdíly mezi skupinou, které bylo podáno rozpouštědlo a skupinou s vyšší dávkou fenytoinu (viz obr. 22). Při hodnocení počtu přeplavání nádrže nebyly pro velký rozptyl dat patrné žádné statisticky významné rozdíly (viz obr. 23).



Obr. 21 - Sloupcový diagram ukazující úroveň plavacího vzoru 12 až 25denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje úroveň plavacího vzoru; * v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s rozpouštědlem a kontrolní skupinou



Obr. 22 - Sloupcový diagram ukazující úroveň ponoření hlavy a čenichu u 12 až 25denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje stupeň ponoření; * v grafu znázorňuje signifikantní rozdíl mezi skupinou s 60 mg/kg PHT a skupinou s rozpouštědlem



Obr. 23 - Sloupcový diagram ukazující počet přeplavání nádrže u 12 až 25denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje počet přeplavání.

5 Testování hypotéz

Hypotéza 1

H_0 Byla odmítnuta pro signifikantní rozdíly při bar holding testu, při testu chůze po pravidelném žebříku v počtu chyb a při testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku v rychlosti a počtu chyb.

H_A Byla potvrzena, tj. motorika potkanů je po opakovaném podání PHT ovlivněna oproti kontrolní skupině signifikantně alespoň v jednom testu.

Hypotéza 2

H_0 Byla potvrzena, tj. nebylo prokázáno, že by byla koordinace plavání po podání fenytoinu signifikantně změněna oproti kontrolní skupině.

H_A Byla odmítnuta.

Hypotéza 3

H_0 Byla odmítnuta pro rozdíly mezi vyšší a nižší dávkou fenytoinu v rychlosti chůze po nepravidelném žebříku.

H_A Byla odmítnuta, tj. vedlejší účinky jsou patrnější u skupiny s vyšší dávkou.

Hypotéza 4

H_0 Byla odmítnuta, protože rozdíly ve výsledcích se objevují u 12denních i 25 denních zvířat.

H_A Byla potvrzena, tj. nebylo prokázáno, že by fenytoin způsoboval výraznější vedlejší účinky u mladších mláďat.

6 Diskuse

Vedlejší účinky fenytoinu při dlouhodobém užívání jsou podloženy mnoha studiemi. Byly popsány jeho toxické účinky na nervovou soustavu (*Liu et al., 1997*), z níž fenytoin nejvíce působí na buňky mozečku. Zde zapříčiňuje strukturální a funkční změny Purkyňových buněk (*Mallow et al., 1980*). Zánik buněk a chabé vyvinutí dendritů byly popsáno na histologickém preparátu např. v práci *Ohmori et al. (1999)*. Poškození mozečku se může klinicky projevit ztrátou rovnováhy a narušením koordinace. Bylo prokázáno, že dlouhodobé užívání vede k atrofii mozečku a rozvoji cerebelární ataxie (*De Marcos et al., 2003*). Při užívání fenytoinu se může objevit také tremor nebo nystagmus (*Zeng et al., 2010*). Dále jsou popisovány negativní účinky fenytoinu na kognitivní schopnosti jako je paměť, schopnost rychlých reakcí (*Meador et al., 1995*), může také vést ke snížení schopnosti učení (*Shannon a Love, 2007*). Negativní efekt fenytoinu na schopnost zapamatování si proběhlé situace a schopnost prostorové představivosti byla zkoumán na zvířecím modelu při testu Morrisova vodního bludiště. Popsané zhoršení orientace a narušení paměti ale nebylo prokázáno (*Forcelli et al., 2011*). Ovlivnění výkonu potkanů v testu Morrisova vodního bludiště se neprojevovalo ani po akutním podání fenytoinu (*Barker-Haliski et al., 2016*).

Fenytoin má prokázané teratogenní účinky (*Seidl a Obenberger, 2015*) a jeho užívání v těhotenství může vést k rozvoji hydantoinového syndromu (*Nanda et al., 1998*), proto není indikován u žen ve fertilním věku. Dnes pro prokázané četné vedlejší účinky není ve většině případů používání fenytoinu doporučováno u nás (*Rektor a Ošlejšková, 2010*) ani v zahraniční literatuře (*Shih et al., 2016*). I tak pro své dobré antikonvulzivní působení stále využitelný je. Nadále je indikován při terapii status epilepticus (*Meierkord et al., 2006*) a dobré výsledky má také při terapii novorozeneckých záchvatů (*Solanki et al., 2015*). Jeho použití i mimo oblast epileptologie je zkoumáno i dnes např. při terapii rakoviny prsu nebo zánětu očního nervu (*Hesselink, Kopsky, 2017*).

Neurotoxické účinky fenytoinu lze dobře ukázat na zvířecích modelech. Po opakovaném podání myším mláďatům 2. až 4. den po narození, byla zaznamenaná hmotnost mozku celkově i pouze mozečku signifikantně nižší oproti kontrolní skupině (*Ohmori et al., 1999*).

V rámci této práce jsme testovali 12, 18 a 25denní mláďata potkana na bar holding testu a testem chůze po pravidelném a nepravidelném vodorovném žebříku. Cílem bylo zjistit, zda výsledky naší pilotní studie z roku 2015 mapující vliv fenytoinu na vývoj motoriky a

v literatuře zmiňované účinky na spontánní motoriku, koordinaci a chování budou patrné i po akutním podání.

