UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Andrea Slížková

Vývoj motoriky laboratorního potkana po podání látek ovlivňujících A1 adenosinové receptory

Bakalářská práce

Praha 2020

Autor práce: Andrea Slížková

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

Oponent práce: RNDr. Karel Valeš, PhD.

Datum obhajoby: 2020

Bibliografický záznam

SLÍŽKOVÁ, Andrea. *Vývoj motoriky laboratorního potkana po podání látek ovlivňujících A1 adenosinové receptory.* Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství, 2020. 52 s. Vedoucí bakalářské práce: Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Abstrakt

Adenosinergní systém tvoří inhibiční systém v mozku podílející se na mnoha neurologických onemocněních. Předmětem tohoto výzkumu byl specifický agonista A1 adenosinového receptoru, 2-Chloro-N(6)-cyclopentyladenosine, neboli CCPA, a jeho vliv na motorické schopnosti laboratorního potkana. Byly vybrány 3 věkové skupiny – 12tidenní, 18tidenní a 25tidenní, kterým bylo intraperitonálně podáváno CCPA v dávkách 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg . Kontrolní skupině byl vpíchnut fyziologický roztok. 30 minut po vpichu byli vloženi na 5 minut do Open fieldu ke sledování spontánní lokomoce a poté prošli potkani několika motorickými testy přizpůsobenými věku. Výsledky prokázaly, že s rostoucím věkem se motorická výkonnost potkanů lepšila nejen u kontrolních skupin, ale i u potkanů s dávkou 0,2 mg/kg zůstává tento fyziologický rozdíl zachován. Podáním 0,5 mg/kg CCPA se ale rozdíl motorických schopností věkových skupin v mnoha zkouškách zmenšil. Účinek CCPA se projevil nejvýrazněji u 12tidenních potkanů. Naopak u 25tidenních mláďat byl účinek nejméně znatelný. Projevil se také signifikantní rozdíl mezi motorickou výkonností potkanů s 0,2 mg/kg a 0,5 mg/kg. Potkani s vyšší dávkou byli méně aktivní.

Klíčová slova

laboratorní potkan, A1 adenosinové receptory, CCPA, motorický vývoj

Bibliographic record

SLÍŽKOVÁ, Andrea. *Development of laboratory rat´s motor activity after a tradition of the substance influencing A1 adenosine. Prague: Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Department of Rehabilitation and Sports Medicine, 2020. 52 p., Appendixes. Supervisor of the work: Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.*

Abstract

Adenosinergic system is an inhibitory modulator in the brain that plays an important role in various neurological diseases. The subject of this research was a specific adenosine A1 agonist, 2-chloro-N (6) –cyclopentyladenosine – CCPA, and its effect on the motor abilities of rats. Three age groups (12-day, 18-day, and 25-day) were administered CCPA intraperitoneally at doses of 0.2 mg/kg, 0.5 mg/kg, and the control group was injected with saline solution. 30 minutes after the injection, they were placed in an open field for 5 minutes to monitor spontaneous locomotion and then passed several age-adapted motor tests. The results showed that, with increasing age, the motor performance of rats improved not only in the control groups, but this physiological difference maintained was also in the group of rats with the dose of 0,2 mg/kg. However, administration of 0.5 mg/kg CCPA reduced the difference in motor skills of the age groups in many tests. The effect of CCPA was most distinct in 12-day-old rats. On the other hand, in 25-day-olds, the effect was the least noticeable. There was also a significant difference between the motor performance of rats with 0.2 mg/kg and 0.5 mg/kg. The rats with the higher dose were less active.

Keywords

laboratory rat, A1 adenosine receptores, CCPA, motor development

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Pavla Mareše, prof. MUDr., DrSc., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje, dodržovala zásady vědecké etiky a tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 24. 4. 2020 ……...

Poděkování autora:

Děkuji prof. MUDr. Pavlovi Marešovi, DrSc. za cenné rady a návrhy při vedení a zpracování bakalářské práce, za pomoc při statistickém zpracování dat a výsledků a Irině Neševě za spolupráci při realizaci výzkumu v rámci bakalářské práce. Dále děkuji RNDr. Anně Mikulecké, PhD. za pomoc při zpracování dat z Open fieldu.

OBSAH

OBSAH **7**

1. ÚVOD **8**

2. PŘEHLED TEORETICKÝCH POZNATKŮ **10**

2.1 TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ LABORATORNÍHO POTKANA 10
2.2 POSTNATÁLNÍ VÝVOJ LABORATORNÍHO POTKANA 10
2.2.1 P0 11
2.2.2 P1 – P3 11
2.2.3 P4 – P7 12
2.2.4 P8 13
2.2.5 P9 14
2.2.6 P10 - P11 14
2.2.7 P12 14
2.2.8 P13 - P14 14
2.2.9 P15 – P18 15
2.2.10 P21 16
2.2.11 P25 – P50 16
..... 17
2.3 ADENOSINERGNÍ SYSTÉM 18
2.3.1 Adenosin 18
2.3.2 Adenosinové receptory 21
2.3.3 Antagonisté a agonisté adenosinových receptorů 23

3. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY **25**

3.1 CÍLE 25
3.2 HYPOTÉZY 25
3.2.1 Hypotéza 1 25
3.2.2 Hypotéza 2 26
3.2.3 Hypotéza 3 26

4. METODIKA **27**

5. VÝSLEDKY **30**

5.1 KVANTITATIVNÍ HODNOCENÍ 30
5.1.1 Open field 30
5.1.2 Rotarod 33
5.1.3 Negativní geotaxe 33
5.1.4 Vis na hrazdě 35
5.1.5 Pravidelný horizontální žebřík 36
5.1.5. Nepravidelný horizontální žebřík 39
5.2 KVALITATIVNÍ HODNOCENÍ 40
5.2.1 Šplh po nakloněné rovině 40
5.2.2 Surface righting 41
5.2.3 Open field 41
5.2.4 Vis na hrazdě 41
5.2.5 Pravidelný horizontální žebřík 41
5.2.6 Nepravidelný horizontální žebřík 42

6. DISKUSE **44**

7. ZÁVĚR **48**

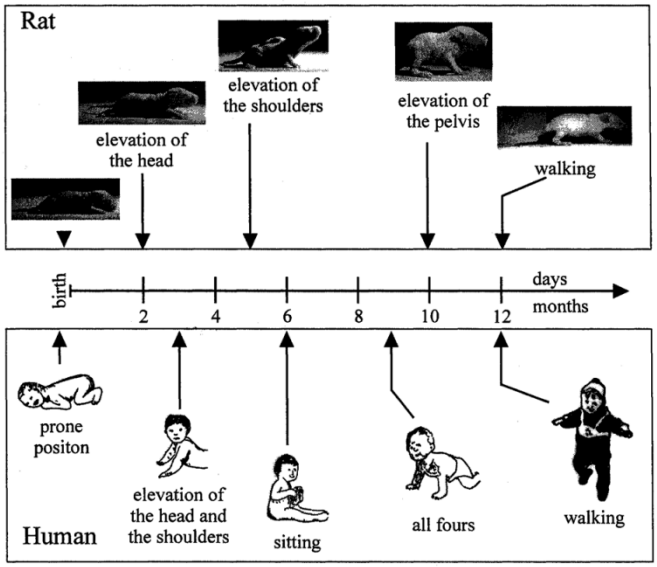
8. SEZNAM LITERATURY **50**

1. ÚVOD

V této práci se budeme zabývat působením agonisty A1 adenosinových receptorů (konkrétně 2-Chloro-N(6)-cyclopentyladenosine, CCPA) na motorické schopnosti laboratorního potkana.

Toto zvíře je vhodné pro takovéto výzkumy především proto, že jeho motorický vývoj, z pohledu morfologického, histochemického i fyziologického zrání periferních a centrálních motorických mechanismů, chronologicky odpovídá vývoji člověka. (Altman a Sudarshan, 1975). Stupeň vývoje při narození potkana odpovídá prenatálnímu stádiu vývoje člověka (Gramsbergen, 1998), díky čemuž je možné pozorovat změny motorických schopností po změnění vnějších vlivů, jako například podání léku (Calamandrei, 2004).

Například potkan ležící druhý den po narození, začínající v pronační poloze zvedat hlavu z podložky (Geisler, Westerga, Gramsbergen, 1993), odpovídá přibližně třetímu měsíci ve vývoji zdravého lidského jedince (Vinay et al., 2005). Zadní končetiny během prvního týdne života mláděte potkana ještě nejsou schopny udržet váhu pánve. První opora o tlapky a prsty se objevuje od 10 do 12 dne po narození a je následována lokomocí (Altman a Sudarshan, 1975; Geisler et al., 1993). Toto období je podobné dítěti, které začíná chodit na konci prvního roku svého života (Vinay et al. 2005). (viz Obrázek 1)



Obrázek 1. Schématické porovnání mezi lidským a potkaním postnatálním motorickým vývojem. Jeden den u potkanů odpovídá přibližně 1 měsíci lidského vývoje. (Vinay et al., 2005)

Další značnou výhodou je třikrát až čtyřikrát do roka se opakující březost matek s počtem deseti až dvanácti mláďat ve vrhu. Potkani navíc pohlavně dospívají ve 2 měsících života (Vinay et al., 2005), a není tedy tak těžké získat přesnou věkovou skupinu s dostatkem probandů pro určitý pokus.

Navíc díky tomu, že se potkanům vyvíjí hematoencefalická bariéra až ve druhé polovině třetího týdne po narození, dostanou se podané látky – v našem případě CCPA - po systémovém podání bez problémů do mozku, kde mohou působit.

Tato látka podporuje presynaptickou inhibici mechanismem zvýšení účinnosti A1 adenosinových receptorů - nejvíce rozšířených adenosinovým receptorů inhibující přenos nejen v centrálním nervovém systému, ale také např. ve svalech, játrech, ledvinách, tukové tkáni (Sachdeva a Gupta, 2013), v kardiovaskulárním systému, plících nebo varlatech.

2. PŘEHLED TEORETICKÝCH POZNATKŮ

2.1 Taxonomické zařazení laboratorního potkana

říše: živočichové (Animalia)

kmen: strunatci (Chordata)

třída: savci (Mammalia)

řád: hlodavci (Rodentia)

čeleď: myšovití (Muridae)

rod: krysa (rattus)

druh: potkan (rattus norvegicus)

poddruh: ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky jsou nejčastěji používaným kmenem albíni Rattus norvegicus var. alba outbredního kmene Wistar, se kterými byl prováděn i tento výzkum.

2.2 Postnatální vývoj laboratorního potkana

P = postnatální den

P0 = do 24 hodin po narození, den narození

P1 = následující den po narození

Px = P značí postnatální období a x den, ve kterém mládě dosáhlo věku x

Pro tuto bakalářskou práci jsou důležité dny P12, P18 a P25, neboť v tyto dny byly jednotlivé skupiny potkanů měřeny.

Jak se potkan vyvíjí od embrya po dospělého jedince, dochází k řadě vývojových změn, které se uskutečňují během raného postnatálního vývoje. Dále během prvních

dnů po narození se neurotransmiter kyselina γ-aminomáselná (GABA), která má v tomto období vliv na proliferaci, migraci, diferenciaci a smrt buněk a na zrání synapsí, mění z depolarizujícího na hyperpolarizující mediátor, čili z exitačního na inhibiční vliv, který můžeme pozorovat u dospělých jedinců (Vachovcová, 2014).

