

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Bc. Tereza Košťálová

**Účinky neuroaktivního steroidu na motoriku
mláďat laboratorního potkana**

Diplomová práce

Praha 2020

Autor práce: **Bc. Tereza Košťálová**

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

Oponent práce: **RNDr. Karel Valeš, PhD.**

Datum obhajoby: **2020**

Bibliografický záznam

KOŠTÁLOVÁ, Tereza. Účinky neuroaktivního steroidu na motoriku mláďat laboratorního potkana. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství, 2020. 86 s. Vedoucí diplomové práce prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Abstrakt

Látky steroidní povahy s vlivem na nervovou tkáň jsou v posledních letech hojně zkoumané pro své široké využití. Jejich největší přínosem jsou účinky antikonvulzivní a anxiolytické účinky. Tato práce zkoumá vliv nově objeveného neuroaktivního steroidu pregnanolonpyroglutamátu syntetizovaného v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚCHOB AV ČR), který z dosavadních farmakokinetických výsledků nabízí potencionální možnost nové terapie epilepsie. Naším cílem bylo zjistit, zda tato látka nemá negativní vliv na motoriku u mláďat laboratorního potkana. V teoretické části diplomové práce je stručně uveden popis vývoje laboratorního potkana, zejména jeho motoriky a senzorických funkcí a srovnání s vývojem u člověka. V metodice je popsán průběh experimentů a volba vybraných zejména motorických testů. V praktické části budou popsány výsledky testování a jejich srovnání s účinkem dalších neuromediátorů. Nenalezli jsme žádné závažné postižení motoriky jako důsledek opakovaného perinatálního podání PPG. Akutní podání dávky 10 mg/kg zhoršovalo výkonnost potkanů v některých testech (surface righting, negative geotaxis). Tyto výsledky jsou důležité pro možné budoucí využití neuroaktivních steroidů v pediatrické praxi.

Klíčová slova

laboratorní potkan, vývoj, lokomoce, motorické testování, neuroaktivní steroidy, epilepsie

Bibliographic record

KOSTALOVA, Tereza. Effects of a neuroactive steroid on motor functions of young laboratory rat. Prague: Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Department of Rehabilitation and Sports medicine, 2020. 86 p. Supervisor of the work prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Abstract

The steroid substances with effect on nervous tissue are plenteously studied in last years. Their biggest benefits are especially anticonvulsant and anxiolytic effects. This thesis inspects the influence of newly discovered neruactive steroid pregnanolone pyroglutamate synthesized in The Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Science (IOCB CAS), which offer potential opportunity of a new therapy of epilepsy from actual pharmacokinetic results. Our goal was to detect, if this substance has any negative effects on locomotor skills of young laboratory rats. In theoretical part of the thesis the development of laboratory rat is briefly descibed, especially its motor skills and sensory functions in comparison with human. The process of the experiments and choice of especially motor skill tests are described in Metogology part. The results of experiment and its comparation with the effect of other neuromediators are introduced and discussed in the practical part of this thesis. There were no serious effects of pregnanolonepyroglutamate applied repeatedly in perinatal period on motor performance. Acute administration of the highest dose of PPG to 12-day-old rat pups resulted in prolongation of time in surface righting and negative geotxis tests. This data are positive for future introduction of neuroactive steroids into pediatric practice.

Keywords

laboratory rat, development, locomotion, motor skilil testing, neuroactive stroids, epilepsy

Prohlášení

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

V Praze 11.5.2020

Bc. Tereza Košťálová

Poděkování

Ráda bych touto cestou mnohokrát poděkovala panu profesoru Pavlu Mareši a jeho kolegům z Fyziologického ústavu AV ČR za jejich vstřícnost, přístup a pomoc při zpracování této diplomové práce, za jejich cenné rady a možnost se na výzkumu podílet.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	9
ÚVOD.....	11
1 EPILEPSIE	12
2 LÁTKY STEROIDNÍ POVAHY S VLVIVEM NA NERVOVOU TKÁŇ	14
2.1 ENZYMY VE STERIDOGENEZI V NERVOVÉM SYSTÉMU	14
2.2 REAKCE LÁTEK STEROIDNÍ POVAHY S VLVIVEM NA NERVOVOU TKÁŇ NA RECEPTORECH.....	15
2.2.1 GABA receptory	15
2.2.2 Glycinové receptory.....	16
2.2.3 Glutamátové receptory.....	17
2.3 ENDOGENNÍ STEROIDY	17
2.3.1 Allopregnanolon	18
2.4 EXOGENNÍ STEROIDY	19
2.4.1 Pregnanolon glutamát	20
2.5 DALŠÍ ÚČINKY LÁTEK STEROIDNÍ POVAHY NA ORGANISMUS.....	20
2.5.1 Ovlivnění nálad.....	20
2.5.2 Ovlivnění paměti	21
3 POSTNATÁLNÍ MOTORICKÝ VÝVOJ LABORATORNÍHO POTKANA.....	22
3.1 OBECNÉ INFORMACE	22
3.2 POROVNÁNÍ VÝVOJE ČLOVĚKA A POTKANA	22
3.3 VÝVOJ LOKOMOCE LABORATORNÍHO POTKANA	23
3.4 VÝVOJ SENZORICKÝCH FUNKCÍ LABORATORNÍHO POTKANA.....	26
4 CÍLE A HYPOTÉZY	29
5 METODIKA	30
5.1 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE.....	30
5.2 VÝBĚR ZVÍŘAT	30
5.3 PRŮBĚH TESTOVÁNÍ	30
5.3.1 Akutní účinky neuroaktivního steroidu	30
5.3.2 Dlouhodobé účinky neuroaktivního steroidu	31
5.4 BATERIE MOTORICKÝCH TESTŮ.....	31
5.4.1 Openfield test.....	32
5.4.2 Surface righting test.....	32
5.4.3 Negative geotaxis test	33
5.4.4 Bar holding test.....	33
5.4.5 Wire mesh ascending test	33
5.4.6 Test chůze po pravidelném a nepravidelném horizontálním žebříku.....	34
5.4.7 Passive avoidance test.....	34
5.4.8 Jumping down with choice test.....	35
6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT.....	37
7 VÝSLEDKY.....	38
7.1 KRÁTKODOBÉ ÚČINKY	38
7.1.1 Surace righting test	38
7.1.2 Bar holding test.....	38
7.1.3 Negative geotaxis test	39
7.1.4 Wire mesh ascending test	40
7.1.5 Chůze po pravidelném horizontálním žebříku	41
7.1.6 Chůze po nepravidelném horizontálním žebříku	42
7.1.7 Open field test.....	43
7.2 DLOUHODOBÉ ÚČINKY	47
7.2.1 Surface righting test	47
7.2.2 Bar holding test.....	47
7.2.3 Negative geotaxis test	49