Schopnost motorické koordinace jsme hodnotili hlavně testem chůze po pravidelném a nepravidelném vodorovném žebříku. Nejmladší skupina mláďat byla testována pouze visem na hrazdě. Všechny tři testy ukázaly rozdíly fenytoinových skupin oproti kontrolním zvířatům. 12denní mláďata měla signifikantně horší výsledek v bar holding testu oproti kontrolní skupině v obou skupinách s fenytoinem. U 18 a 25denních mláďat rozdíly prokázané nebyly. U 18denních mláďat nebyly prokázány rozdíly oproti kontrolní skupině ani v jednom testu chůze na vodorovném žebříku, protože rozptyl dat byl příliš velký. Některá mláďata do časového limitu testu se po žebříku nerozešla a některá jej přeběhla. U 25denních se ukázaly rozdíly v obou testech. V počtu chyb se od kontrolní skupiny signifikantně lišila skupina s PHT 30 mg/kg i PHT 60 mg/kg při chůzi po pravidelném i nepravidelném žebříku. Čas nutný k překonání žebříku byl prokazatelně delší při chůzi po nepravidelném horizontálním žebříku u skupiny s PHT 30 mg/kg i PHT 60 mg/kg. Chůze po nepravidelném žebříku je náročnější na pozornost a koordinaci zvířat, a proto je možné na něm citlivěji zachytit změny v motorice. Narušení motorického projevu potkanů potvrdila studie Patricka Forcelliho z roku 2011. Po opakovaném podání fenytoinu mláďatům byly popsány změny ve spontánní motorice a motorické koordinaci na rotarodu (*Forcelli et al., 2011*).

V rámci bakalářské práce jsme zkoumali efekt fenytoinu podaném po narození na motorické schopnosti v průběhu vývoje. U bar holding testu jsme zaznamenali signifikantní rozdíl pouze u 25denních mláďat s PHT 30 mg/kg oproti kontrolní skupině (*Matoušková, 2015*). Aktuální studie ukázala signifikantně horší výsledek v bar holding testu oproti kontrolní skupině 12denních mláďat po akutním podání fenytoinu v koncentraci 30 mg/kg i 60 mg/kg. Při testu chůze na žebřících se projevíly signifikantní rozdíly v čase chůze na pravidelné i nepravidelné variantě a v počtu chyb. Počet chyb byl prokazatelně vyšší u 22denních a 31denních mláďat s dávkou fenytoinu 60 mg/kg (*Matoušková, 2015*). Rozdíly při chůzi po žebřících ukázala i tato práce.

Studie týmu Barker-Haliski mapovala akutní efekt na motoriku po podání různých antiepileptik. Ukázalo se prokazatelné snížení vzdálenosti, kterou potkan spontánně urazil oproti kontrolní skupině s rozpouštědlem, a nižší četnost stavění se na zadní (*Barker-Haliski et al., 2016*). Popsaná chudší motorická aktivita souhlasí s výsledky naší práce při testu bar holding i při testech chůze po žebřících.

Při testu plavání jsme u všech věkových skupin potkanů pozorovali pouze 2. a 3. plavací vzor. 12denní a 18denní plavali všemi čtyřmi končetinami. U 25denních se objevovalo plavání s dominantním zapojením zadních končetin. Juvenilní typ jsme nepozorovali u žádného zvířete. Stejně tak při hodnocení polohy hlavy jsme nepozorovali nejméně vyzrálá stádia 0. a 1., ale pouze stádium 2. (hlava držena na hladině, čenich pod hladinou) a 3. (hlava držena nad hladinou). Porovnání polohy hlavy u 12denních potkanů s dávkou fenytoinu 60 mg/kg se skupinou, které bylo podáno rozpouštědlo ukázalo statisticky významný rozdíl. Mláďata s vyšší dávkou plavala ve více případech s čenichem pod hladinou než skupina s rozpouštědlem. Počet přeplavání ani hodnocení zapojení končetin do plavacího vzoru neukázal prokazatelné rozdíly. Subjektivně bylo možné pozorovat horší koordinaci plavání mezi kontrolní skupinou a skupinou s vyšší dávkou fenytoinu. Potkani s PHT 60 mg/kg nebyli schopní udržet směr ani osu těla. Pohyby končetin se zdály neohrabané až ataktické. Bohužel s dostupným vybavením nebylo možné tyto drobné odchylky kvantifikovat.

Výsledky zmíněných studií popisující ovlivnění motorických dovedností a potkana po podání fenytoinu ukazují větší neohrabanost a narušení koordinace pohybu. Totéž podpořila i tato studie. Horší výsledky při motorických testech byly patrné u obou dávek fenytoinu oproti kontrolní skupině. Nekoordinované pohyby jsme pozorovali také při plavání potkanů.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo popsat ovlivnění motoriky po akutním podání fenytoinu. Provedli jsme měření testy zaměřenými na motoriku a koordinaci na 12, 18 a 25denních zvířatech. Potkani byli rozděleni na kontrolní skupinu, kontrolní skupinu s rozpouštědlem, skupinu s vyšší dávkou fenytoinu (PHT 60 mg/kg) a skupinu s nižší dávkou fenytoinu (PHT 30 mg/kg). Výsledky jsme porovnali s daty ze zmíněné pilotní studie a s výsledky z nashromážděné literatury. Doplnili jsme tak výsledky předchozí studie zaměřené na motorické změny ve vývoji potkana po opakovaném podání fenytoinu. Výsledky obou prací ukázaly narušení motorické koordinace.