2.2.1 P0

Mládě potkana má ihned po narození extendované končetiny, položenou hlavu na podložce a nejeví žádné známky pohybu, kromě výjimek, kdy zakřivení těla v nultém či prvním dnu způsobí dojem elevace hlavy. (Altman a Sudarshan, 1975) Tyto rytmické pohyby jsou generovány tzv. central pattern generators, neboli CPGs, v páteřní míše potkana (Vinay et al., 2005). Gramsbergen (1998) uvádí již od narození tzv. pivotování – viz den P4-P7.

Mládě je holé, neschopné regulovat svou tělesnou teplotu (Calamandrei, 2004), s uzavřenými zvukovody (s matkou v tomto období komunikuje pomocí ultrazvuku kolem 30 kHz) a se slepenými víčky, takže první dny po narození rozlišuje jenom světlo a tmu a orientuje se především pomocí čichu a vestibulárnímu aparátu, ačkoli tyto smysly ještě nejsou plně funkční (Clarac, Vinay, Cazalets, Fady, Jamon, 1998), případně podle termoreceptorů a hmatových receptorů (Calamandrei, 2004). Rodí se také s funkčním chuťovým ústrojím, které se ale, stejně jako ústrojí čichové, po narození dále vyvíjí (Vítová, 2010).

V den narození (dokonce i 1-2 dny před narozením) lze vyvolat monosynaptický napínací reflex (Brocard, Vinay, Clarac, 1999).

2.2.2 P1 – P3

Od tohoto dne začínají mláďata zvedat ramena z podložky. Tento jev svědčí o funkčním zrání předních končetin, které jsou schopné v rámci dalších dnů prodlužovat

dobu odlepení ramen od podložky a zároveň podpírat přední část trupu. V P1 je hlavní oporou loket (Altman a Sudarshan, 1975).

Průměrně druhý den po narození jsme schopni u potkana cíleně vyvolat sací reflex (Heyser, 2003).

Ve třetím dni dosáhne kortikospinální dráha (hlavní dráha volní motoriky) do oblasti krční míchy a mládě je tak schopno začít vědomě používat přední končetiny (PKK) k lokomoci, což předchází pivotování v P4 (Vachovcová, 2014).

2.2.3 P4 – P7

Teprve čtvrtý až pátý den po narození se objevují časté spontánní pohyby PKK, které jsou základem prvotního lokomočního projevu - tzv. pivotování. PKK při něm fungují jako pádla. Mláďata se odstrkují tlapami PKK, prsty PKK jsou addukovány, pánev a zadní končetiny (ZKK) spočívají pasivně na podložce; výsledný pohyb těla je rotace kolem svislé osy se zanedbatelným podílem pohybu vpřed. V rámci pivotování lze rozlišit dvě formy - "odpichování" (punting), jako ranou formu pivotování s nekoordinovaným pohybem PKK, které je postupně nahrazováno "šlapáním" (treading), při kterém je již hlava zdvižena nad podložku, PKK se pohybují koordinovaně, stále však nedochází k pohybu vpřed. Pivotování lze pozorovat od 4. do 9. dne, jeho výskyt vrcholí 7. den (Vítová, 2010).

V 5. dni je u většiny mláďat patrný vzpřimovací reflex - surface righting. Tato reakce probíhá při položení potkana na záda. Fyziologicky zdravé zvíře by se mělo během pár sekund obrátit zpět do přirozené pronační polohy (Heyser, 2003). S motorickým dozráváním se tato reakce zrychluje – mláďata starší 18. dne je téměř nemožné položit do supinační polohy a obrací se již v ruce.

6. den doroste kortikospinální dráha do úrovně lumbální míchy, což je předpokladem pro vědomý pohyb ZKK (Vachovcová, 2014).

Průměrně v 7. dni po narození dochází k prořezávání řezáků a mládě je tak schopno začít přijímat i jinou potravu než jen mateřské mléko. Z reflexů je možno vyvolat úchopový reflex a tzv. negative geotaxis, při které se mládě při umístění hlavou dolů na nakloněné rovině obrátí o 180°, tedy hlavou vzhůru (Heyser, 2003). Poprvé se také objevují vertikální pohyby hlavy (Geisler et al., 1993).

2.2.4 P8

Tento den začínají potkani zvedat hlavičku a od té doby (přibližně do 3 týdnů) se postupně prodlužuje doba, kterou jsou schopni ji udržet nad podložkou (Altman, Sudarshan, 1975).

Objevuje se nový lokomoční vzor – crawling, neboli plazení. Prsty PKK jsou při kontaktu s podložkou již abdukovány. ZKK jsou abdukovány a rotovány zevně (Geisler et al., 1993; Muir, 2000), chvílemi provádí pohyby připomínající veslování a účastní se tak lokomoce. Často však zůstávají nataženy za tělem s chodidly směřujícími vzhůru a jsou pouze pasivně vláčeny za tělem. K abdukci prstů ZKK dochází v polovině 2. týdne; abdukované prsty následně umožňují účinnější oporu i odraz. Plazení, coby způsob lokomoce, převažuje do 14. dne (Altman a Sudarshan, 1975).

Z reflexů můžeme průměrně v tomto věku zaznamenat tzv. cliff avoidence. Kdy se zvíře umístí PKK na okraj plošiny tak, aby jim nos přesahoval přes hranu. Je sledována doba, za kterou se potkani vzdálí od okraje. Tento obranný reflex se téměř nevyskytuje v prvních dnech po narození, ale v 8. dnu již únik od okraje očekáváme

u většiny zvířat (Heyser, 2003). Altman a Sudarshan (1975) uvádějí tento obranný reflex již od P7.

2.2.5 P9

Opora předních končetin se posouvá distálně a v 9. dni mládě odděluje jednotlivé prsty na tlapce. To umožňuje zvednout přední část trupu i hlavu ještě více (Altman a Sudarshan, 1975) do tzv. větřící polohy – sniffing (Vachovcová, 2014).

2.2.6 P10 - P11

Poprvé se objevuje opora o tlapky a prsty zadních končetin (Altman a Sudarshan, 1975), což zlepšuje kvalitu plazení. V této době je také markantní vývoj srsti (Heyser, 2003) a objevují se horizontální pohyby hlavy během lokomoce (Geisler et al., 1993).

2.2.7 P12

Zvíře je schopné v tomto období zvednout 1 končetinu, aniž by ztratilo rovnováhu (Altman a Sudarshan, 1975). Tento jev je také spojený s dozráváním CNS - například myelinizací některých aferentních vláken a jiných anatomických změn, díky nimž v době mezi 2. a 4. týdnem plně dozrává vestibulární systém (Brocard et al., 1999; Clarac et al., 1998; Geisler et al., 1993). Díky tomu se v tomto období může začít objevovat chůze (Clarac et al., 1998; Lelard, Jamon, Gasc, Vidalet, 2006). Zároveň v důsledku otevření vnějších zvukovodů se stane i sluch plně funkčním (Clarac et al., 1998).

2.2.8 P13 - P14

V P13 dochází u průměrného mláděte k otevření očních štěrbin (Heyser, 2003). Dochází k narůstání svalové síly a 14. den po narození je většina potkanů schopna se předními končetinami udržet na hrazdičce – bar holding test (Heyser, 2003), nebo

na nataženém pevném drátu - horizontal wire test. Sledujeme také tendence zvířete pomoci si zadními končetinami. Synergickou podporu lze spatřit výjimečně již v P11. V této době dokáže několik potkanů ze skupiny uchopit hrazdu pomocí jedné či obou ZKK. Všechna zvířata jsou schopna tuto dovednost ukázat až 21. den po narození (Altman a Sudarshan, 1975).

2.2.9 P15 – P18

Před 15. dnem se otevírají oční štěrbiny a mládě potkana tak získává první ostré zrakové vjemy (Altman a Sudarshan, 1975). Zatímco slepá mláďata pohybují hlavou a páteří jako jedním celkem, po otevření očních štěrbin se objevují izolované pohyby v atlantookcipitálním skloubení (Lelard et al., 2006).

Mládě má už vyvinuté horní i dolní končetiny natolik, že je schopno udržet své tělo elevované déle než 3 minuty. (Altman a Sudarshan, 1975) V tento den je již chůze plně automatizovaná a můžeme o ní hovořit jako o převládajícím lokomočním vzoru (Geisler et al., 1993; Muir, 2000; Heyser, 2003).

Gramsbergen (1998) ale ve své práci s využitím EMG registrace částečně popírá hypotézu, že v souvislosti s výskytem plynulého vzoru chůze (P15-16) se objevuje i kvalitní posturální kontrola. Autor popisuje, že do 11. dne života (P11) potkana lze sledovat nedostatečně vyvinutou koordinovanou posturální kontrolu trupu během lokomoce. Od P15 se pravidelněji objevuje aktivita trupových svalů. Nicméně, dokončený vývoj posturální kontroly se objevuje až v P21, což pozorujeme 5-6 dní po výskytu dospělého typu chůze (Gramsbergen, 1998).

Dochází k oddálení ušních boltců od povrchu hlavy a z reakcí se objevují: zraková umisťovací reakce, sluchová úleková reakce a taktilní úleková reakce (Heyser, 2003).

Od 15. do 17. dne sledujeme vývoj v mid-air righting testu. Při něm je potkan spuštěn z výšky 60 cm z polohy vzhůru nohama (tj. hřbetem dolů) na měkkou podložku. Sleduje se schopnost mláděte se během pádu otočit a dopadnout na všechny čtyři končetiny. Hlava se točí první a následuje ji hrudník a bedra (Altman a Sudarshan, 1975).

2.2.10 P21

Po 21. postnatálním dni končí kojenecké období v laboratorním prostředí (fyziologický odstav je však datován k 28 postnatálnímu dni potkana). S vývojem zraku a sluchu se v tomto období zvyšuje rozmanitost chování a zvýrazňuje se hyperaktivita. Objevuje se chování více podobné dospělým potkanům (Calamandrei, 2004).

2.2.11 P25 – P50

Toto období je typické sexuální aktivitou potkana. Věk sexuální zralosti, počátek adolescence, má interindividuální odchylky. Sexuální zralost u samic je datována přibližně na 32-34. den po narození, u samců je to skoro o 14 dní později, kolem 45-48. dne po narození (McCuthceon a Marinelli, 2009).

Vývojové mezníky	Průměrný věk jejich objevení (dny)	Referenční mez (dny)
Fyzické známky		
oddálení ušních boltců od povrchu hlavy	15	10-20
otevření očí	13	7-17
prořezání řezáků	7	5-10
vývoj srsti	11	3-15
Reflexy		
surface righting	5	1-10
mid-air righting	18	16-21
negative geotaxis	7	3-15
cliff avoidance	8	2-12
zraková umisťovací reakce	15	11-18
umisťovací reakce PKK/ZKK[1]	5	1-10
vibrissa placing response	9	5-15
sluchová úleková reakce	15	11-21
taktilní úleková reakce	15	3-20
zkřížený extenzorový reflex[1]	3	1-10
sací reflex[1]	2	1-15
úchopový reflex[1]	7	3-15
bar holding	14	10-21
level screen test	8	5-15
vertical screen test	19	15-21
Vzpřimování a lokomoční chování		
vzpřímení hlavy	12	9-21
vzpřímení na PKK	7	5-15
pivotování[1]	7	2-17
plazení[1]	11	7-16
chůze	16	12-21

Obrázek 2. Vývojové mezníky a věk, ve kterém se u mláďat objevují. Číslo 1 v horním indexu znamená, že daný motorický projev se vyskytuje pouze v raném věku. Ostatní motorické projevy přetrvávají i v dospělosti (upraveno podle Heyser, 2003)

2.3 Adenosinergní systém

2.3.1 Adenosin

Adenosin je endogenní purinový nukleosid, který ovlivňuje nejrůznější fyziologické procesy. V této práci nás adenosin zajímá především jako extracelulární signální molekula, která je významným neuromodulátorem (Mundell a Kelly, 2011). Chemicky se jedná o 6-amino-9-beta-D-ribofuranosyl-9-H-purin (Fredholm, 2010).