7.2.4	Wire mesh ascending test	50
7.2.5	Chůze po pravidelném horizontálním žebříku	51
7.2.6	Chůze po nepravidelném horizontálním žebříku	54
7.2.7	Jumping down with choice test.....	57
7.2.8	Passive avoidance test.....	58
7.2.9	Open field test.....	59
7.3	VÝSLEDKY HYPOTÉZ.....	70
8	DISKUZE	71
	ZÁVĚR	74
	REFERENČNÍ SEZNAM	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM GRAFŮ	85

SEZNAM ZKRATEK

- AED – antiepileptika
ALLO – allopregnanolon
AV ČR – Akademie věd České republiky
CA3 – oblast hippocampu
cDNA – komplementární DNA
CDX - cyklodextrin
CNS – centrální nervový systém
CPGs – generátory centrálních vzorů chování
DHEA –S – dehydroepiandrosteron sulfát
DHT - dihydrotestosteronu
E0-E21 – embryonální den 0 - 21
EEG – elektroencefalogram
FGU – Fyziologický ústav
GABA – gamaaminomáselná kyselina
GABA A – receptor pro kyselinu GABA
HEK293 – lidské embryonální ledvinné buňky 293
HSD - hydroxysteroid dehydrogenáza
IOCB CAS - The Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Science
MK-801 – dizociplin, nekompetitivní antagonist NMDA
NMDA – N-methyl-D-asparat receptor
P7 – sedmý postnatální den
P450scc – postranní řetězec odštěpující enzym
PG - pregnanolon glutamát
PMDD - premenstruační dysforická porucha
PPG – pregnanolonpyroglutamát
PREG – pregnenolon
PREG-S – pregnenolon sulfát
PS – pregnanolon sulfát
SRS – spontánní rekurentní záchvaty
StAR – steroidní akutní regulační protein

T50 – střední toxická dávka

ÚCHOB – Ústav organické chemie a biochemie

ÚVOD

Téma své diplomové práce jsem si vybrala na základě možnosti zapojit se do preklinického výzkumu nové antikonvulzivní látky, která má přinést další možnost v terapii epilepsie zejména pro dětské pacienty. I když se může zdát, že toto téma nemá s fyzioterapií nic společného, opak je pravdou. Také v naší profesi se můžeme setkat s klienty s epilepsií, a proto je dobré znát komplexní přístup a léčbu.

Některé léky mohou ovlivnit motoriku člověka, na což musíme jakožto terapeuti myslet a umět s touto skutečností pracovat. To je důvod, proč se ve své práci zaměřuji na zjištění vlivu vybraného neuroaktivního steroidu na motoriku laboratorního potkana. Pacientů s tímto onemocněním stále přibývá a bohužel je i vysoké procento těch, kteří na farmakologickou léčbu nereagují

Brodie, Schachter a Kwan (2005) ve své práci uvádějí, že procento bezzáchvatovosti se po užití prvního správně zvoleného antiepileptika (AED) pohybuje okolo 40 % a více. Použití dvojkombinace AED je nejčastější z důvodu nedosažení dostatečné bezzáchvatovosti monoterapií. Zde ovšem narážíme na zvýšené riziko nežádoucích vedlejších účinků a vzájemného ovlivňování farmak a jejich účinnost kombinací klesá na 10-15 %. Třetí AED má úspěšnost pouze okolo 5-1 % a dále tendence klesá (Brodie, Schachter a Kwan, 2005; Olejšková, 2008). Z tohoto důvodu mi přijde důležité se zajímat také o výzkum a alespoň malou mírou přispět k lepší terapii. Samozřejmě přáním by bylo vyvinout látku, která by měla v monoterapii co největší úspěch a zároveň co nejmenší vliv na vývoj nežádoucích vedlejších účinků mezi které patří i negativní vliv na motoriku.

Teoretická část se bude věnovat popisu epilepsie, jejím projevům a možné farmakologické léčbě. Dále bude vysvětlen rozdíl mezi neuroaktivními steroidy a neurosteroidy a jejich mechanismus účinku. Následovat bude část, která se bude věnovat postnatálnímu motorickému vývoji laboratorního potkana a jeho srovnání s člověkem. V metodické části bude představen průběh výzkumu, popis vybraných skupin potkanů a motorických testů.

Ve speciální části diplomové práce budou představeny metody statistického zpracování dat, zhodnocení výsledků, diskuze o dané problematice a na závěr zhodnocení práce.