Potkany ve třech věkových stádiích jsme testovaly baterií motorických testů a analýzou plavání. Hodnotili jsme podle předem zadaných parametrů a zaznamenáno bylo i subjektivní hodnocení. U 12denních mláďat byly prokázány horší výsledky při bar holding testu, u 25denních mláďat jsme zaznamenali signifikantně více přešlapů při chůzi po horizontálním žebříku v pravidelné a nepravidelné modifikaci a delší čas pro překonání nepravidelného horizontálního žebříku. U 18 denních mláďat se nepodařilo pro velký rozptyl dat prokázat statisticky významné odchylky potkanů s fenytoinem oproti kontrolní skupině. Dále jsme porovnávali výsledky kontrolní skupiny a skupiny, které bylo podáno třísloužkové rozpouštědlo fenytoinu (polyethylenglykol, alkohol, voda). V žádném testu se prokázalo, že by rozpouštědlo mělo významný vliv na motorickou koordinaci.

Při plavání potkanů jsme pozorovali plavání s pohybem všech čtyř končetin u 12, 18 a některých 25denních mláďat a dospělý vzor s dominantním pohybem zadních končetin u některých 25denních potkanů. Ovlivnění motoriky fenytoinem bylo subjektivně patrné, ale hodnocené parametry významné rozdíly oproti kontrolní skupině nepotvrdilo. Statisticky významné výsledky jsme zaznamenali pouze u hodnocení schopnosti udržet hlavu nad vodní hladinou u 12denních mláďat. Mláďata s dávkou fenytoinu 60 mg/kg mělo prokazatelně horší výsledek než kontrolní skupina s rozpouštědlem.

Tato studie potvrzuje poznatky o účincích fenytoinu popsané v nashromážděné literatuře a doplňuje výsledky z naší předchozí práce o vývojovém působení fenytoinu. Pro rozšíření aktuální práce by bylo vhodné doplnit ji o histologickou analýzu mozečku zvířat, kterým byl podán fenytoin, aby bylo možné porovnat data i se studiemi popisující atrofii mozečku a změny na Purkyňových buňkách.

Referenční seznam

- ALAVERDASHVILI, M., KUBOVÁ, H., MAREŠ, P. Motor performance and behavior of immature rats are not compromised by a high dose of topiramate. *Epilepsy*. 2005, vol. 7, issue 2, s. 222-230. DOI: 10.1016/j.yebeh.2005.04.013.
- ALTMAN, J., SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*. 1975, vol. 23, č. 4, s. 150-161. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780195162851.003.0014.
- ARSHAVSKY, Y. I., T. G. DELIAGINA a G. N. ORLOVSKY. Central Pattern Generators: Mechanisms of Operation and Their Role in Controlling Automatic Movements. *Neuroscience and Behavioral Physiology* [online]. 2016, 46(6), 696-718. DOI: 10.1007/s11055-016-0299-5. ISSN 00970549.
- ARZIMANOGLU, A., Renzo. GUERRINI a Jean. AICARDI. Aicardi's epilepsy in children. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, c2004. ISBN 9780781726986.
- BARKER-HALISKI, Melissa L., Fabiola VANEGAS, Matthew J. MAU, Tristan K. UNDERWOOD a H. Steve WHITE. Acute cognitive impact of antiseizure drugs in naive rodents and corneal-kindled mice. *Epilepsia* [online]. 2016, 57(9), 1386-1397 [cit. 2017-08-10]. DOI: 10.1111/epi.13476. ISSN 00139580. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13476>
- BEKOFF, A. a W. TRAINER, 1979. The Development of Interlimb Co-ordination During Swimming In Postnatal Rats. *The Journal of Experimental Biology*. 83, 1 11. ISSN 0022-0949.
- BELL, GS a JW SANDER. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. *SEIZURE-EUROPEAN JOURNAL OF EPILEPSY* [online]. 2001, 10(4), 306-316. ISSN 10591311.
- BERG, A.T., SHINNAR, S., The risk of seizure recurrence following a first unprovoked seizure: a quantitative review. *Neurology*. 1991, (41), 965– 972.
- BEYDOUN, Ahmad, Joseph D'SOUZA, David HEBERT a Pamela DOTY. Lacosamide: pharmacology, mechanisms of action and pooled efficacy and safety data in partial-onset seizures. *Expert Review of Neurotherapeutics* [online]. 2014, 9(1), 33-42. DOI: 10.1586/14737175.9.1.33. ISSN 14737175.
- BROCARD, F, L VINAY a F CLARAC. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Developmental Brain Research* [online]. 1999, 117(1), 81-89. DOI: 10.1016/S0165-3806(99)00101-7. ISSN 01653806.
- BRODIE, Martin J. Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure* [online]. 2010, 19(10), 650-655. DOI: 10.1016/j.seizure.2010.10.027. ISSN 10591311.
- BUREŠOVÁ, J. v: KAŇOVSKÝ, P., HERZIG, R. Speciální neurologie. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 336 s. ISBN 978-80-244-1664-9.
- BURNEO, Jorge G., J. V. ANANDAN a Gregory L. BARKLEY. A Prospective Study of the Incidence of the Purple Glove Syndrome. *Epilepsia* [online]. 2001, 42(9), 1156-1159. DOI: 10.1046/j.1528-1157.2001.12901.x. ISSN 00139580.
- CAZALETS, J. R., I. MENARD, J. CRÉMIEUX a F. CLARAC, 1990. Variability as a characteristic of immature motor systems: an electromyographic study of swimming in the newborn rat. *Behavioural Brain Research*. 40(3), 215-225. ISSN 0166-4328.
- CLANCY, B, R.B DARLINGTON a B.L FINLAY. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* [online]. 2001, 105(1), 7-17. DOI: 10.1016/S0306-4522(01)00171-3. ISSN 03064522.
- CLARAC, François, Laurent VINAY, Jean-René CAZALETS, Jean-Claude FADY a Marc JAMON. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews* [online]. 1998, 28(1-2), 35-43. DOI: 10.1016/S0165-0173(98)00024-1. ISSN 01650173.