Extracelulární hladina adenosinu v organismu je přesně udržována rovnováhou mezi jeho tvorbou, odbouráváním a transportem. Uvnitř i vně buňky vzniká adenosin hlavně enzymatickou degradací adenosintrifosfátu a k jeho odbourávání dochází fosforylací na adenosinmonofosfát nebo deaminací na inosin (Novotný, 2015).

2.3.1.1 Vznik adenosinu

Adenosin vzniká v buňkách defosforylací adenosinmonofosfátu (AMP) po hydrolýze z adenosintrifosfátu (ATP) a adenosindifosfátu (ADP) (Barsotti a Ipata, 2004), nebo také hydrolýzou S-adenosyl-L-homocysteinu (SAH), což je reverzibilní reakce katalyzovaná enzymem S-adenosyl-L--homocystein-hydrolázou (Novotný, 2015).

Za normálních podmínek dochází k rychlé refosforylaci ADP, nebo metabolické přeměně zpět na homocystein (asi 80%), ale při faktorech jako je velká spotřeba ATP a nedostatek kyslíku v tkáni, dochází ke zvýšení koncentrace ADP, která aktivuje adenylátkinázu – enzym katalyzující přenos fosfátové skupiny na jinou molekulu ADP za vzniku ATP a AMP. Odbouráním AMP adenosinovou cestou vzniká velké množství adenosinu, které může po uvolnění z buňky aktivovat adenosinové receptory (Turner et al., 2000).

V extracelulárním prostředí vzniká adenosin z ATP reakcí katalyzovanou membránově vázaným enzymem ekto-apyrázou, který odštěpuje z ATP pyrofosfát za vzniku AMP. Ten je pak hydrolyzován na adenosin. Tento způsob tvorby adenosinu přispívá k celkovému extracelulárnímu množství adenosinu asi z 30 % (Novotný, 2015).

Dalším způsobem vzniku adenosinu - jak v buňce, tak v extracelulárním prostoru - je katalýza cyklického adenosinmonofofátu (cAMP), a to enzymem fosfodiesterázou na AMP. AMP je pak opět hydrolyzován na adenosin (Murphree a Linden, 2004).

2.3.1.2 Odbourávání adenosinu

O způsobu degradace adenosinu rozhoduje především jeho koncentrace a typ tkáně, ve které se nachází. Podle toho se nadbytečný adenosin fosforyluje za působení adenosinkinázy na AMP (při nižších koncentrací než 5 μM), nebo ho odbourá adenosindeamináza na inosin (při koncentraci větší než 5 μM). Inosin může být dále degradován na hypoxantin, a poté až na kyselinu močovou. Další možností může být spojení adenosinu pomocí enzymu SAH-hydrolázy s L-homocysteinem za vzniku S-adenosyl-L-homocysteinu (Lloyd a Fredholm, 1995).

V extracelulárním prostředí se z těchto enzymů vyskytuje pouze adenosindeamináza. Proto je většina adenosinu z vnějšího prostředí transportován do buněk, kde se na jeho degradaci může účastnit hlavní katalytický enzym adenosinkináza (Lloyd a Fredholm, 1995).

Při stresových faktorech jako je hypoxie a nedostatek energie se podílí na regulaci hladiny adenosinu především adenosindeamináza (Murphree a Linden, 2004). Převážná část adenosinu je uvolňována z buněk do okolního prostředí, což je způsobeno jednak tvorbou mnohem většího množství adenosinu, jednak poklesem jeho metabolismu

v důsledku inhibice funkce adenosinkinázy hypoxií (Decking, Schlieper, Kroll, Schrader, 1997).

2.3.1.3 Transport přes buněčnou stěnu

Dalším způsobem ovlivnění nadměrné koncentrace extracelulárního adenosinu je transportem do buňky, či v opačném případě – příliš malé koncentrace – z buňky ven. Za fyziologických podmínek by měla být jeho hladina nízká a konstantní.

Při stresové reakci tedy může být její zvýšení způsobeno jednak zvětšenou tvorbou adenosinu v extracelulárním prostoru a jednak zrychleným přesunem adenosinu vytvořeným v buňce přes plazmatickou membránu. Naopak pokles koncentrace adenosinu je zajišťován jeho extracelulární degradací a zpětným transportem do buňky (Novotný, 2015).

Adenosin je však hydrofilní molekula a nemůže volně prostupovat buněčnými membránami difuzí. Používá tedy specializované, buňkou vyvinuté transportní systémy – nukleosidové transportéry.

Prvním typem jsou transportéry ekvilibrační (ENT) fungující mechanismem usnadněné difuze. Ty za fyziologických podmínek přenášejí adenosin po jeho koncentračním spádu směrem do buňky z hyperosmolárního extracelulárního prostředí. Při zvýšení tvorby adenosinu v buňce, ke kterému dochází za stresových situací, se ale směr jeho přenosu obrací (Choi a Berdis, 2012).

Druhým typem jsou pak transportéry koncentrační (CNT) využívající symport se sodnými ionty (Choi a Berdis, 2012). Tento aktivní transport adenosinu probíhá především v epitelových buňkách specializovaných tkání typu tenkého střeva, ledvin nebo jater, ale částečně také v buňkách endotelu. Podílejí se pouze na přenášení

do buňky, nikoli ven, protože koncentrační gradient sodných iontů obecně směruje pohyb sodných iontů a tedy i nukleosidů do buňky (Novotný, 2015).

Oba typy nukleosidových transportérů se mj. přímo účastní na vstřebávání nukleosidů z potravy a mají i důležitou roli při vychytávání nukleosidů a nukleových bází pro syntézu nukleotidů a nukleových kyselin. Je tomu tak proto, že syntéza nukleotidů de novo je energeticky velmi náročná a některé buněčné typy jí ani nejsou schopny (Novotný, 2015).

2.3.2 Adenosinové receptory

Signální účinky adenosinu jsou zprostředkovány membránově vázanými adenosinovými receptory, které patří do široké rodiny receptorů přednostně spřažených s různými třídami G proteinů (Mundell a Kelly, 2011). Existují čtyři druhy adenosinových receptorů - A1, A2A, A2B a A3, které se liší nejen svou tkáňovou a buněčnou distribucí, ale také regulací různých signálních drah a farmakologickými charakteristikami (Sheth, Brito, Mukherjea, Rybak, Ramkumar, 2014). Zatímco A1 a A3 receptory prostřednictvím inhibičních Gi/o proteinů potlačují aktivitu adenylátcyklázy a tvorbu cAMP, A2A a A2B receptory spřažené se stimulačními Gs proteiny tento enzym aktivují, což vede ke zvýšení produkce cAMP a stimulaci proteinkinázy A (Boison, Chen, Fredholm, 2010).

Aktivace jednotlivých podtypů receptorů závisí hlavně na koncentraci adenosinu v extracelulárním prostředí, protože se liší i svou afinitou k němu. Zatímco A1 a A2A receptory mohou být aktivovány již za normálních podmínek relativně nízkými koncentracemi adenosinu vzhledem ke své vysoké afinitě, A2B receptory reagují až na stresovou situací, výrazně zvýšenou hladinu tohoto agonisty (Murphree a Linden, 2004). A3 receptor má relativně vysokou afinitu k adenosinu, ale vzhledem k jeho

poměrně řídkému výskytu je zapotřebí vyšších koncentrací tohoto agonisty, aby se jeho účinek prostřednictvím A3 receptoru mohl efektivně manifestovat (Novotný, 2015).

2.3.2.1 A1 receptor

A1 receptor je nejvíce rozšířeným adenosinovým receptorem, který se v poměrně velkém množství vyskytuje zejména v centrálním nervovém systému – v kůře, mozečku, hipokampu a v zadních rozích míchy, avšak nalezen byl také např. ve svalech, játrech, ledvinách, tukové tkáni (Sachdeva a Gupta, 2013), v kardiovaskulárním systému, plících nebo varlatech (Murphree a Linden, 2004).

K inhibici neurální aktivity se adenosin potřebuje navázat na presynaptické a postsynaptické receptory adenosinu A1 spojené s G_i proteinem. Tyto receptory podporují presynaptickou inhibici prostřednictvím blokády vápníkových kanálů a postsynaptickou hyperpolarizaci prostřednictvím aktivace draslíkových kanálů (Boison, 2013). Krom toho může adenosin prostřednictvím A1 (a A3) receptorů zpomalovat metabolismus a snižovat energetickou spotřebu buňky. Konkrétní metabolický účinek pak závisí na buněčném typu. Ve svalech dochází k inhibici glykolýzy, v adipocytech k inhibici lipolýzy, a v tukové tkáni i ve svalech se zvyšuje absorpce glukózy (Novotný, 2015). V CNS podporuje útlum a spánek a snižuje excitabilitu neuronů, v srdci snižuje srdeční tlak a frekvenci a také ho částečně chrání při ischemii srdeční tkáně před následnými událostmi jako například infarkt nebo arytmie (Murphree a Linden, 2004).

2.3.2.2 Ostatní adenosinové receptory

Především excitační A2A receptory můžeme najít jak v CNS (ve striatu působí proti D2 dopaminovým receptorům), tak v periferních nervech. V cévním systému

rozšiřují cévy, mají vliv na brzlík a bílé krvinky – působí protizánětlivě a objevují se také ve slezině a v srdci (Sachdeva a Gupta, 2013; Murphree a Linden, 2004).

Nejvyšší exprese A2B receptoru byla zjištěna v tlustém a slepém střevu, větší množství je rovněž v močovém měchýři, plicích, cévách, oku nebo v žírných buňkách (Sachdeva a Gupta, 2013) a v malém množství se vyskytují na mnoha místech v těle, například v tukové tkáni, v mozku, ledvinách a kardiovaskulárním systému (Murphree a Linden, 2004).

A3 receptor je významně zastoupen především ve varlatech, žírných buňkách, srdci a v některých částech mozku (Sachdeva a Gupta, 2013).

2.3.3 Antagonisté a agonisté adenosinových receptorů

Efekt jak agonistů, tak antagonistů adenosinových receptorů závisí na dávkování, způsobu podání či koncentraci. Je jimi možno ovlivnit jak excitotoxicitu, zánětlivé procesy, hyperalgezii a antinocicepci, tak senzorické a motorické deficity, dyskinezi a buněčnou smrt neuronů patřící k patofyziologii některých neurodegenerativních chorob (Rivera-Oliver a Diaz-Rios, 2014).

Dle nových studií má na neurodegenerativní choroby pozitivní vliv právě konzumace kávy a čaje díky obsahu kofeinu. Kofein - nebo také tein, matein či guaranin – se vyskytuje především v kávových zrnech, kakaových bobech, cola ořeších, čajových lístkách, lístkách maté a guaraně. Čaj obsahuje ještě dva další ligandy theofylin a theobromin. (Murphree a Linden, 2004). Díky těm má čaj dlouhodobější účinky oproti pouze kofeinu z kávy, kdy účinek sice rychle nastoupí, ale rychle odezní.

Tyto alkaloidy jako nespecifičtí antagonisté působí na všechny adenosinové receptory. Vzhledem k početnímu zastoupení a k velké afinitě A1 receptoru je výsledek jeho působení na CNS a kardiovaskulární soustavu excitační (Chen et al., 2017).