1 EPILEPSIE

Epilepsie je chronické onemocnění mozku, které se manifestuje opakovanými epileptickými záchvaty. Ty jsou doprovázeny pravděpodobností opakování záchvatů a možností obecné recidivy po dvou prodělaných záchvatech. Důsledkem toho onemocnění je zvýšené riziko negativního ovlivnění neurologického, kognitivního a psychosociálního stavu dětí, což v celkovém obraze ovlivňuje kvalitu života nejen malých pacientů, ale zároveň celé rodiny více než samotné záchvaty (Pellock et al., 2017; Fisher et al., 2014; Sýkora, 2015).

Epilepsie je ovšem složitější onemocnění než jen opakované záchvaty. Nejedná se pouze o nozologickou jednotku, nýbrž jde o onemocnění s různou etiologií, klinickým obrazem, průběhem a léčbou. Zejména dětské pacienty s epilepsií představují z klinického hlediska rizikovou skupinu. Důležité také je, že nacházíme věkově specifické změny v typech záchvatů, což by mohlo být výsledkem rozdílů v propojení a funkci různých mozkových oblastí (Pellock et al., 2017; Sýkora, 2015; Baca et al., 2011).

Můžeme rozlišit tři základní charakteristické znaky dětské epilepsie:

1. vysoká četnost výskytu – přibližně každé desáté dítě zažije epileptický záchvat nebo záchvat, který epilepsii připomíná či imituje,
2. syndromologická rozmanitost – je známo okolo třiceti elektroklinicky specifických epileptických syndromů,
3. vývojová dynamika – vázanost na určité vývojové období (Komárek, 2003).

Záchvaty se projevují náhlou, přechodnou, stereotypní poruchou funkcí mozku. Nejčastěji se vyskytuje porucha vědomí, chování, emocí, motorických, senzitivních a sensorických funkcí. Dochází k tomu díky patologickým výbojům v mozkové kůře (Sýkora, 2015).

Na základě klinického obrazu a EEG nálezu se záchvaty rozdělují podle komise International League Against Epilepsy na parciální, generalizované a neklasifikovatelné (Sýkora, 2015).

První klinické a EEG příznaky parciálních záchvatů se projevují tak, že výboje neuronů vznikají v určité ohraničené části mozkové kůry (Sýkora, 2015).

Jako generalizované se označují záchvaty, při kterých klinické a EEG příznaky ukazují na iniciální postižení celého mozku, tedy obou hemisfér. Mezi generalizované záchvaty řadíme absence, myoklonické, atonické, tonické, klonické, tonicko-klonické záchvaty a infantilní spazmy (Sýkora, 2015).

Kromě EEG nálezu je k diagnostice důležité také zhodnocení anamnézy, neurologického a psychologického statusu, výsledků neurozobrazovacích vyšetření, věku vzniku a případně jiných znaků (Sýkora, 2015).

Existuje také výskyt epilepsií, které nesplňují kritéria parciálních ani generalizovaných záchvatů. Ty se označují jako neklasifikovatelné (Sýkora, 2015).

Etiologicky se dětské epilepsie odlišují od dospělých. U dospělých se vyskytují nejčastěji symptomatické epilepsie (traumata, nádory, cévní onemocnění), zatímco u dětí převládají vrozené poruchy kortikálního vývoje (korové dysplazie), anebo genetické mutace (zejména poruchy iontových kanálů), případně perinatální poškození mozku (Komárek, 2003).

Epidemiologické studie ukazují, že záchvaty a epilepsie postihuje kojence a děti více než jiné věkové skupiny. Také febrilní křeče jsou časté s výskytem u 2-5 % dětí celosvětově. A v neposlední řadě také incidence status epilepticus je ve vyspělých zemích (kde jsou spolehlivé statistické údaje) vyšší u dětí než u dospělých (Pellock et al., 2017). Tato klinická data nasvědčují tomu, že vyvíjející se mozek má vyšší sklony k tvorbě záchvatů než mozek dospělého, což bylo zjištěno v experimentálním modelu u nezralých zvířat (Pellock et al., 2017; Stafstrom et al., 1992). Vyšší schopnost nezralého mozku generovat záchvaty vychází z mnoha faktorů. Některé buněčné a molekulární vývojové charakteristiky přispívají k náchylnosti k záchvatům nezralého mozku. Avšak chápání důvodů proč se specifické syndromy objevují v určitém věku je stále limitováno (Pellock et al., 2017).

Četné změny objevující se během vývoje a zrání mozku přispívají k relativní nerovnováze mezi excitačním a inhibičním nervovým přenosem. Mimoto samotný porod zvyšuje riziko poškození mozku a následný rozvoj vývojových abnormalit mozku nebo genové mutace projevující se během dětství. Záchvaty vznikající v raném věku přinášejí podstatné následky pro zrání a funkce mozku. I když u nezralých zvířat je méně pravděpodobné projevení neuronálního postižení a rychlé rozvinutí epilepsie v odpovědi na poškození v porovnání s dospělými, dlouhotrvající záchvaty u některých modelů mají za následek závažné mozkové postižení doprovázené epileptogenezí a výskytu spontánních rekurentních záchvatů (SRS) (Pellock et al., 2017).

2 LÁTKY STEROIDNÍ POVAHY S VLIVEM NA NERVOVOU TKÁŇ

Určité látky steroidní povahy jsou schopny regulovat neuronální aktivitu nongenomickou cestou, tedy přímým kladným či záporným ovlivněním receptorů na membráně buněk centrálního, ale i periferního nervového systému. Podle mechanismu vzniku mohou být rozděleny do dvou hlavních kategorií – exogenní steroidy (syntetické, neuroaktivní) a endogenní steroidy (neurosteroidy) (Knytl a Mohr, 2016; Dorda et al., 2001; Zheng, 2009).