- DE MARCOS, F. A., GHIZONI, E. et al. Cerebellar volume and long-term use of phenytoin. *Seizure*, 2003, 12.5: 312-315.
- DELIAGINA, T.G., N. ORLOVSKY a G.A. PAVLOVA. The Capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat. *Experimental Brain Research*. 1983, 53(1), 81-90. ISSN 1432-1106.
- DhavaII SOLANKI, PATEL, AlpeshP a JayendraR GOHIL. Comparative Efficacy of Phenobarbital, Phenytoin and Lorazepam for the Treatment of Neonatal Seizures: A Randomized Trial. *Journal of Clinical Neonatology* [online]. 2015., DOI: 10.4103/2249-4847.161696. ISSN 22494847.
- DINGLEDINE, R., et al. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, 1999, 51.1: 7-62. DOBBING, J., SANDS, J. Quantitative growth and development of human brain. *Archives of disease in childhood*, 1973, 48.10: 757-767.
- DOLEŽAL, M., et al. *Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2013.
- EARNEST, Michael P. Complications of Intravenous Phenytoin for Acute Treatment of Seizures. *JAMA* [online]. 1983, 249(6), 762. DOI: 10.1001/jama.1983.03330300046032. ISSN 00987484.
- EILAM, D. a W.P. SMOTHERMAN. How the neonatal rat gets to the nipple: Common motor modules and their involvement in the expression of early motor behavior. *Developmental Psychobiology*. 1998, 32(1), 57-66. ISSN 1098-2302.
- FADIEL, A., J. SONG, D. TIVON, A. HAMZA, T. CARDOZO a Frederick NAFTOLIN. Phenytoin Is an Estrogen Receptor α -Selective Modulator That Interacts With Helix 12. *Reproductive Sciences* [online]. 2015, 22(2), 146-155. DOI: 10.1177/1933719114549853. ISSN 19337191.
- FISHER, Robert S., Carlos ACEVEDO, Alexis ARZIMANOGLU, et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* [online]. 2014, 55(4), 475-482. DOI: 10.1111/epi.12550. ISSN 00139580.
- FISHER, Robert S., Walter van Emde BOAS, Warren BLUME, Christian ELGER, Pierre GENTON, Phillip LEE a Jerome ENGEL. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* [online]. 2005, 46(4), 470-472. DOI: 10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x. ISSN 00139580.
- FORCELLI, P. A., KOZŁOWSKI, R., SNYDER, C., KONDRATYEV, A., GALE, K. Effects of Neonatal Antiepileptic Drug Exposure on Cognitive, Emotional, and Motor Function in Adult Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011, vol. 340, issue 3, s. 558-566. DOI: 10.1124/jpet.111.188862.
- GALLOP, Katharine. Review article: Phenytoin use and efficacy in the ED. *Emergency Medicine Australasia* [online]. 2010, 22(2), 108-118. DOI: 10.1111/j.1742-6723.2010.01269.x. ISSN 17426731.
- GEISLER, H. C., WESTERGA, J., GRAMSBERGEN, A. Development of posture in the rat. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 1993, 53.4: 517-524.
- GLAUSER, T. A. Effects of antiepileptic medications on psychiatric and behavioral comorbidities in children and adolescents with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 2004, 5: 25-32.
- HAUSER, W. Allen, Stephen S. RICH, Ju R.-J. LEE, John F. ANNEGERS a V. Elving ANDERSON. Risk of Recurrent Seizures after Two Unprovoked Seizures. *New England Journal of Medicine* [online]. 1998, 338(7), 429-434. DOI: 10.1056/NEJM199802123380704. ISSN 0028-4793.
- HAUSER, W. Allen, Stephen S. RICH, Ju R.-J. LEE, John F. ANNEGERS a V. Elving ANDERSON. Risk of Recurrent Seizures after Two Unprovoked Seizures. *New England Journal of Medicine* [online]. 1998, 338(7), 429-434. DOI: 10.1056/NEJM199802123380704. ISSN 00284793.