Ve výjimečných případech, jako například při snížené citlivosti A1 receptorů nebo zvýšené citlivosti A2A receptorů, dochází více k inhibici adenosinových A2A receptorů, a tudíž k inhibičnímu působení na CNS.

Právě modulace sloučeniny kofeinu daly vzniknout uměle vytvořeným, vysoce afinitním a selektivním antagonistům adenosinových receptorů (Murphree a Linden, 2004). U A1 antagonistů se jako nejlepší prokázaly modifikované xantiny. Příkladem je 1,3-dipropyl-8-cyklopentylxantin (DPCPX), který se používal jako radioligand a farmakologická sonda pro in vivo studie (Kiesman, Elzein, Zablocki, 2009).

Všechny dosud vyvinuté agonistické ligandy jsou založeny na struktuře adenosinu. Ten je však v základní formě rychle metabolizován (má poločas rozpadu v krvi pouze 2 s). Modifikace této molekuly na třech různých místech vedla k agonistům se zvýšenou životností a vylepšení selektivity pro A1 receptor (Murphree a Linden, 2004).

N(6)-cykloalkylové substituce se ukázaly jako nejúspěšnější selektivní agonisté A1 receptoru vůbec. Obsahují purinovou a ribózovou část. Substituce na N6-pozici adenosinu širokou škálou alkylových, cykloalkylových a arylalkylových skupin, stejně jako substituce 5‘-OH skupiny ribózové části, zvyšuje selektivitu pro A1 adenosinový receptor (Schenone, Brullo, Musumeci, Bruno, Bottaet, 2010).

N6-cyklopentyladenosin (CPA) a jeho účinnější 2-chloro-analog, 2-Chloro-N(6)-cyclopentyladenosine (CCPA) jsou nejvíce užívané selektivní farmakologické látky (Müller a Jacobson, 2011), a proto jsme i my zvolili CCPA jako vhodnou látku pro tento výzkum.

3. CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

3.1 Cíle

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, jaký bude mít jednorázové podání CCPA vliv na vývoj motorických schopností laboratorních potkanů v důležitých milnících jejich vývoje.

Spontánní lokomoce byla hodnocena v Open fieldu a k hodnocení motoriky byly využity věku přizpůsobené motorické testy. Z každé věkové skupiny byla 10 potkanům intraperitoneálně podána nižší dávka - 0,2 mg/kg CCPA a 10 dalším vyšší dávka - 0,5 mg/kg CCPA. Tyto skupiny byly porovnávány s kontrolní skupinou 10 potkanů, kterým byl podán fyziologický roztok. Porovnání všech tří skupin proběhlo ve třech věkových kategoriích – 12tidenní, 18tidenní a 25tidenní pro určení změn motoriky během vývoje.

Cílem práce bylo nejen zjistit, zda jednorázové podání 0,2 mg/kg a 0,5 mg/kg CCPA ovlivní spontánní lokomoci a motorické testy, ale také zda bude mít CCPA spíše inhibiční či excitační účinek na motorické schopnosti vybraných potkanů, zda jednorázové podání vyšší dávky CCPA ovlivní spontánní lokomoci a motorické testy ve větší míře než podání než nižší dávky a také zda změny vyvolané CCPA jsou závislé na věku potkana.

3.2 Hypotézy

3.2.1 Hypotéza 1

H01: Po jednorázovém podání CCPA dojde ke snížení motorických schopností zvířat oproti kontrolní skupině potkanů.

HA1: Po jednorázovém podání CCPA nedojde ke snížení motorických schopností zvířat oproti kontrolní skupině potkanů.

3.2.2 Hypotéza 2

H02: Jednorázové podání CCPA vyvolá změny v závislosti na dávce.

HA2: Po jednorázovém podání dojde ke snížení motorických schopností zvířat bez závislosti na dávce.

3.2.3 Hypotéza 3

H03: Změny vyvolané CCPA jsou závislé na věku

HA3: Změny vyvolané CCPA nejsou závislé na věku

4. METODIKA

Studovali jsme spontánní lokomoci metodou open field a motorické schopnosti řadou testů vždy odpovídajících věku mláďat ve třech věkových skupinách - dvanáctidenní, osmnáctidenní a dvaceti pětidenní. Aby bylo měření validní, mělo by každou věkovou kategorii zastupovat alespoň osm mláďat s nižší dávkou, tedy 0,2 mg/kg, osm s vyšší dávkou (v našem případě 0,5 mg/kg) a osm kontrol injikovaných fyziologickým roztokem s objemem odpovídajícím vyšší dávce, abychom vyloučili působení šoku z injekce na motoriku potkanů.

Abychom odstranili stresové faktory z vážení a přesouvání potkanů, je zapotřebí je nechat alespoň 30 minut před pokusem přivyknout v podmínkách testování - to znamená ve stejné místnosti, se stejným osvětlením, teplotou, vlhkostí a bez vnějších vlivů.

0,1 mg CCPA bylo zapotřebí smíchat s kapkou TWEENu a zředit fyziologickým roztokem. Suspenzi jsme pak nechali 10 minut pod působením magnetické míchačky a poté vpichovali intraperitoneální injekcí mláďatům potkana.

Plný účinek CCPA na motoriku je po 20 minutách po injekci a v tu dobu budou umisťováni všichni potkani na 5 minut do open fieldu, kde budou po tuto dobu zaznamenáváni kamerou a programem Exthovision bude poté vyhodnocena vzdálenost, kterou za danou dobu ušli, průměrná rychlost pohybu a čas, za který se odváží do centra pole – to je ukazatelem anxiety.

Motorické testy se pro jednotlivé věkové skupiny potkanů liší. Dvanáctidenní potkani ještě mají slepená oční víčka, a proto se testuje jen, za jakou dobu se obrátí do pronované polohy při položení na záda (surface righting), za jak dlouho se při položení na nakloněnou rovinu hlavou dolů mládě zorientuje na opačnou stranu

(negative geotaxis), jak dlouho vydrží viset na hrazdě (horizontal bar) a jak dlouho mu bude trvat vyšplhat po děrované nakloněné rovině (ascending ladder) za svými sourozenci umístěnými v košíčku na jejím vrcholu jako motivace.

Osmnáctidenní se zrakovou kontrolou by měli už kromě surface rightingu, negative geotaxis a horizontal baru zvládnout přejít i horizontální žebřík nejdřív s pravidelně rozmístěnými příčkami (regular horizontal ladder) a poté s nepravidelným uspořádáním a mezerami (iiregular horizontal ladder), přičemž u obojího používáme sourozence umístěné v košíčku pod opačným okrajem žebříku jako motivaci k přechodu a seskočení k nim. Kromě měření času je předmětem pozorování i počet chyb v lokomoci, tj. došlápnutí mimo příčku.

Dvacetipětidenní jedinci jsou tak aktivní, že by z negativní geotaxe utekli. Místo ní přidáváme tedy k surface rightingu, horizontal baru a horizontal ladderu točící se válec s vrásněným povrchem (rotarod), na který umístíme potkana hlavou proti směru otáčení a měříme dobu, po kterou se na něm udrží.

Všechny tyto testy jsou ukončeny, pokud zvíře nezvládne vykonat daný úkol do 60 vteřin. (šplh po nakloněné rovině, pravidelný a nepravidelný horizontální žebřík, negativní geotaxe), nebo naopak je natolik schopné že se udrží na hrazdě či rotarodu celých 60 vteřin.

Pokusy je třeba provádět vždy ve stejnou denní dobu, abychom respektovali cirkadiální rytmy potkanů a nedošlo k zbytečným odchylkám od měření. Zvířata na pokus byla poskytnuta akreditovaným zvěřincem Ústavu akademie věd ČR se stálou teplotou 22 °C (+ - 1 °C) se světelným režimem, ve kterém jsou potkani přivyknuti na světelnou část dne od 6 do 18 hodin. Toto měření probíhalo vždy ve stejnou denní dobu, od 9 do 12 hodin.

Zároveň bychom neměli nechávat dvanácti a osmnáctidenní potkany dlouho od matky a v době měření kdy musí být od matky odstaveni, je nutné umístit je na elektricky vyhřívanou dečku.

Pokusy byly schváleny odbornou komisí fyziologického ústavu pro ochranu zvířat a prováděny v souladu s rozhodnutím o schválení projektu pokusů. Byla také zabezpečena péče o pokusná zvířata při pokusu a kontrolována činnost dalších zaměstnanců související s pokusem, zejména ošetřovatelů, kteří se na ní podílejí.

5. VÝSLEDKY

5.1 Kvantitativní hodnocení

Mezi testy s možností kvantifikace výsledků patří vzdálenost a průměrný rychlost ušlá v open fieldu za 5 minut, rotarod, negativní geotaxe, vis na hrazdě, chybovost a čas za který potkani došli na konec pravidelného horizontálního žebříku a chybovost při přecházení nepravidelného horizontálního žebříku.

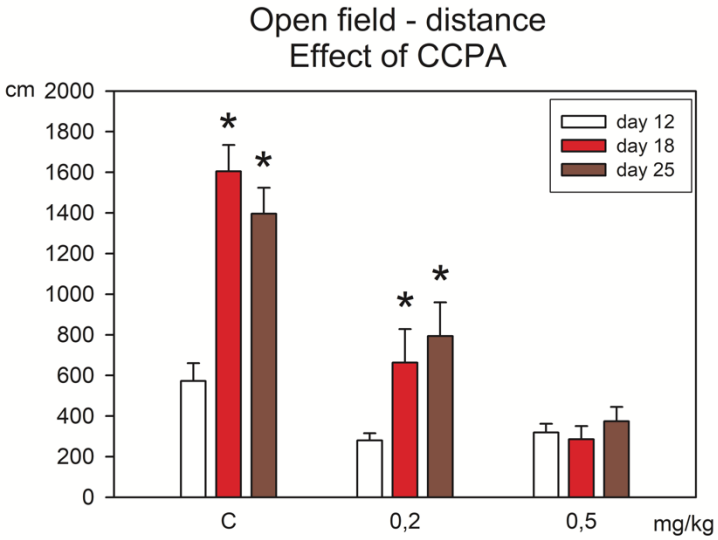
Tyto výsledky byly zhodnoceny ve statistickém programu SigmaStat pomocí analýzy rozptylu ANOVA, pokud se jednalo o parametrické testy (testy jejichž výsledky odpovídají Gaussově křivce), nebo případně ANOVA on rangs u neparametrických testů. Pokud ve srovnání skupin vyšla signifikance menší než 0,005, je tento rozdíl relevantní.

5.1.1 Open field

V této zkoušce se ukázalo, že u kontrol a potkanů s 0,2 mg/kg CCPA ujdou delší vzdálenost 18tidenní a 25tidenní než dvanáctidenní (viz Obrázek 3).