Tyto substance jsou nezbytné pro správné fungování mozku a také mají důležitou funkci ve stresových odpovědích. Výzkumy dokazují, že tyto steroidní látky mají obecně anxiolytický, sedativní, antidepressivní, antikonvulzivní, a dokonce i antipsychotický účinek a jejich koncentrace může být ovlivňována léky podanými během terapie (Knytl a Mohr, 2016).

Ritsner a Weizman (2008) popisují, že během posledních let se zvyšuje zájem o zjišťování účasti steroidních látek na funkcích mozku a psychickém zdraví. Účinky se zkoumají nejen z pohledu teoretického, ale zaměřují se také na možnosti klinického a terapeutického využití. Zvýšení počtu publikací v této problematice potvrzuje potřebu zajímat se o tuto problematiku. Dále Ritsner a Weizman (2008) dodávají, že během let 2000-2007 bylo publikováno nejméně 400 článků popisujících účinky steroidních látek na nervové funkce člověka, což tento zájem potvrzuje.

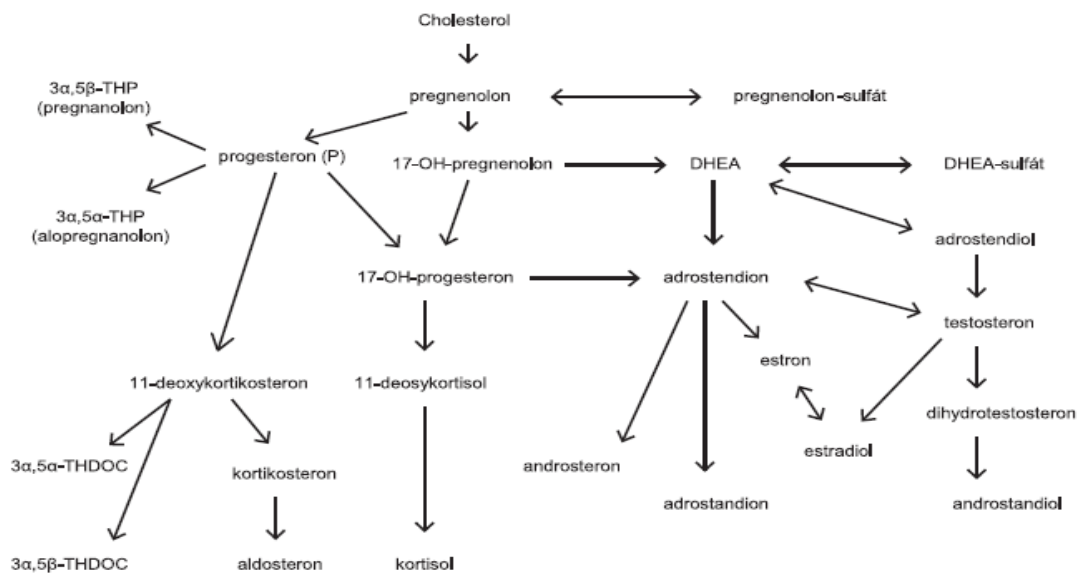
2.1 Enzymy ve steroidogenezi v nervovém systému

Všechny látky steroidní povahy jsou tvořeny v lidském těle z cholesterolu. Zdroj cholesterolu v mozku vzniká syntézou de novo. Enzymy, které vytváří steroidy, jsou lokalizované na specifických buňkách v nervovém systému a zahrnují dva proteiny, které spouští steroidogenezi jsou cytochrom P450_{scc} a steroidogenní akutní regulační protein (StAR). Přítomnost P450_{scc} značí místa schopná syntetizovat steroidy (King, 2013).

První krok při hormonální a rychlost limitující regulaci syntézy všech steroidních hormonů je přeměna cholesterolu na pregnenolon (PREG). Tato reakce je vyvolána mitochondriálním enzymem P450_{scc}, který odštěpuje postranní řetězec (side-chain cleavage). Přeměna cholesterolu na PREG zahrnuje tři chemické reakce - 20 α

hydroxylaci, 22 hydroxylaci a štěpení C20-C22 uhlíkové vazby. Substrát cholesterolu je přiváděn k P450_{scc} z vnější mitochondriální membrány přes aktivitu StAR. Tudíž exprese StAR značí místa s probíhající steroidní syntézou. Produkty těchto reakcí jsou pregnenolon a kyselina kapronová. Proteinové čištění a klonování komplementární DNA (cDNA) ukázalo, že jen jediný protein je zodpovědný za tyto reakce a že tento stejný protein se nachází ve všech steroidogenních tkáních, včetně mozku. Eliminace P450_{scc} nebo StAR má za následek extrémní úbytek steroidů (Baulieu et al., 1999; King, 2013).

Enzym P450_{scc}, který limituje rychlost steroidogeneze patří mezi nejpomalejší známé enzymy s rychlostí $V_{\max} = 1$ mol cholesterolu/mol enzymu. Nejpomalejší fází této reakce je nejspíš průchod cholesterolu do mitochondrie a vazba na aktivní místo P450_{scc} (Baulieu et al., 1999).



Obrázek 1: Zjednodušené znázornění steroidogeneze (Knytl a Mohr, 2016)

2.2 Reakce látek steroidní povahy s vlivem na nervovou tkáň na receptorech

2.2.1 GABA receptory

Jedním z využívaných kroků pro antiepileptickou a antikonvulzivní léčbu je zesílení účinnosti GABAergního systému. GABA (gamaamino máselná kyselina) je neproteinogenní aminokyselina a hlavní inhibiční neurotransmitter ve zralém nervovém systému (Farrant a Kaila, 2007). Působí zejména na ionotropních GABA-A a metabotropních GABA-B receptorech, kde inhibuje postsynaptické neurony

hyperpolarizací membrány, anebo zvýšením membránové vodivosti, a tím snižuje excitační vstupy (Farrant a Kaila, 2007; Sharopov et al., 2019).