- HESDORFFER, Dale C., Emma K. T. BENN, Gregory D. CASCINO a W. Allen HAUSER. Is a first acute symptomatic seizure epilepsy? Mortality and risk for recurrent seizure. *Epilepsia* [online]. 2009, 50(5), 1102-1108. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01945.x. ISSN 00139580.
- JAMON, Marc a François CLARAC. Early walking in the neonatal rat: A kinematic study. *Behavioral Neuroscience* [online]. 1998, 112(5), 1218-1228. DOI: 10.1037/0735-7044.112.5.1218. ISSN 19390084.
- JAMON, Marc. The early development of motor control in neonate rat. *Comptes Rendus Palevol* [online]. 2006, 5(3-4), 657-666. DOI: 10.1016/j.crpv.2005.11.018. ISSN 16310683.
- KACÍŘOVÁ, I. a M. GRUNDMANN. Terapeutické monitorování hladin antiepileptik I. – obecné zásady, „stará“ antiepileptika. *Klinická farmakologie*. 2016, 30(2), 9-15. ISSN 1803-5353.
- KEPPEL HESSELINK, Jan M. a David J. KOPSKY. Phenytoin: 80 years young, from epilepsy to breast cancer, a remarkable molecule with multiple modes of action. *Journal of Neurology* [online]. 2017, 264(8), 1617-1621. DOI: 10.1007/s00415-017-8391-5. ISSN 03405354.
- KIRSCHBAUM, K., GURK-TURNER, C. Phenytoin vs fosphenytoin. *BUMC Proceedings*. 1999, vol. 12, s. 168-172.
- KOMÁREK, V. Léčba epileptických syndromů u dětí. *Cesk Slov Neurol N*. 2007, 70/103(5), 473-485.
- KORINTHENBERG, Rudolf, Peter BURKART, Christiane WOELFLE, Jürgen Schulte MOENTING a Jan Peter ERNST. Pharmacology, Efficacy, and Tolerability of Potassium Bromide in Childhood Epilepsy. *Journal of Child Neurology* [online]. 2016, 22(4), 414-418. DOI: 10.1177/0883073807302758. ISSN 08830738.
- KWAN, Patrick a Martin J BRODIE. Emerging drugs for epilepsy. *Expert Opinion on Emerging Drugs* [online]. 2007, 12(3), 407-422. DOI: 10.1517/14728214.12.3.407. ISSN 14728214.
- KWAN, Patrick a Martin J. BRODIE. Early Identification of Refractory Epilepsy. *New England Journal of Medicine* [online]. 2000, 342(5), 314-319. DOI: 10.1056/NEJM200002033420503. ISSN 00284793.
- LANDMARK, C. J.: Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Medical Science Monitor*, 13 (1), RA1-7, 2007. Retrieved 9. 9. 2008 from www.medscimonit.com.
- LASON, W., CHLEBICKA, M., REJDAK, K., SIMEONE, T.A., RHO, J.M. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacological Reports*. 2013, vol. 65, issue 4, s. 59-66. DOI: 10.1016/b978012373961-2.00160-0.
- LELARD, T, M JAMON, J GASC a P VIDAL. Postural development in rats. *Experimental Neurology* [online]. 2006, 202(1), 112-124. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.05.018. ISSN 00144886.
- LIU, C., et al. Phenytoin-mediated oxidative stress in serum of female epileptics: a possible pathogenesis in the fetal hydantoin syndrome. *Human & experimental toxicology*, 1997, 16.3: 177-181.
- MALLOW, D. W.; HERRICK, M. K.; GATHMAN, G. Fetal exposure to anticonvulsant drugs. Detailed pathological study of a case. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 1980, 104.4: 215-218.
- MANTHEY, D. a D. BARNES. Oral vs intravenous phenytoin loading. *Academic Emergency Medicine*. 2003, (10), 492. ISSN 1553-2712.
- MATOUŠKOVÁ, Kateřina. Vliv fenytoinu na motorický vývoj laboratorního potkana. Vliv fenytoinu na motorický vývoj laboratorního potkana / Kateřina Matoušková; vedoucí práce Pavel Mareš; oponent práce Karel Valeš [online]. 2015
- MATSUKI, N., F.N. QUAND, R.E. TEN EICK a J.Z. YEH. Characterization of the block of sodium channels by phenytoin in mouse neuroblastoma cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1984, 228(2), 523-530. DOI: Quandt FN, Ten Eick RE, Yeh JZ. ISSN 1521-0103.

- MEADOR, K. J., D. W. LORING, E. E. MOORE, W. O. THOMPSON, M. E. NICHOLS, R.E., OBERZAN, M. W. DURKIN, B. B. GALLAGHER a D. W. KING. Comparative cognitive effects of phenobarbital, phenytoin, and valproate in healthy adults. *Neurology*. 1995, vol. 45, issue 8, s. 1494-1499. DOI: 10.1212/wnl.45.8.1494.
- MEIERKORD, H., P. BOON, B. ENGELSEN, K. GOCKE, S. SHORVON, P. TINUPER a M. HOLTKAMP. EFNS guideline on the management of status epilepticus. *European Journal of Neurology* [online]. 2006, 13(5), 445-450. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2006.01397.x. ISSN 13515101.
- MELDRUM, Brian S. a Michael A. ROGAWSKI. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* [online]. 2007, 4(1), 18-61. DOI: 10.1016/j.nurt.2006.11.010. ISSN 19337213.
- NAKAJIMA, K., K. MATSUYAMA a S. MORI, 1998. Prenatal administration of para chlorophenylalanine results in suppression of serotonergic system and disturbance of swimming movements in newborn rats. *Neuroscience Research*. 31(2), 155169. ISSN 0168-0102.
- NANDA, A., et al. Fetal hydantoin syndrome: a case report. *Pediatric dermatology*, 1989, 6.2: 130-133.
- NEJEDLÝ, K. *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat*. Vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1965, 629 s. Příručky pro vysoké školy.
- OHMORI, H., OGURA, H., YASUDA, M., NAKAMURA, S., HATTA, T., KAWANO, K., MICHIKAWA, T., YAMASHITA, K., MIKOSHIBA, K. Developmental Neurotoxicity of Phenytoin on Granule Cells and Purkinje Cells in Mouse Cerebellum. *Journal of Neurochemistry*. 1999, vol. 72, issue 4, s. 1497-1506. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.721497.x.
- ORLOVSKY, G. N. a A. G. FEL'DMAN. Classification of lumbosacral neurons by their discharge pattern during evoked locomotion. *Neurophysiology*. 1972, 4(4), 311–317. ISSN 1573-9007.
- RALL, T.W., Schleiffer, L. Drugs effective in the treatment of the epilepsies. In: GILMAN, A.G., L.S. GOODMAN, T.W. RALL a R. MURAD. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7. New York: Macmillan, 1985, s. 446–472. ISBN Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F.
- REKTOR, Ivan a Hana OŠLEJŠKOVÁ. *Stručná epileptologie pro praxi*. *Neurol. Prax. Supl.* 2010, 11(Supl. 3), 5-44.
- ROGAWSKI, M. A., LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004, vol. 5, issue 7, s. 553-564. DOI: 10.1038/nrn1430.
- SEIDL, Z., OBENBERGER, J. *Neurologie pro studium i praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 363 s. ISBN 80-247-0623-7.
- SHANMUGARAJAH, P., N. HOGGARD a S. HOWELL. Phenytoin and cerebellar ataxia: not all down to toxicity?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013, 84:e2.
- SHANNON, H. E., LOVE, P. L. Effects of antiepileptic drugs on learning as assessed by a repeated acquisition of response sequences task in rats. *Epilepsy*. 2007, vol. 10, issue 1, s. 16-25. DOI: 10.1016/j.yebeh.2006.11.004.
- SHIH, Jerry J., Julia B. WHITLOCK, Nicole CHIMATO, Emily VARGAS, Steven C. KARCESKI a Ryan D. FRANK. Epilepsy treatment in adults and adolescents: Expert opinion, 2016. *Epilepsy & Behavior* [online]. 2017, 69, 186-222. DOI: 10.1016/j.yebeh.2016.11.018. ISSN 15255050.
- SHORVON, Simon D. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The first 50 years, 1909-1958. *Epilepsia* [online]. 2009, 50, 69-92. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2009.02041.x. ISSN 00139580.
- SCHAPIRO, S., M. SALAS a K. VUKOVICH, 1970. Hormonal Effects on Ontogeny of Swimming Ability in the Rat: Assessment of Central Nervous Development. *Science*. 168(3927), 147-151. ISSN 0036-8075.
- SCHIERHOUT, Gillian a Ian ROBERTS. Antiepileptic drugs for preventing seizures following acute traumatic brain injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [online]. Chichester, UK: John Wiley, 1996. DOI: 10.1002/14651858.CD000173.pub2.