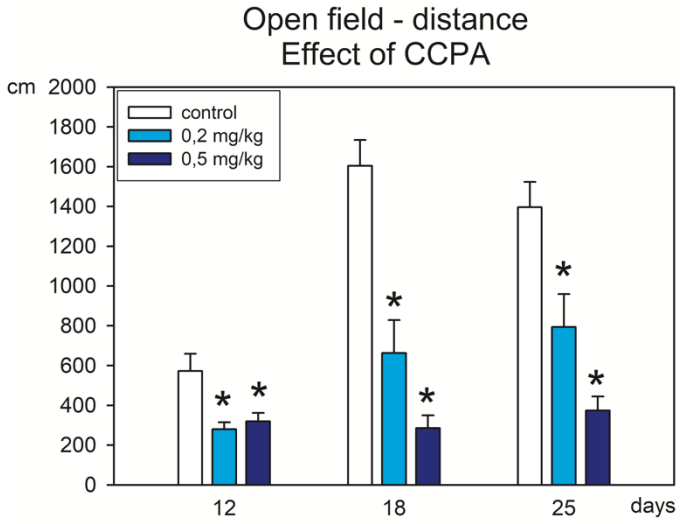
Také se ukázalo, že potkani všech věkových skupin, kterým bylo podáno CCPA, ujdou méně centimetrů než kontrolní skupina. Zároveň 18tidenní a 25tidenní potkani po podání 0,5 mg/kg ujdou signifikantně kratší vzdálenost, než po podání 0,2 mg/kg CCPA (viz Obrázek. 4).

18tidenní a 25tidenní kontroly a potkani s 0,2 mg/kg CCPA mají větší průměrnou rychlost než dvanáctidenní mláďata se stejnou dávkou. (viz Obrázek. 5) Potkani všech věkových skupin, kterým bylo podáno CCPA mají menší průměrnou rychlost než kontrolní skupina, a zároveň jsou 18tidenní a 25tidenní potkani po podání 0,5 mg/kg signifikantně pomalejší než po podání 0,2 mg/kg CCPA (viz Obrázek 6).



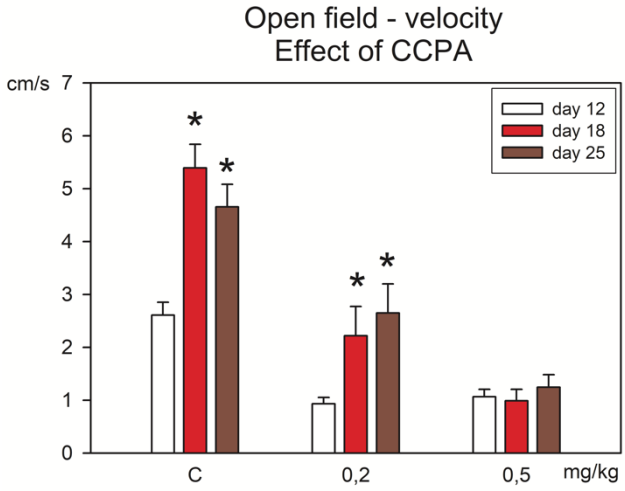
Obrázek 3. Graf porovnává vzdálenost ušlou v Open fieldu za 5 minut 12tidenních, 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA, na ose y je ušlá vzdálenost. Jednotlivé věkové skupiny jsou označeny různými barvami.

Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči 12tidenním potkanům (bílý sloupec).

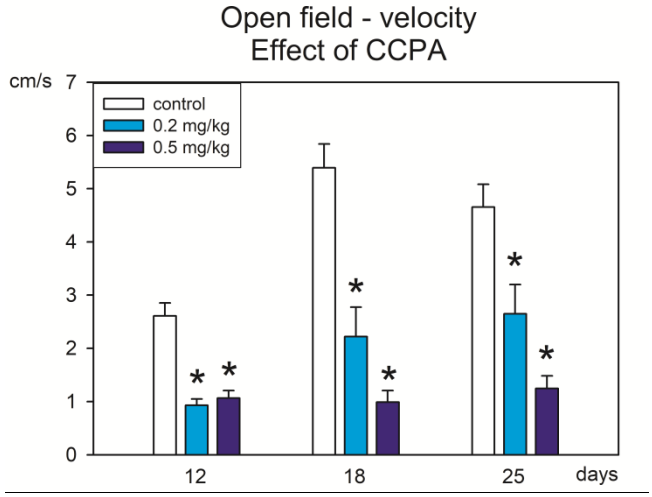


Obrázek 4. Graf porovnává vzdálenost ušlou v Open fieldu za 5 minut 12tidenních, 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 věkové skupiny, na ose y je ušlá vzdálenost. Jednotlivé skupiny dle množství podaného CCPA jsou označeny různými barvami.

Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči kontrolním potkanům (bílý sloupec).



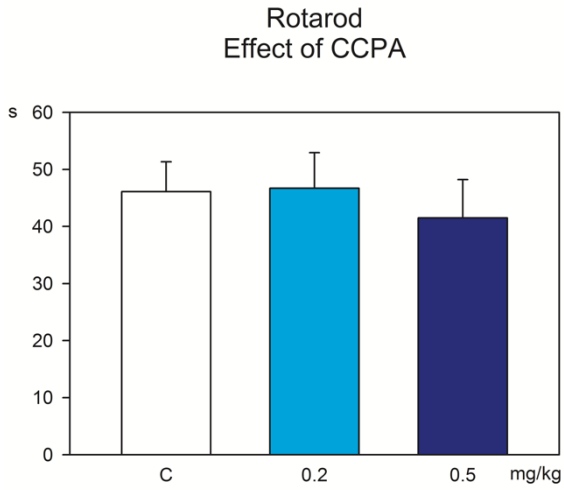
Obrázek 5. Graf porovnává průměrnou rychlost chůze za 5 minut v Openfieldu 12tidenních, 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA, na ose y je průměrná rychlost. Jednotlivé věkové skupiny jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči 12tidenním potkanům (bílý sloupec).



Obrázek 6. Graf porovnává průměrnou rychlost chůze za 5 minut v Openfieldu 12tidenních, 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 věkové skupiny, na ose y je průměrná rychlost. Jednotlivé skupiny dle množství podaného CCPA jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči kontrolní skupině potkanů (bílý sloupec).

5.1.2 Rotarod

V tomto testu, při kterém se měřilo, jak dlouho vydrží potkani na rotarodu nevyšly žádné významné rozdíly mezi kontrolami ani množstvím podané látky CCPA (viz Obrázek 7).

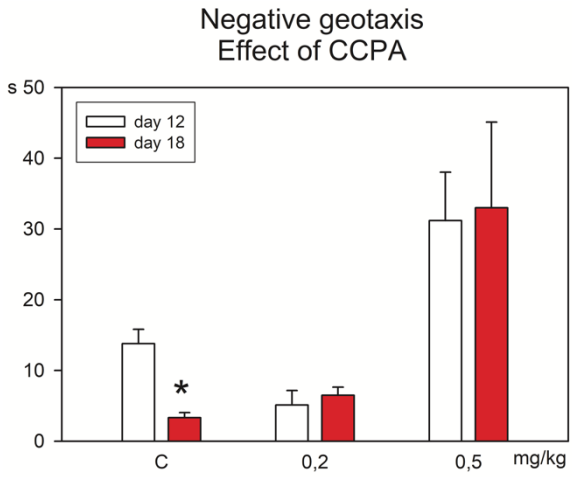


Obrázek 7. Graf porovnává dobu, po jakou se 25tidenní potkani udrželi na rotarodu v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA zobrazeny různými barvami, na ose y je doba, po jakou se 25tidenní potkani udrželi na rotarodu. V tomto testu nebyly žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami.

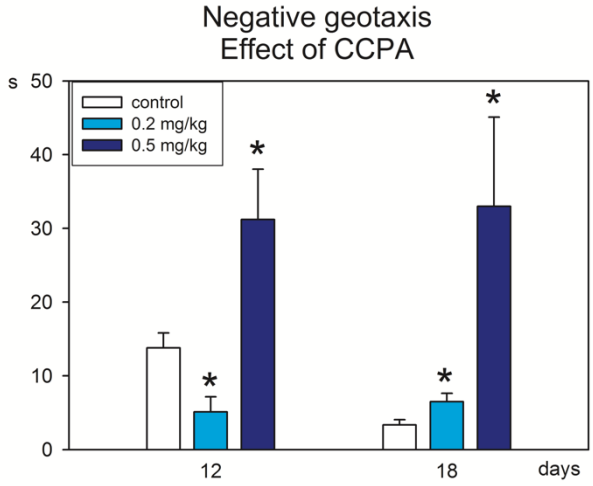
5.1.3 Negativní geotaxe

Při této zkoušce bylo zjištěno, že 18tidenní kontroly se otočí hlavou nahoru rychleji než 12tidenní (viz Obrázek 8).

Potkani s 0,5 mg/ kg obou věkových skupin a 18tidenní s 0,2 mg/kg se otočili za delší dobu než kontroly dané věkové skupiny a 12tidenní mláďata s 0,2 mg/kg CCPA se otočili rychleji než kontrolní skupina tohoto věku. Zároveň se 18tidenní i 25tidenní potkani po podání 0,5 mg/kg CCPA otočili signifikantně později oproti potkanům s dávkou 0,2 mg/kg CCPA (viz Obrázek 9).



Obrázek 8. Graf porovnává rychlost otočení hlavou nahoru na nakloněné rovině 12tidenních, 18tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA, na ose y je doba, za kterou se potkani otočili. Jednotlivé věkové skupiny jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči 12tidenním potkanům (bílý sloupec).

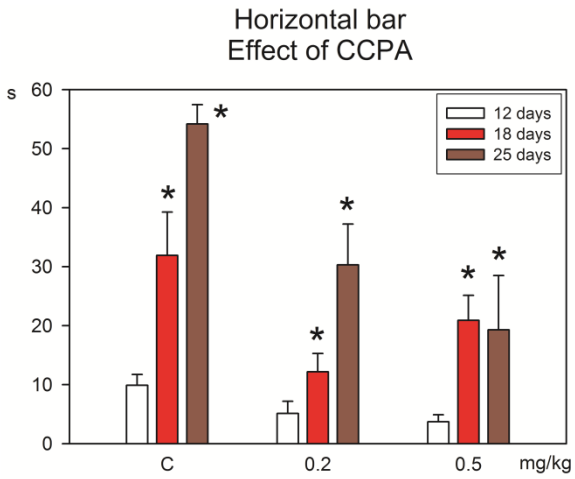


Obrázek 9. Graf porovnává rychlost otočení hlavou nahoru na nakloněné rovině 12tidenních, 18tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 2 věkové skupiny, na ose y je doba, za kterou se potkani otočili. Jednotlivé skupiny dle množství podaného CCPA jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči kontrolním potkanům (bílý sloupec).

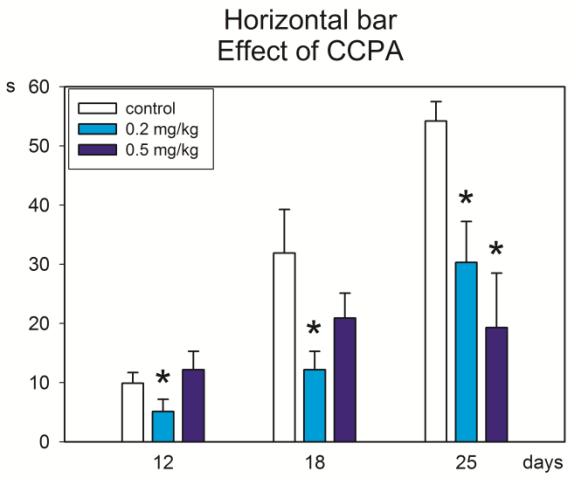
5.1.4 Vis na hrazdě

V tomto testu se při podání CCPA i fyziologického roztoku udrželi 18tidenní a 25tidenní potkani déle než 12tidenní a zároveň také vydrželi viset déle 25tidenní kontrolní skupiny a potkani s 0,2 mg/kg než 18tidenní se stejným množstvím látky (viz Obrázek 10).

Také se ukázalo, že po podání 0,2 mg/kg CCPA se potkani všech věkových kategorií udrželi na hrazdě kratší dobu, ale u dávky 0,5 mg/kg byl signifikantní rozdíl pouze u 25tidenních (Obrázek 11).