Antiepileptika ovlivňují GABAergní systém inhibicí zpětného vychytávání nebo degradací GABA aktivací GABA-A receptorů, nebo se chovají jako pozitivní modulátory GABA-A receptorů (Rho a Sankar, 1999). Pozitivní modulace GABA-A receptorů je také zprostředkována neurosteroidy (Farrant a Kaila, 2007; Carver a Reddy, 2013; Sharopov et al., 2019).

GABA-A receptory jsou heteropentamerické, chloridové iontové kanály složené z 5 podjednotek – 2 α , 2 β a jeden δ , γ , θ , ρ , π nebo ϵ . Složení podjednotek udává biofyzikální a farmakologické vlastnosti receptoru stejně jako jeho subcellulární exprese. Příkladem může být tendence přítomnosti γ podjednotky GABA-A receptoru k zprostředkování fázického toku a její přítomnost na synapsi. Zatím co δ obsahující podjednotku GABA-A receptory mají tendenci zprostředkovat tonický tok a její přítomnost extrasynapticky (Hammond et al, 2017).

2.2.2 *Glycinové receptory*

Na vazebná místa pro glycin a glutamát se váží kompetitivní antagonisté NMDA receptorů, kde tedy zabraňují vazbě agonistů. Typickým znakem je snížení inhibiční funkce se zvýšenou koncentrací agonistů (Kemp et al, 1988; Birch et al, 1988). Působení jednotlivých neurosteroidů na receptorech je dáno jejich individuálním podjednotkovým složením. Například allopregnanolon a pregnenolon zesilují tok $\alpha 1$ glycinového receptoru. Pregnenolon nemá efekt na $\alpha 2$. Progesteron inhibuje sice rekombinantní $\alpha 2$, ale nemá efekt na potenciaci glycinové indukce receptorů obsahujících $\alpha 1$ podjednotku vyskytující se u lidských embryonálních ledvinných buněk (HEK293). Estradiol inhibuje receptory obsahující $\alpha 2$ a $\alpha 2\beta$, zatímco přítomnost $\alpha 1$ vede k necitlivosti na steroidy. DHEA-S inhibuje $\alpha 1$ a $\alpha 2$ receptory na nižší koncentraci než $\alpha 4$. Tudíž změny v uspořádání podjednotek vyskytující se s vývojem, upravují efekt neurosteroidů na glycinové receptory (King, 2013).

Glycinově navozený tok je zesílený koncentrací allopregnanolonu (ALLO) při hodnotě 1 $\mu\text{mol/l}$ a nižší. Progesteron, estradiol a pregnanolon naopak působí proti aktivaci glycinově propustných chloridových kanálů. Pregnenolon sulfát a DHEA-S (dehydroepiandrosteron sulfát) patří mezi silnější inhibitory. Mechanismus, kterým k tomu dochází, je mezi steroidy rozdílný. Progesteron je částečný nekompetitivní antagonist, zatímco pregnenolon sulfát a pregnanolon kompetitivně inhibují aktivaci

glycinových receptorů. Estradiol inhibuje receptor na odděleném místě od pregnanolonu na mikromolární úrovni. Oba steroidy aditivně redukuje glycinově evokovaný tok iontů (King, 2013).

2.2.3 *Glutamátové receptory*

Některé neurosteroidy mohou modulovat glutamátové receptory typu NMDA (N-methyl-D-asparat). NMDA receptory obsahují alespoň dvě odlišná místa pro modulaci neurosteroidů. Jedno z nich zprostředkovává efekt pozitivních modulátorů, zatímco druhé negativních. Efekt sulfátových neurosteroidů jako pregnanolon sulfátu (PS) a DHEA-S byl popsán jako silný allosterický antagonistický na receptorový komplex NMDA. Všeobecně je pro dosažení aktivity NMDA receptor-zprostředkovaného toku nezbytná mikromolární koncentrace PS a DHEA-S. PS je schopen zesilovat NMDA zprostředkovanou odpověď, podle hodnocení neurofyziologického záznamu nebo měření NMDA způsobeným zvýšení intracelulárního Ca²⁺ v kultivovaných neuronech (Reddy, 2010).

Receptory ze skupiny σ byly původně identifikovány na základě funkce, ne homologie, jako podtyp opioidního receptoru s antidepresivním účinkem. Tyto intracelulární receptory převádějí signál přes fyzikální interakci s ostatními proteiny, jako například iontovými kanály (King, 2013).

Farmakologické studie ukazují, že neurosteroidy jako pregnenolon, DHEA-S a PS spolupracují s opioidními σ receptory. Jedná se o určitou skupinu receptorů obsaženou ve vysoké hustotě v mozku (Reddy, 2010). Jedním z nejlépe popsáných subtypů je receptor σ_1 . Steroidy využívají σ_1 k modulaci NMDA receptorů. DHEA (dehydroepiandrosteron) působením na σ_1 receptory zvyšuje NMDA navozenou excitaci potkaních CA3 (oblast hippocampu) pyramidových neuronů. V hipokampálních oddílech, 30 nanomol/l DHEA-S také potencuje uvolnění norepinefrinu stimulovaného NMDA (King, 2013).

2.3 Endogenní steroidy

Tato skupina je charakteristická tím, že se jedná o steroidy přirozeně vznikající a působící v lidském těle. Endogenní steroidy se dělí dále na hormonální steroidy (vznik v endokrinních žlázách) a neurosteroidy (vznik v nervové tkáni) (Knytl a Mohr, 2016; Zheng, 2009).