- SILLS, G.J. a M.J. BRODIE. Update on the mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Epileptic Disorders*. 2001, 3(4), 165–72.
- SMITH, Misty, Karen S. WILCOX a H. Steve WHITE. Discovery of antiepileptic drugs. *Neurotherapeutics* [online]. 2007, 4(1), 12-17. DOI: 10.1016/j.nurt.2006.11.009. ISSN 19337213.
- SÝKORA, Pavol. Dá sa epilepsia vyliečiť? Kazuistika bnignej parcilnej epilepsie s centrotemporlnymi hrotmi. *Pediatrie pre prax*. 2008, 171-172. ISSN ISSN 1339-4231.
- TANAKA, Hajime, Shigemi MORI a Hiroshi KIMURA. Developmental changes in the serotonergic innervation of hindlimb extensor motoneurons in neonatal rats. *Developmental Brain Research* [online]. 1992, 65(1), 1-12. DOI: 10.1016/0165-3806(92)90002-E. ISSN 01653806.
- VOJTA, V., PETERS, A. Vojtv princip: svalove souhry v reflexn loko­moci a motoricka ontogeneze. 1. vyd. Praha: Grada, 1995, 181 s. ISBN 80-716-9004-X.
- WELKER, W.I. Analysis of Sniffing of the Albino Rat 1). *Behaviour* [online]. 1964, 22(3), 223-244. DOI: 10.1163/156853964X00030. ISSN 00057959.
- WESTERGA, J., GRAMSBERGEN, A. Development of locomotion in the rat: the significance of early movements. *Early Human Development*. 1993, vol. 34, 1-2, s. 89-100. DOI: 10.1016/0378-3782(93)90044-u.
- WILENSKY, A.J. a J.A. LOWDEN. Inadequate Serum Levels After Intramuscular Administration of Diphenylhydantoin. *Neurology*. 1973, (23), 318. ISSN 1526-632X.
- WINTER, M.E., TOZER, T.N..Phenytoin. In: Buton, M.E., SHAW, L.M. et al. *Applied Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. Baltimore: Lippincott, Williams and Wilkins, 2006; 464-66, 479
- ZENG, Kebin, Xuefeng WANG, Zhiqing XI a Yong YAN. Adverse effects of carbamazepine, phenytoin, valproate and lamotrigine monotherapy in epileptic adult Chinese patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery* [online]. 2010, 112(4), 291-295. DOI: 10.1016/j.clineuro.2009.12.014. ISSN 03038467.

Přehled příloh

Příloha č. 1: Plavání – 12denní

Příloha č. 2: Plavání – 18denní

Příloha č. 3: Plavání – 25denní

Příloha č. 4: Bar holding test – 12denní

Příloha č. 5: Bar holding test – 18denní

Příloha č. 6: Chůze po pravidelném žebříku – 18 denní

Příloha č. 7: Chůze po nepravidelném žebříku – 18 denní

Příloha č. 8: Bar holding test – 25 denní

Příloha č. 9: Chůze po pravidelném žebříku – 25 denní

Příloha č. 10: Chůze po nepravidelném žebříku – 25 denní

Přílohy

Příloha č. 1: Plavání – 12denní

Fenytoin	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení čenicu (0-3)		počet přeplavání	
30 mg/kg	kontroly	fenytoin 30	kontroly	fenytoin 30	kontroly	fenytoin 30
1	2	2	2	3	4	6
2	2	2	3	3	2	2
3	2	2	2	2	3	3
4	2	2	3	3	4	7
5	2	2	3	3	3	3
6	2	2	3	3	3	1
7	2	2	3	3	4	3
8	2	2	3	3	4	3
9	2	2	3	3	2	4
10	2	2	3	3	4	2
Fenytoin	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
60 mg/kg	kontroly	fenytoin 60	kontroly	fenytoin 60	kontroly	fenytoin 60
1	2	2	3	3	2	11
2	2	2	2	2	1	2
3	2	2	3	3	2	4
4	2	2	3	2	0	3
5	2	2	2	2	1	3
6	2	2	3	3	5	6
7	2	2	3	2	2	0
8	2	2	3	2	2	5
9	2	2	3	2	2	6
10	2	2	3	3	3	1
Rozp.	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
	kontroly	rozpouštědlo	kontroly	rozpouštědlo	kontroly	rozpouštědlo
1	2	2	3	3	1	3
2	2	2	3	3	4	2
3	2	2	3	3	1	2
4	2	2	3	3	2	1
5	2	2	3	3	3	2
6	2	2	3	3	2	4
7	2	2	3	3	4	4
8	2	2	3	3	3	3
9	2	2	3	3	2	4
10	2	2	3	3	4	2