Obrázek 10. Graf porovnává dobu, jakou se potkani udrželi na hrazdě v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA, na ose y je doba visu. Jednotlivé věkové skupiny jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči 12tidenním potkanům (bílý sloupec).

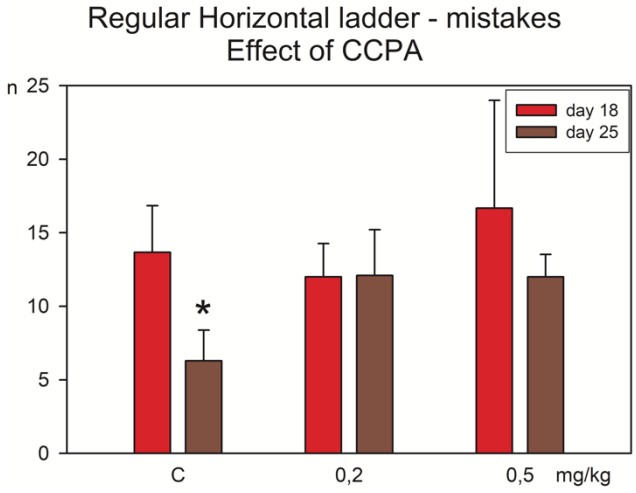


Obrázek 11. Graf porovnává dobu, jakou se potkani udrželi na hrazdě v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 věkové skupiny, na ose y je doba visu. Jednotlivé skupiny dle množství podaného CCPA jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči kontrolním potkanům (bílý sloupec).

5.1.5 Pravidelný horizontální žebřík

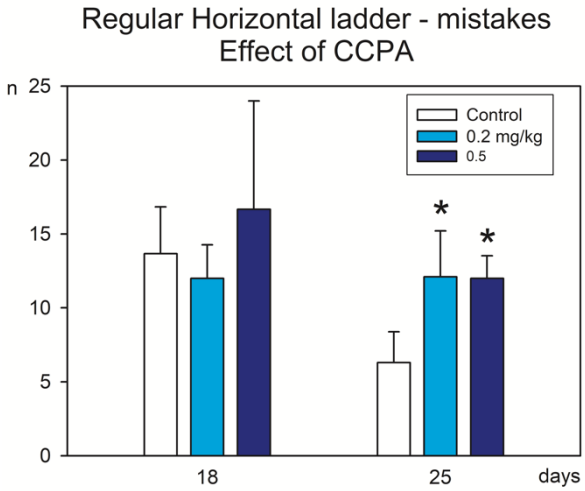
V tomto testu se ukázalo, že 25tidenní kontroly chybovaly při přechodu na druhý konec žebříku méně než 18tidenní (viz Obrázek 12). 25tidenní potkani po podání CCPA chybovali více než kontrolní skupina 25tidenních mláďat (viz Obrázek 13).

Také se ukázalo, že 25tidenní potkani přejdou žebřík na druhou stranu rychleji než 18tidenní při podání jakéhokoli množství látky nebo fyziologického roztoku (viz Obrázek 14) a zároveň 25tidenní potkani s 0,2 i 0,5 mg/kg CCPA přejdou žebřík pomaleji než 25tidenní kontroly (viz Obrázek 15).



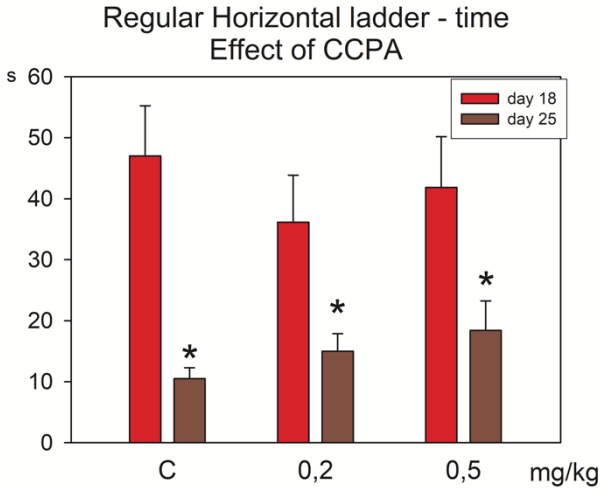
Obrázek 12. Graf porovnává počet chyb na pravidelném horizontálním žebříku 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA, na ose y je počet chyb. Jednotlivé věkové skupiny jsou označeny různými barvami.

Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči 18tidenním potkanům (červený sloupec).

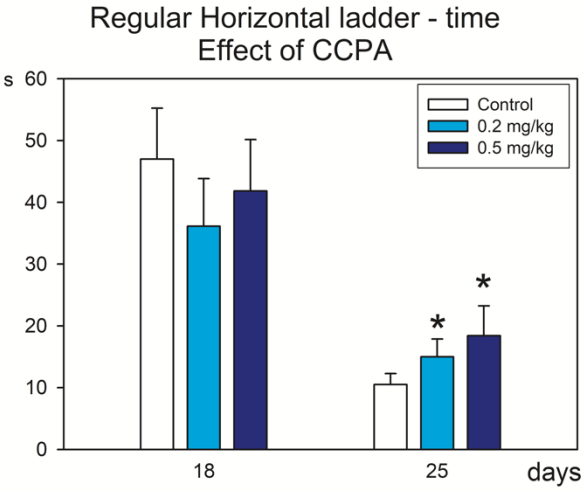


Obrázek 31. Graf porovnává počet chyb na pravidelném horizontálním žebříku 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 2 věkové skupiny, na ose y je počet chyb. Jednotlivé skupiny dle množství podaného CCPA jsou označeny různými barvami.

Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči kontrolním potkanům (bílý sloupec).



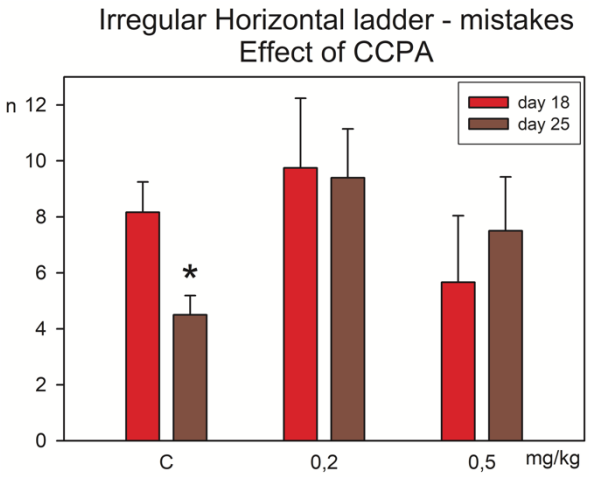
Obrázek 14. Graf porovnává dobu, za jakou přešli 18tidenní a 25tidenní potkani na konec pravidelného horizontálního žebříku v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA, na ose y je doba za jakou přešli žebřík. Jednotlivé věkové skupiny jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči 18tidenním potkanům (červený sloupec).



Obrázek 15. Graf porovnává dobu, za jakou přešli 18tidenní a 25tidenní potkani na konec pravidelného horizontálního žebříku v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 2 věkové skupiny, na ose y je doba, za jakou přešli žebřík. Jednotlivé skupiny dle množství podaného CCPA jsou označeny různými barvami. Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči kontrolním potkanům (bílý sloupec).

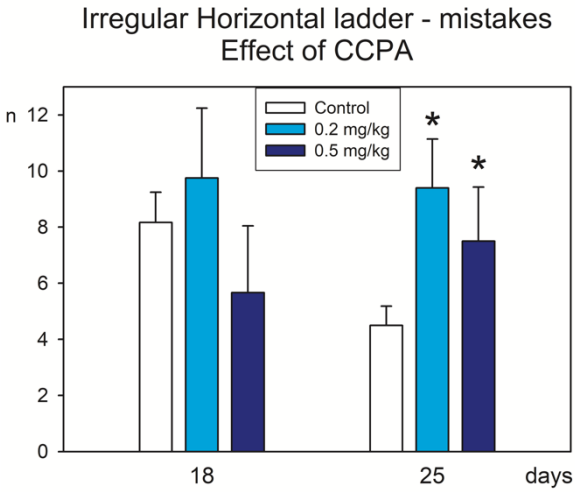
5.1.5. Nepravidelný horizontální žebřík

Tento motorický test ukázal, že 25tidenní kontroly chybovaly při přechodu na druhý konec žebříku méně než 18tidenní (viz Obrázek 16). 25tidenní potkani po podání CCPA chybovali více než kontrolní skupina 25tidenních mláďat (viz Obrázek 17).



Obrázek 16. Graf porovnává počet chyb na nepravidelném horizontálním žebříku 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 3 skupiny dle dávek CCPA, na ose y je počet chyb. Jednotlivé věkové skupiny jsou označeny různými barvami.

Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči 18tidenním potkanům (červený sloupec).



Obrázek 17. Graf porovnává počet chyb na nepravidelném horizontálním žebříku 18tidenních a 25tidenních potkanů v závislosti na množství podané látky. Na ose x jsou zobrazeny 2 věkové skupiny, na ose y je počet chyb. Jednotlivé skupiny dle množství podaného CCPA jsou označeny různými barvami.

Hvězdičkou jsou zobrazeny signifikantní rozdíly vůči kontrolním potkanům (bílý sloupec).

5.2 Kvalitativní hodnocení

V této části jsou popsány reakce mláďat na zkouškách, které nebylo možné zpracovat kvantitativně - šplhu po nakloněné rovině asurface righting.

Také jsou zde doplněny poznámky popisující chování potkanů na zkouškách již výše zmíněných v kvantitativním hodnocení - Open field, viu na hrazdě, pravidelný a nepravidelný horizontální žebřík.

5.2.1 Šplh po nakloněné rovině

Tabulka č. 1 – Výsledky testu šplhu na nakloněné rovině

dávka CCPA	Doba, kterou vydrželi viset/s	ušlá vzdálenost
c	60	třetina
c	60	třetina
c	60	třetina
c	21	celá vzdálenost
c	41	celá vzdálenost
c	45	celá vzdálenost
c	78	celá vzdálenost
c	30	celá vzdálenost
0,2	26	0
0,2	34	0
0,2	60	0
0,2	60	polovina
0,2	60	čtvrtina
0,2	15	0
0,2	29	0
0,2	15	čtvrtina
0,2	47	polovina
0,5	46	0
0,5	60	čtvrtina
0,5	53	0
0,5	po 20 sekundách zdolal úsek	celá vzdálenost
0,5	60	polovina
0,5	7	polovina
0,5	13	čtvrtina
0,5	25	polovina
0,5	26	0
0,5	22	třetina

5.2.2 Surface righting

U tohoto testu se pouze 2 mláďata odchylovala od zbylých, která se otočila do 1 sekundy. Obě patřila do 12tidenní věkové skupiny a bylo jim podáno větší množství látky. Jedno se otočilo za 2 sekundy (vykazovalo již v open fieldu záškuby celého těla způsobující elevaci celého těla nad podložku, připomínající výskok) a druhé za 11 s (mělo znatelně ztuhlou šíji).

5.2.3 Open field

U 4 z 9 12tidenních potkanů s dávkou 0,2 mg/kg se objevil tremor.

U 5 z 10 12tidenních potkanů s dávkou 0,5 mg/kg se objevil tremor, z toho u 2 z nich byla vidět znatelně ztuhlá šíje a jeden z této dvojice vykazoval v open fieldu záškuby celého těla způsobující elevaci celého těla nad podložku, připomínající výskok.