Hormonální steroidy jsou látky vznikající v periferních endokrinních žlázách a do nervového systému a zejména mozku se dostávají krví přes hematoencefalickou bariéru díky své lipofilní povaze. Zástupci této skupiny jsou zejména estradiol, progesteron, testosteron, glukokortikoidy a DEHA (dehydroepiandrosteron) (Zheng, 2009). Běžná aktivita těchto steroidů je zprostředkována jejich vazbou na intracelulární receptory, které po translokaci komplexu steroidní hormon-receptor do jádra ovlivňují genovou transkripci. Což má za následek charakteristický rys dlouhodobého působení (hodiny až dny), který je potřebný k vyvolání účinku (Dorda et al., 2001).

Neurosteroidy syntetizované přímo v nervové soustavě představuje například pregnenolon, allopregnanolon a pregnenolon sulfát (Zheng, 2009). Jejich působení v centrálním nervovém systému (CNS) dané vazbou na membránové receptory je na rozdíl od hormonálních steroidů velice rychlé, obecně okolo milisekund až sekund (Dorda et al., 2001).

Cirkulující steroidní hormony slouží jako prekurzory pro syntézu neurosteroidů, které jsou lokálně produkovány v hippocampu a dalších strukturách mozku (Baulie et al., 1999; Reddy, 2010).

Vyskytují se buď volně, nebo ve vazbě. Koncentrace v mozku může být o mnoho vyšší než v krevním řečišti, kdy hladina pregnenolonu je 5x, dihydrotestosteronu (DHT) 10x a allopregnanolonu 50x vyšší než v plazmě a hladina DEHA-S odhadována na skoro 20x vyšší. Množství neurosteroidů se také liší přítomností v určitých oblastech. Například hladiny allopregnanolonu jsou o 75 % vyšší v očním bulbu než v hippocampu potkanů po adrenalectomii a gonadektomii. Jejich syntéza je evolučně zachována u všech obratlovců v nervovém systému. Neurosteroidy jsou tedy schopny regulovat funkce CNS přes buněčnou specifitu nedosažitelnou periferními steroidy (King, 2013).

2.3.1 *Allopregnanolon*

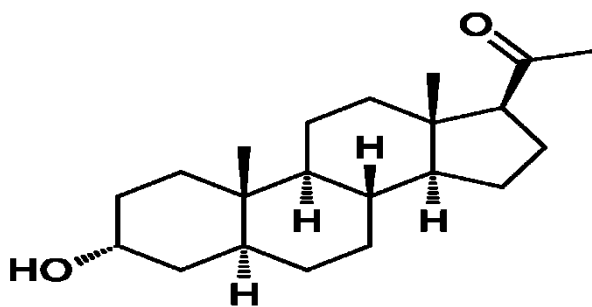
Allopregnanolon patří mezi typické zástupce neurosteroidů. Jedná se o jeden z nejdůležitějších neurosteroidů vyskytujících se v mozku, jenž se podílí na modulaci osy neuroendokrinní, dále modulaci stresu a kognitivních funkcí. Je metabolitem progesteronu, jeho hlavním zdrojem jsou gonády a kůra nadledvin, menší míře je tvořen přímo v CNS. Působí na pozitivní modulaci GABA-A receptorů a účinky jsou tedy zejména anxiolytické, sedativní a anestetické. Dále je také významná jeho

antikonvulzivní složka, která byla prokázána studii u mnoha animálních modelů (Mareš et al. 2006; Zheng, 2009; Dhir a Chopra, 2015; Stárka a Dušková, 2015).

Allopregnanolon ($3\alpha,5\alpha$ -tetrahydroprogesteron) je endogenní metabolit syntetizovaný z progesteronu enzymem 5α reduktázou a 3α -hydroxysteroid dehydrogenázou (3α HSD). Pozitivně allostericky moduluje receptor gama-aminomáselné kyseliny typu A (GABA-A receptor), čímž dochází k zvýšené propustnosti Cl^- iontů do buněk indukovaných gama-aminomáselnou kyselinou. Allopregnanolon v nízkých (nanomolárních) koncentracích potencuje efekt gama-aminomáselné kyseliny (GABA) na GABA-A receptorech, přičemž na vyšších koncentracích přímo aktivuje tyto receptory (Hamond et al., 2017; Dhir a Chopra, 2015; Reddy, 2010; Bičíková a Hampl, 2007).

Důležitou funkcí je vazba na určité místo na α podjednotce a také na rozhraní α/β podjednotky GABA-A receptoru. Jelikož nevyžaduje pro vazbu γ podjednotku, byl tento neurosteroid in vitro prokázán jako modulátor mnoha typů GABA receptorů. Významný je také jeho vliv jak na synaptické tak i extrasynaptické GABA-A receptory a potence obou fázických a tonických GABA toků (Hammond et al., 2017).

Experimenty na zvířatech prokázaly, že plazmatické koncentrace například allopregnanolonu se při akutním stresu zvyšují, zatímco snížená hladina steroidu se objevuje při dlouhodobém stresu. Na výsledném efektu stavu jedince se podílí rovnováha mezi „antikonvulzivními“ (např. allopregnanolon) a „prokonvulzivními“ steroidy (např. pregnenolon sulfát) (Bičíková a Hampl, 2007).



Obrázek 2: Struktura allopregnanolonu (Dorda, 2001)

2.4 Exogenní steroidy

Jedná se o látky, které mají podobné účinky jako neurosteroidy, ale nevznikají přímo v lidském těle. Jde o syntetické analogy přirozených neurosteroidů, které mají výhodnější účinky, zejména díky delšímu poločasu rozpadu. V literatuře je najdeme pod názvem neuroaktivní steroidy (Dorda et al., 2001).