Příloha č. 2: Plavání – 18 denní

PHT	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
30 mg/kg	kontroly	fenytoin 30	kontroly	fenytoin 30	kontroly	fenytoin 30
1	2	2	3	3	11	4
2	2	2	3	3	9	7
3	2	2	3	3	7	5
4	2	2	3	3	11	10
5	2	2	3	3	10	8
6	2	2	3	3	10	16
7	2	2	3	3	3	6
8	2	2	3	3	10	5
9	2	2	3	3	10	6
10	2	2	3	3	7	7
PHT	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
60 mg/kg	kontroly	fenytoin 60	kontroly	fenytoin 60	kontroly	fenytoin 60
1	2	2	3	3	8	12
2	2	2	3	3	7	4
3	2	2	3	3	8	4
4	2	2	3	3	6	8
5	2	2	3	3	5	3
6	2	2	3	3	6	6
7	2	2	3	3	7	1
8	2	2	3	3	6	6
9	2	2	3	3	9	5
10	2	2	3	3	4	2
Rozp.	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
	kontroly	rozp.	kontroly	rozp.	kontroly	rozp.
1	2	2	3	3	10	3
2	2	2	3	3	8	8
3	2	2	3	3	7	5
4	2	2	3	3	6	0
5	2	2	3	3	6	7
6	2	2	3	3	8	9
7	2	2	3	3	7	4
8	2	2	3	3	15	8
9	2	2	3	3	9	9
10	2	2	3	3	4	2

Příloha č. 3: Plavání – 25 denní

PHT	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
30 mg/kg	kontroly	fenytoin 30	kontroly	fenytoin 30	kontroly	fenytoin 30
1	2	3	3	3	6	10
2	3	2	3	3	7	5
3	2	2	3	3	10	9
4	2	3	3	3	6	15
5	2	3	3	3	6	8
6	2	2	3	3	8	5
7	3	3	3	3	5	4
8	2	2	3	3	5	13
9	2	2	3	3	6	7
10	3	3	3	3	9	7
PHT	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
60 mg/kg	kontroly	fenytoin 60	kontroly	fenytoin 60	kontroly	fenytoin 60
1	2	2	3	3	5	6
2	3	2	3	3	6	10
3	2	2	3	3	5	5
4	3	2	3	3	10	20
5	3	3	3	3	6	11
6	2	2	3	3	11	5
7	3	3	3	3	7	8
8	3	3	3	3	6	5
9	2	2	3	3	5	6
10	2	2	3	3	14	4
Rozp.	plovací pohyby končetin (1-3)		potopení (0-3)		počet přeplavání	
	kontroly	rozp.	kontroly	rozp.	kontroly	rozp.
1	3	2	3	3	6	3
2	3	2	3	3	10	8
3	3	2	3	3	8	5
4	3	2	3	3	6	0
5	3	2	3	3	6	7
6	2	2	3	3	5	9
7	2	2	3	3	6	4
8	2	2	3	3	4	8
9	3	2	3	3	4	9
10	2	2	3	3	5	2

Příloha č. 4: Bar holding test – 12denní

Fenytoin 30 mg/kg	Kontroly	Fenytoin 30
1	4	4
2	2	3
3	13	6
4	15	5
5	12	6
6	18	5
7	17	6
8	18	6
9	4	5
10	19	9
Fenytoin 60 mg/kg	Kontroly	Fenytoin 60
11	15	4
12	10	2
13	5	4
14	8	3
15	13	10
16	7	4
17	13	6
18	7	5
19	9	11
20	24	12
Rozpouštědlo	kontroly	rozpouštědlo
1	15	15
2	10	7
3	4	5
4	8	9
5	13	20
6	6	9
7	8	11
8	4	6
9	18	15
10	20	7

Příloha č. 5: Bar holding test – 18denní

Fenytoin 30 mg/kg	kontroly	fenytoin 30
1	5	4
2	20	7
3	32	10
4	22	7
5	20	10
6	43	42
7	30	34
8	55	53
9	60	55
10	21	30
Fenytoin 60 mg/kg	kontroly	fenytoin 60
11	17	28
12	8	9
13	6	8
14	6	4
15	4	15
16	10	35
17	33	12
18	60	43
19	32	6
20	33	11
Rozpouštědlo	kontroly	rozpouštědlo
1	25	22
2	21	21
3	18	20
4	27	28
5	36	37
6	54	48
7	42	43
8	18	16
9	9	15
10	23	20