5.2.4 Vis na hrazdě

3 25tidenní potkani byli schopni při této zkoušce vylézt na hrazdu a bez problému se udržet déle, než byl stanovený limit jedné minuty. Dvěma z nich byl podán pouze fyziologický roztok a jeden z nich dostal CCPA v dávce 0,2 mg/kg.

5.2.5 Pravidelný horizontální žebřík

5.2.5.1 25tidenní potkani

Devět 25tidenních kontrol na konci tohoto horizontálního žebříku aktivně seskočilo za sourozenci, 1 došel na konec a poté se vrátil zpět na začátek.

Z potkanů s dávkou 0,2 mg/kg skočilo 8 mláďat a 1 opět došlo na konec žebříku a vrátilo se na start.

Po dávce 0,5 mg/kg skočilo za sourozenci jen 5 potkanů. 2 došli za 60 sekund jen do čtvrtiny žebříku.

5.2.5.2 18tidenní potkani

18tidenní potkani skákali za sourozenci méně často než 25tidenní. Z mláďat, kterým byl podán pouze fyziologický roztok, skočil za sourozenci pouze jeden potkan, jeden došel do půlky a zpět, 2 do čtvrtiny a zpět na start a 1 došel do tří čtvrtin žebříku.

Mezi potkany s dávkou 0,2 mg/kg se našli 3, kteří aktivně skočili ze žebříku a 2, kteří spíše spadli za sourozenci. Jeden došel do poloviny a 2 pouze do čtvrtiny žebříku.

S dávkou 0,5 mg/kg aktivně skočil pouze 1 osmnáctidenní potkan a 1 za sourozenci spadl. 1 mládě přešlo celý žebřík a vrátilo se na start a 3 potkani se neposunuli vůbec – z toho 2 se snažili o posun a třetí pouze nehybně ležel s končetinami propadlými mezi příčkami.

5.2.6 Nepravidelný horizontální žebřík

5.2.6.1 25tidenní potkani

Pět potkanů po podání fyziologického roztoku došlo na konec žebříku a vrátilo se zpět na start, 4 potkani došli na konec, ale neseskočili za svými sourozenci do košíku (1 z nich skočil 5 sekund po stanoveném limitu jedné minuty). 1 mládě zvládlo dojít jen do poloviny nepravidelného žebříku.

3 potkani po podání 0,2 mg/kg CCPA došli na konec žebříku a 2 z nich aktivně seskočili k sourozencům. 2 došli na konec a vrátili se zpět na začátek, 2 do poloviny a zpět na start, 1 pouze do poloviny (bez návratu) a 2 potkani došli do čtvrtiny horizontálního žebříku.

Po podání 0,5 mg/kg CCPA neseskočil aktivně žádný potkan, 2 došli na konec a vrátili se zpět na začátek žebříku a 1 došel do poloviny (bez návratu). 4 mláďata zůstala bez posunu na začátku žebříku.

5.2.6.2 18tidenní potkani

Z 18tidenních kontrol došel nakonec a spadl za sourozenci pouze 1 potkan. Jeden se neposunul vůbec, 1 došel do čtvrtiny žebříku a zpět na start a další 3 došli do poloviny žebříku, z čehož 1 v polovině propadl skrz příčky a sám, bez pomoci, se dostal zpět nahoru.

Po podání CCPA se žádný z 18tidenních potkanů nedostal za sourozenci do košíčku. 4 s množstvím CCPA 0,2 mg/kg došli do poloviny žebříku a 3 zůstali na začátku zcela bez posunu.

3 potkani s dávkou 0,5 mg/kg zůstali celých 60 sekund na startu, 2 došli do čtvrtiny a 1 do poloviny nepravidelného žebříku.

6. DISKUSE

Měřením motorických schopností 12tidenních, 15tidenních a 25tidenní potkanů po podání 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg se ukázalo několik následujících výsledků.

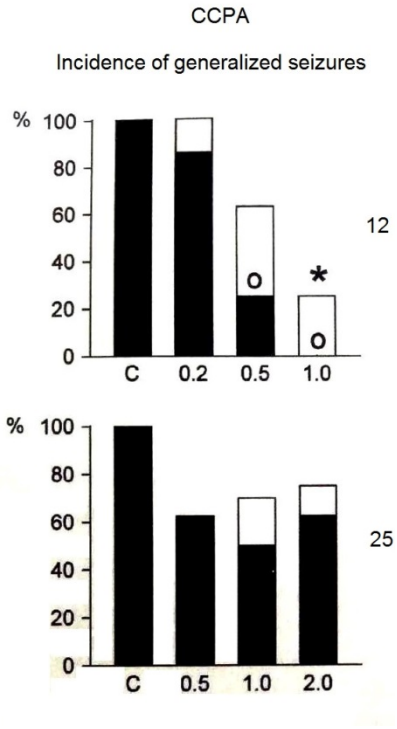
S rostoucím věkem se motorická výkonnost potkanů lepšila nejen u kontrolních skupin, ale i u potkanů s dávkou 0,2 mg/kg zůstává tento fyziologický rozdíl zachován. Podáním 0,5 mg/kg CCPA se ale rozdíl motorických schopností věkových skupin v mnoha zkouškách zmenšil.

Účinek CCPA se projevil nejvýrazněji u 12tidenních potkanů – u některých až zamezil pohybu úplně, či vyvolal nekontrolované záškuby celého těla, což může být projev negativního vedlejšího účinku a bude třeba se jím dále zabývat. Naopak u 25tidenních mláďat byl účinek nejméně znatelný - účinek CCPA je nejvýraznější u 12tidenních a s věkem klesá.

V některých testech se projevil také signifikantní rozdíl mezi motorickou výkonností potkanů s 0,2 mg/kg a 0,5mg/kg. Ke zhoršení výkonnosti došlo po podání vyšší dávky CCPA – jde o látku výrazně zesilující inhibici. Na začátku práce proběhl pokus o podání i 1 mg/kg, ale inhibiční efekt na zvíře byl tak markantní, že by ho nebylo možné v pokusech nijak použít. Výrazné tlumivé účinky zpochybňují možné klinické použití vyšších dávek. Výjimku by mohl tvořit například stav po hypoxii, po které je takovýto útlum naopak žádaný, protože se sníží metabolismus mozku, a vzniká proto menší pravděpodobnost zániku neuronů.

CCPA má také antikonvulzivní účinek. Ve studii prováděné na 12tidenních a 25tidenních potkanech bylo 12tidenním potkanům intraperitoneálně podáno CCPA v množství 0,2, 0,5 a 1 mg/kg. 25tidenní dostali látku v množství 0,5, 1, 2 a 5 mg/kg. Po 30 minutách bylo těmto potkanům podáno 100 mg/kg Pentetrazolu, látky schopné

vyprovokovat u potkanů tonicko-klonický záchvat. Bylo zjištěno, že antikonvulzivní účinek CCPA je nejvýraznější u 12tiddeních mláďat a s přibývajícím věkem klesá. Zároveň se u 12tidenních potkanů objevil signifikantní rozdíl mezi množstvím podané látky (Mareš, 2010). (Viz Obrázek 18)



Obrázek 18. Graf ukazuje četnost generalizovaných záchvatů u 12tidenních (nahoře) a 25tidenních (dole) potkanů po podání různých množství CCPA. Na ose x je množství podané látky a na ose y procentuálně vyjádřená četnost výskytů záchvatu. Hvězdička značí signifikanci vůči odpovídající kontrolní skupině potkanů; „o" značí rozdíly v incidenci tonické fáze záchvatu.

Navíc bylo zjištěno, že jsou to právě A1 adenosinové receptory (a ne A2A receptory), které hrají roli v korových epileptických následných výbojích. Nejsilnější účinek se projevil opět u 12tidenních potkanů a s přibývajícím věkem klesal (Mareš, 2014).

Díky těmto výsledkům je možné předpokládat, že by CCPA mohlo mít využití v klinické praxi např. po hypoxických stavech, kdy je potřeba zpomalit metabolismus a

snížit energetickou spotřebu buněk, nebo v léčbě dlouhotrvajících epileptických záchvatů v iktálním stádiu díky antikonvulzním účinkům, při nedostačujících účincích běžných antiepileptik. Objevily se ale některé studie, které ukazují, že se agonisté adenosinu mohou podílet na postiktální periodě - prodlužují postiktální depresi, zatímco např. kofein ji zkracuje (Boukhezra et al., 2003).

Je tu však ještě jedna věc, která by dle mého názoru neměla být opomenuta. Je skvělé, že veškeré pokusy musí být schváleny Ústřední komisí pro ochranu zvířat, která hlídá zneužívání těchto tvorů. Co už se ale neřeší, jsou zbytečné ztráty na životech některých potkanů, kteří takovýmto pokusem projdou.

Ano, dvě třetiny jich má v sobě látku, u které stále nevíme všechny důsledky, které by mohla vyvolávat. Pro jiné pokusy již nejdou použít, protože by je CCPA mohlo ovlivnit a jejich výsledek by nebyl relevantní. Zároveň není možné je použít jako potravu pro jiná zvířata, protože by se látka mohla v těle např. hada nebo ptáků uvolnit a ovlivnit tak jejich motorické schopnosti. Také nevíme, jestli zvířata po podání látky netrpí bolestmi, a proto po takovémto pokusu musí být tato zvířata zlikvidována dle předem schváleného, zákonně daného, protokolu Ústřední komisí pro ochranu zvířat. (viz Obrázek 19)

	Omezení počtu zvířat (Reduction)		
	Šetrné zacházení se zvířaty (Refinement)		
12.	**Plánované použití znecitlivění, prostředků snižujících bolest nebo jiných metod tlumících bolest; zdůvodnění jejich případného nepoužití**		
13.	**Hlavní operační vybavení, operační postupy a způsoby pooperační péče minimalizující bolest a stres zvířete**		
14.	**Způsob naložení s pokusnými zvířaty po ukončení pokusu** - *usmrcení, převedení do chovu (jakého?), opětovné použití,* **při opětovném použití jeho kumulativní dopad na daná pokusná zvířata**		
15.	**Metody usmrcování pokusných zvířat** - *odpovídající metody zaškrtněte (x) do prázdného políčka* Předávkování anestetikem Upoutaný projektil Oxid uhličitý Zlomení vazu Tupý úder do hlavy Oddělení hlavy od trupu Omračení elektrickým proudem Inertní plyny (Ar, N_2) Zastřelení volným projektilem odpovídající střelnou zbraní a střelivem Jiná metoda - žádost o udělení výjimky - *níže zdůvodněte*		
16.	**Původ pokusných zvířat** - *uveďte všechny předpokládané zdroje; u pokusných zvířat z volné přírody udávejte co nejpřesněji lokalitu (lokality) jejich odchytu*		
17.	**Podmínky umístění a chovu pokusných zvířat a péče o ně** včetně obohacení prostředí		
18.	**Způsob značení pokusných zvířat v pokusu**		
19.	**Uvedení zdravotního rizika pro další pokusná zvířata a pro zaměstnance**		
20.	**Pokus bude proveden za podmínek správné laboratorní praxe** (je-li to požadováno jinými právními předpisy – např. zákon o léčivech, zákon o chemických látkách a chemických přípravcích) - *správnou variantu zaškrtněte (x) do prázdného políčka* Ano Ne		
21.	**Datum**	**Razítko a podpis žadatele**	**Podpis vedoucího projektu pokusů**

Obrázek 19. Část vzoru formuláře žádosti o schválení projektu pokusů z Přílohy č. 4 k vyhlášce č. 419/2012 Sb.