2.4.1 *Pregnanolon glutamát*

3 α 5 β -pregnanolon glutamát (PG) je zástupce syntetického analogu přirozeně se vyskytujícího 3 α 5 β -pregnanolon sulfátu (PS). PS inhibuje aktivitu NMDA receptorů v závislosti na způsobu použití, a tak by mohl být spolu s dalšími sulfátovými neurosteroidy a jejich analogy slibnou látkou v terapii onemocnění CNS. Nicméně enzymy nepřetržitě udržují poměr mezi 3-hydroxy- neurosteroidy a jejich sulfátovými estery v mozku. Mimoto PS nedostatečně prochází hematoencefalickou bariérou z důvodů ionizace molekuly na fyziologickém pH (Rambousek et al., 2011; Kletečková et al., 2014).

Proto se začalo s výzkumem a testováním nových antagonistů NMDA receptorů, jako je právě PG, který by měl být navíc odolný vůči sulfohydrolázové aktivitě. Aktivita tohoto enzymu totiž hydrolyzuje sulfátovou skupinu na třetím uhlíkatém místě (Rambousek et al., 2011).

Přednostně inhibuje tonicky aktivované NMDA receptory, které jsou začleněny do excitotoxické aktivity glutamátu. Výsledky ukazují, že aktivita derivátu pregnanolonu je nezávislá na buněčném membránovém potenciálu oproti blokátorům iontových kanálů NMDA receptorů, jako MK-801. Vazba PG na jeho inhibiční místo je podmíněno aktivací NMDA receptorů. Podání PG nemá žádné výrazné behaviorální vedlejší účinky a může snadno přecházet z krve do mozku. S minimem vedlejších účinků a více benefity by mohl být slibným preparátem pro budoucí terapeutické využití (Kletečková et al., 2014).

2.5 Další účinky látek steroidní povahy na organismus

Jak již bylo popsáno výše, zmiňované steroidní látky mají nejen anxiolytický efekt, ale využívají se i pro své další účinky, jako například sedativní, antidepressivní i antipsychotický účinek (Knytl a Mohr, 2016). Tudiž se využívají ve velké škále léčebných oborů.

Pro příklad byl vybrán efekt pro ovlivnění nálad a paměti.

2.5.1 *Ovlivnění nálad*

Deprese a úzkost často postihuje ženy ve spojitosti s reprodukčními změnami jako například období menarche, premenstruální fáze, post-partum a fáze perimenopauzy. Významným příkladem interakce mezi náladou, látkami steroidní povahy a GABA systémem je premenstruační dysforická porucha (PMDD). Závažné

negativní premenstruační poruchy nálad se objevují u 3-8 % žen (Ritsner a Weizman, 2008).

Pohlavní a stresové hormony jsou metabolizovány na neurosteroidy s pozitivním vlivem na mozkové funkce jako pozitivní modulátory GABA-A receptorů. Příkladem neurosteroidu vznikajícího z progesteronu je allopregnanolon a jiné GABA-steroidy, které jsou produkovány v mozkové tkáni vlivem nadledvin při stresu a z vaječníků během menstruačního cyklu. Animální a lidské studie ukazují, že benzodiazepiny, barbituráty, alkohol a allopregnanolon mají dvojitý efekt na chování (Ritsner a Weizman, 2008).

Ve vysokých dávkách nebo koncentracích pozitivní modulátory GABA-A receptorů působí na CNS sedativně, anesteticky a anxiolyticky. Kdežto v určitých individuálně nízkých koncentracích způsobují vážné úzkosti, podrážděnost, agresivitu a depresivní nálady u 3-6 % jedinců. Nízké koncentrace GABA-steroidů nacházíme endogenně během luteální fáze a vyvolávají nepříznivé emoční reakce. U žen s PMDD a PMS tento paradoxní efekt neurosteroidů nejspíš vyvolává negativní symptomy nálady jako napětí, podrážděnost a deprese. Mechanismus tohoto negativního efektu se nazývá disinhibice, která dohromady působí s vývojem tolerance vlivem aktivních látek na GABA_A receptorech. Efektivní léčba zahrnuje inhibici produkce ovariálního steroidu nebo změnu reakce CNS na látky steroidní povahy (Ritsner a Weizman, 2008).

2.5.2 Ovlivnění paměti

Akutní léčba pregnenolon sulfátem, jehož funkce jako allosterického modulátoru NMDA receptorů je známá, byla spojena se zlepšením učení a paměťových funkcí. Bez ohledu na to, zda jsou efekty rozšíření kognice zapříčiněny pregnenolon sulfátem nebo pregnenolonem. Nicméně efekty zlepšení kognice pregnenolon sulfátem jsou u zdravých jedinců nepravděpodobné, protože jeho akutní podání a dalších GABA-ergních modulačních neurosteroidů zdravému jedinci snižují funkce paměti a učení podobným způsobem jako u aplikace benzodiazepinů. Naopak allopregnanolon by mohl mít vliv na funkci pregnenolonu, kterou pozorujeme u pacientů se schizofrenií a dalšími neuropsychiatrickými a neurologickými poruchami, při kterých dochází k dysregulaci aktivity neurální sítě (Ratner et al., 2019).