Příloha č. 6: Chůze po pravidelném žebříku – 18 denní

Fenytoin	kontroly			fenytoin 30		
30 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	60	12	50	60	10	50
2	60	9	50	60	7	50
3	60	11	50	60	5	25
4	60	18	50	23	20	100
5	60	13	50	60	32	50
6	60	6	50	60	1	50
7	60	2	50	60	1	50
8	60	0	0	27	7	100
9	60	2	66	60	2	50
10	11	2	100	14	0	100
Fenytoin	kontroly			fenytoin 60		
60 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	60	7	50	20	10	100
2	60	12	50	60	15	50
3	60	6	25	57	30	100
4	60	16	100	48	35	100
5	60	8	50	60	15	50
6	60	0	33	60	0	0
7	60	0	33	60	0	0
8	60	0	0	7	3	100
9	60	0	0	60	2	50
10	8	4	100	12	1	100
Rozpouštědlo	kontroly			rozpouštědlo		
	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	60	15	50	60	26	100
2	60	8	25	60	21	50
3	60	9	33	60	3	25
4	25	17	100	19	20	100
5	60	3	50	60	16	100
6	60	0	50	60	0	0
7	60	4	50	60	3	50
8	60	6	50	60	2	50
9	60	0	33	60	0	0
10	47	8	50	60	13	100

Příloha č. 7: Chůze po nepravidelném žebříku – 18 denní

Fenytoin	kontroly			fenytoin 30		
30 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	60	2	33	60	0	0
2	60	1	33	60	3	50
3	9	3	100	27	8	100
4	60	2	50	60	5	50
5	17	2	100	17	3	100
6	60	6	50	60	8	25
7	60	5	25	60	8	50
8	60	0	0	60	0	0
9	60	0	0	60	8	10
10	60	0	0	60	12	50
Fenytoin	kontroly			fenytoin 60		
60 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	60	0	0	60	0	0
2	60	0	0	60	0	0
3	60	0	0	17	4	100
4	60	0	33	14	4	100
5	18	4	100	40	7	100
6	60	0	0	60	8	50
7	60	0	0	60	0	0
8	60	0	0	30	0	0
9	60	0	0	36	26	50
10	60	6	50	60	29	100
Rozpouštědlo	kontroly			rozpouštědlo		
	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	52	19	100	47	21	100
2	60	12	50	60	18	50
3	60	0	0	60	3	25
4	60	5	25	60	5	33
5	60	0	0	60	2	25
6	60	0	0	60	0	0
7	60	0	0	60	0	0
8	60	7	33	60	1	25
9	60	4	25	60	0	0
10	60	0	0	8	0	0

Příloha č. 8: Bar holding test – 25 denní

Fenytoin 30 mg/kg	kontroly	fenytoin 30
1	60	60
2	60	60
3	42	60
4	60	14
5	60	50
6	60	29
7	60	60
8	60	60
9	60	45
10	23	6
Fenytoin 60 mg/kg	kontroly	fenytoin 60
11	4	45
12	60	18
13	11	29
14	60	14
15	60	26
16	60	30
17	29	14
18	60	60
19	60	60
20	6	60
Rozpouštědlo	kontroly	rozpouštědlo
1	60	60
2	60	60
3	60	60
4	60	60
5	26	21
6	60	60
7	60	60
8	60	60
9	60	60
10	60	60

Příloha č. 9: Chůze po pravidelném žebříku – 25 denní

Fenytoin	kontroly			fenytoin 30		
30 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	9	1	100	6	0	100
2	6	0	100	5	1	100
3	5	0	100	6	0	100
4	7	0	100	5	1	100
5	6	0	100	11	0	100
6	14	3	100	8	2	100
7	6	4	100	18	4	100
8	8	1	100	5	1	100
9	5	3	100	6	3	100
10	25	2	100	6	2	100
Fenytoin	kontroly			fenytoin 60		
60 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	21	5	100	33	0	100
2	15	3	100	7	1	100
3	30	4	100	28	0	100
4	60	3	100	27	0	100
5	20	1	100	8	0	100
6	5	2	100	6	2	100
7	5	4	100	6	2	100
8	6	1	100	12	1	100
9	10	3	100	6	2	100
10	4	2	100	8	2	100
Rozpouštědlo	kontroly			rozpouštědlo		
	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	7	2	100	7	2	100
2	4	1	100	3	1	100
3	5	2	100	11	0	100
4	3	2	100	5	2	100
5	9	2	100	5	3	100
6	6	2	100	5	1	100
7	9	4	100	8	2	100
8	3	1	100	4	2	100
9	5	2	100	5	0	100
10	7	3	100	5	1	100

Příloha č. 10: Chůze po nepravidelném žebříku – 25 denní

Fenytoin	kontroly			fenytoin 30		
30 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	12	1	100	32	5	100
2	5	0	100	13	2	100
3	11	1	100	9	0	100
4	7	1	100	5	1	100
5	6	2	100	7	2	100
6	6	2	100	7	2	100
7	7	2	100	21	4	100
8	7	1	100	9	4	100
9	6	0	100	37	4	100
10	9	1	100	60	3	100
Fenytoin	kontroly			fenytoin 60		
60 mg/kg	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	60	4	50	60	6	66
2	16	2	100	19	2	100
3	60	7	100	60	0	50
4	60	2	50	60	0	50
5	10	0	100	18	4	100
6	5	2	100	60	2	100
7	10	4	100	7	3	100
8	9	1	100	42	2	100
9	6	2	100	17	4	100
10	6	1	100	27	6	100
Rozpouštědlo	kontroly			rozpouštědlo		
	čas (s)	počet chyb	%	čas (s)	počet chyb	%
1	7	4	100	11	1	100
2	4	2	100	8	1	100
3	5	3	100	10	1	100
4	6	3	100	6	3	100
5	10	2	100	10	1	100
6	9	4	100	6	1	100
7	14	3	100	60	1	50
8	6	4	100	5	2	100
9	7	3	100	6	0	100
10	18	2	100	6	1	100