Zbylá jedna třetina potkanů jsou však kontroly – byl jim tedy podán pouze fyziologický roztok. Smrt takovýchto zvířat mi teda přijde nadmíru zbytečná. Jako potrava nepředstavují vůbec žádné riziko, a přesto jsou tito potkani zlikvidování dle protokolu také. Jen z mého pokusu to bylo 10 12tidenních, 10 18tidenních a 10 25tidenních mláďat a u jiných pokusů je vždy potřeba minimálně 8 kontrol na věkovou kategorii, aby byl pokus relevantní. Přitom by se situace dala řešit smlouvou například se ZOO nebo s nějakým chovatelem, který by si pro zbylé potkany přijel.

Dle mého názoru by mělo být v zájmu nejen Ústřední komise pro ochranu zvířat, snažit se prosadit v zákoně povinnost smysluplně využít kontrolní potkany.

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit, jak jednorázové podání 0,2 mg/kg a 0,5 mg/kg 2-Chloro-N(6)-cyclopentyladenosinu, neboli CCPA změní vývoj motorických schopností laboratorního potkana a zda vyšší dávka bude mít větší vliv na spontánní lokomoci a motorické testy. CCPA je specifickým agonistou A1 adenosinových receptorů, které jsou nejvíce rozšířeným adenosinovým receptorem, vyskytujících se ve velkém množství především v CNS, ale také ve svalech, játrech, ledvinách, tukové tkáni v kardiovaskulárním systému, plících nebo varlatech. Tyto receptory podporují presynaptickou inhibici. V CNS podporuje tedy útlum a spánek a snižuje excitabilitu neuronů. Ve svalech se podílí na inhibici glykolýzy, v adipocytech inhibici lipolýzy, a v tukové tkáni i ve svalech na zvýšení absorpce glukózy, zpomaluje tak metabolismus a snižuje energetickou spotřebu buňky. V srdci snižuje srdeční tlak a frekvenci a také ho částečně chrání při ischemii srdeční tkáně před následnými událostmi jako například infarkt nebo arytmie.

Potkan je vhodný pro takovéto výzkumy především proto, že jeho motorický vývoj chronologicky odpovídá vývoji člověka. Zároveň díky třikrát až čtyřikrát do roka se opakující březosti matek s počtem deseti až dvanácti mláďat ve vrhu není tak těžké získat přesnou věkovou skupinu s dostatkem probandů pro určitý pokus. Díky vývoji hematoencefalická bariéry až ve druhé polovině třetího týdne po narození, dostane intraperitoneálně podané CCPA bez problémů do mozku, kde může působit.

Testovány byly skupiny 12tidenních, 18tidenní a 25tidenních potkanů. CCPA bylo zapotřebí smíchat s kapkou TWEENu a zředit fyziologickým roztokem. Suspenzi jsme pak nechali 10 minut pod působením magnetické míchačky a poté vpichovali intraperitoneální injekcí mláďatům potkana. Po 20 minutách od vpichu byli potkani

testováni nejprve v Open fieldu a potom dle věkových kategorií na testy motorických schopností – vis na hrazdě, negativní geotaxe, surface righting, šplh po nakloněné rovině, pravidelný a nepravidelný horizontální žebřík a rotarod.

Dle očekávání z chemické podstaty CCPA a některých předchozích výzkumů má tento agonista A1 adenosinového receptoru na motorické schopnosti značný inhibiční vliv.

U 12tidenních potkanů měl na spontánní lokomoci a motorické testy největší účinek, naopak u 25tidenní mláďat byl nejméně znatelný. Při podání 0,5mg/kg CCPA došlo ke většímu zesílení inhibice motoriky než po podání 0,2 mg/kg CCPA. Výrazné tlumivé účinky zpochybňují možné klinické použití vyšších dávek, pokud by takovýto útlum nebyl naopak žádaný (např. stav po hypoxii). Díky svému antikonvulznímu účinku, které je opět nejvýraznější u 12tiddeních mláďat a s přibývajícím věkem klesá, se nabízí možnost využití v léčbě epileptických záchvatů.

8. SEZNAM LITERATURY

ALTMAN, J.; SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Animal Behaviour, 1975, 23, 896-920.

BARSOTTI, C.; IPATA, P. L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* . 2004, **36**(11), 2214-2225 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.04.015. ISSN 13572725.

BOISON, D.; CHEN, J. F.; FREDHOLM, B. B. Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death & Differentiation*. 2010, **17**(7), 1071-1082 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1038/cdd.2009.131. ISSN 1350-9047.

BOISON, D. Adenosine and Seizure Termination: Endogenous Mechanisms. Epilepsy Currents. 2019, 13(1), 35-37 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.5698/1535-7511-13.1.35. ISSN 1535-7597.

BOUKHEZRA, Olia, Peter RIVIELLO, Dong Dong FU, Xianzeng LUI, Qian ZHAO, Cigdem AKMAN a Gregory L HOLMES. Effect of the postictal state on visual-spatial memory in immature rats. *Epilepsy Research*. 2003, **55**(3), 165-175 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1016/S0920-1211(03)00111-6. ISSN 09201211.

BROCARD, F.; VINAY, L; CLARAC, F. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. Brain research. Developmental Brain Research 1999,117, 81-89.

CALAMANDREI, G. Ethological and methodological considerations in the use of newborn rodents in biomedical research. Annali dell'lstituto superiore di sanita, 2004, 40, 195-200.

CLARAC, F.; VINAY, L; CAZALETS, J. R.; FADY, J. C; JAMON, M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. Brain Research Reviews, 1998, 28, 35-43.

DECKING, U. K. M.; SCHLIEPER, G.; KROLL, K.; SCHRADER, J. Hypoxia-Induced Inhibition of Adenosine Kinase Potentiates Cardiac Adenosine Release. *Circulation Research*. 1997, **81**(2), 154-164 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1161/01.RES.81.2.154. ISSN 0009-7330.

DEUSSEN, A., B. BADING, M. KELM a J. SCHRADER. Formation and salvage of adenosine by macrovascular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1993, **264**(3), H692-H700 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1152/ajpheart.1993.264.3.H692. ISSN 0363-6135.

FREDHOLM, B. B. Adenosine receptors as drug targets. *Experimental Cell Research*. 2010, **316**(8), 1284-1288 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.004. ISSN 00144827.

GEISLER, H. C.; WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. Development of posture in the rat. Acta neurobiologiae experimentalis, 1993, 53, 517-523.

GRAMSBERGEN, A. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development? Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 1998, 22, 547-553.

HEYSER, C. J. Assessement of developmental milestones in rodents. Current Protocols in Neuroscience, 2003, 25, 8.18.1-8.18.15.

CHEN, J-F.; ZHANG, S.; ZHOU, R.; LIN, T.; CAI, X.; LIN, J.; HUO, Y.; a LIU, X. Adenosine receptors and caffeine in retinopathy of prematurity. Molecular Aspects of Medicine . 2017, 55, 118-125 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1016/j.mam.2017.01.001. ISSN 00982997.

CHOI, J-S.; BERDIS, A. J. Nucleoside transporters: biological insights and therapeutic applications. *Future Medicinal Chemistry*. 2012, **4**(11), 1461-1478 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.4155/fmc.12.79. ISSN 1756-8919.

KIESMAN, W. F.; ELZEIN, E.; ZABLOCKI, J. A1 Adenosine Receptor Antagonists, Agonists, and Allosteric Enhancers. WILSON, Constance N. a S. Jamal MUSTAFA, ed. Adenosine Receptors in Health and Disease. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, 2009-5-28, s. 25-58 [cit. 2019-12-07]. Handbook of Experimental Pharmacology. DOI: 10.1007/978-3-540-89615-9_2. ISBN 978-3-540-89614-2.

LELARD, T.; JAMON, M.; GASC, J. P.; VIDAL, P. P. Postural development in rats. Experimental Neurology, 2006, 202, 112-124.

LLOYD, H. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochemistry International*. 1995, **26**(4), 387-395 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1016/0197-0186(94)00144-J. ISSN 01970186.

MAREŠ, P. Anticonvulsant action of 2-chloroadenosine against pentetrazol-induced seizures in immature rats is due to activation of A1 adenosine receptors. *Journal of Neural Transmission*. 2010, **117**(11), 1269-1277 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1007/s00702-010-0465-9. ISSN 0300-9564.

MAREŠ, Pavel. A1 not A2A adenosine receptors play a role in cortical epileptic afterdischarges in immature rats. *Journal of Neural Transmission*. 2014, **121**(11), 1329-1336 [cit. 2020-04-15]. DOI: 10.1007/s00702-014-1234-y. ISSN 0300-9564.

MCCUTCHEON, J. a M. MARINELLI. Age matters. European Journal of Neuroscience. 2009, 29(5), 997-1014. ISSN 1521-0103.

MÜLLER, CH. E.; JACOBSON, K. A. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2011, 1808(5), 1290-1308 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.12.017. ISSN 00052736.

MUNDELL, S.; KELLY, E. Adenosine receptor desensitization and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2011, **1808**(5), 1319-1328 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.06.007. ISSN 00052736.

MUIR, G. D. Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparision between altricial and precocial animals. Brain Research Bulletin, 2000, 53, 719-726.

MURPHREE, L. J.; LINDEN, J. *Adenosine Receptors*. In: LENNARZ, W. J.; LANE, M. D. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 34 - 38 s., Boston: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-12-443710-4.

NOVOTNÝ, J. Adenosin a jeho role ve fyziologii. *Československá fyziologie,* 64/2015 č. 1, 35-44.

RIVERA-OLIVER, M.; DÍAZ-RÍOS, M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: A review. Life Sciences. 2014, 101(1-2), 1-9 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.01.083. ISSN 00243205.

SACHDEVA, S.; GUPTA, M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013, **21**(3), 245-253 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.011. ISSN 13190164.

SHETH, S.; BRITO, R.; MUKHERJEA, D.; RYBAK, L.; RAMKUMAR, V. Adenosine Receptors: Expression, Function and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, **15**(2), 2024-2052 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.3390/ijms15022024. ISSN 1422-0067.

SCHENONE, S., C. BRULLO, F. MUSUMECI, O. BRUNO a M. BOTTA. A1 Receptors Ligands: Past, Present and Future Trends. *Current Topics in Medicinal*

Chemistry. 2010, **10**(9), 878-901 [cit. 2020-01-03]. DOI: 10.2174/156802610791268729. ISSN 15680266.

TURNER, M. A.; YANG, X.; YIN, D.; KUCZERA, K.; BORCHARDT R. T.; P. Lynne HOWELL, P. L. Structure and Function of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Cell Biochemistry and Biophysics* . 2000, **33**(2), 101-125 [cit. 2019-12-28]. DOI: 10.1385/CBB:33:2:101. ISSN 1085-9195.

VACHOVCOVÁ, S. *Vliv perinatální hypoxie na motorický vývoj laboratorního potkana a možnosti ovlivnění.* Diplomová práce, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Praha, 2014. Vedoucí práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

VINAY, L.; BEN-MABROUK, F.; BROCARD, F.; CLARAC, F.; JEAN-XAVIER, C.; PEARLSTEIN, E.; PFLlEGER, J. F. Perinatal development of the motor systems involved in postural control. Neural plasticity, 2005, 12,131-139.

VÍTOVÁ, Š. *Vývoj motorických schopností laboratorního potkana*. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Praha, 2010. Vedoucí práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Vyhláška č. 299/2014 Sb., kterou se mění vyhláška č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat Čl.I. Platnost od 18. 12. 2014. Účinnost od 01. 01. 2015. In: *Sbírka zákonů*. 3. 2. 2012.