3 POSTNATÁLNÍ MOTORICKÝ VÝVOJ LABORATORNÍHO POTKANA

3.1 Obecné informace

Potkani jsou anatomicky, farmakologicky a elektrofyzilogicky nejprozkoumanější a nejznámější zvířata v porovnání s ostatními savci. Je odhadováno, že 90-95 % zvířat využívaných v biomedicinském výzkumu tvoří myši a potkani, tudíž jejich role v podpoře zdraví jak lidí, tak zvířat je zásadní. Jejich význam pro vědu je založen na skutečnosti, že svojí fyziologií a genetikou jsou velmi blízcí člověku. Podle National Institute of Health jsou potkani jedni z nejvýznamnějších animálních modelů pro studium fyziologických procesů a získané poznatky je možno implementovat prakticky na všechny orgánové systémy v těle člověka. To nám poskytuje velké množství fyziologických dat (Clarac et al., 1998; Suckow, Weisbroth, Franklin, 2005)

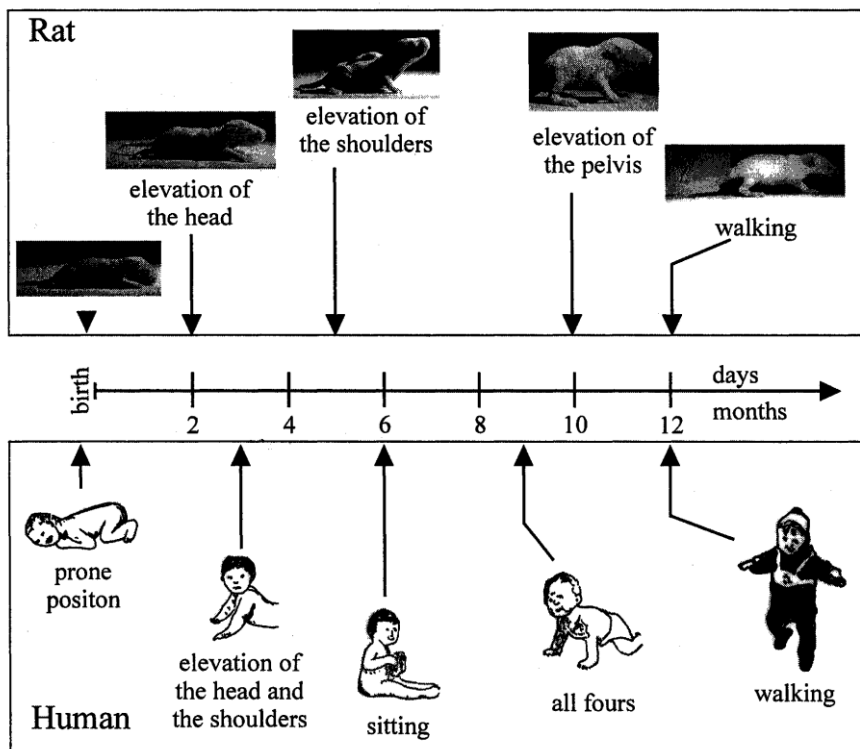
Dále bylo zjištěno, že některé druhy potkanů jsou vhodnější pro zkoumání patofyziologie určitých lidských nemocí, než ostatní laboratorní zvířata. Díky krátkému životnímu období, kdy průměrně 35. postnatální den (P35) začíná puberta, která končí v 50. postnatálním dni, mohou hodnotně přispívat také k vývojovým studiím. Potkani jsou dále významní pro studium například závislostí, rakoviny, míšních poškození, kardiovaskulárních chorob, Alzheimerovy choroby, spontánního diabetu, artróz a samozřejmě také pro výzkum epilepsie. Sekvence potkaního genomu je odhadovaná na 3 miliardy bází, což je co do počtu podobné jako u člověka. Tato skutečnost zvýšila přínos potkanů při studiu chorob s genetickým podkladem a také k využití srovnávacích přístupů k lepšímu porozumění mechanismu lidského genomu (Suckow, Weisbroth, Franklin, 2005; Clarac et al., 1998).

3.2 Porovnání vývoje člověka a potkana

Některí obratlovci jsou již brzy po narození schopni chůze a běhu, zatímco ostatní se rodí nezralí. Lidé i potkani patří do skupiny, ve které se potomci rodí s nezralým CNS. Postupně vlivem druhově specifických geneticky determinovaných vzorců dochází k rozvoji motorických, sensorických a senzitivních funkcí a reflexů (Vinay et al., 2002; Vojta a Peters, 1995).

Na první pohled se může zdát, že vývoj člověka a potkana je naprosto odlišný. To je zejména způsobeno velkým rozdílem v délce prenatálního období, které u lidí trvá 9 měsíců (270 dní) a dospělost je dosažena okolo 20. roku života, zatímco potkaní embryonální vývoj trvá 3 týdny (embryonální fáze E0-E21) a dospělosti dosahují okolo 60. dne po narození (Vinay et al., 2005; Clarac et al., 1998; Altman a Sudarshan, 1975).

Navzdory těmto skutečnostem nacházíme nápadné podobnosti mezi lidským a potkaním motorickým vývojem na časové ose, když vezmeme v úvahu, že jeden potkaní den koresponduje ve vývoji přibližně s jedním lidským měsícem. Z motorického hlediska jsou oba druhy při narození velmi nezralí. Dále také jejich společným znakem je kranio-kaudální vývoj (Vinay et al., 2005).



Obrázek 3: Vztah mezi vývojem člověka a potkana (Vinay et al., 2005)

3.3 Vývoj lokomoce laboratorního potkana

Vývoj motorického chování obecně je výsledkem kombinace komplexu genetických a environmentálních faktorů. Ontogeneze jako taková obsahuje určitá předem daná časová období, během kterých CNS postupně zraje. Modifikace vývoje je nejčastěji pozorována na úrovni anatomické (růst axonů a dendritů, formování synapsí, apoptóza), neurochemické (receptory, iontové kanály) a metabolické (vliv hormonů, chemické složení cerebrospinálního moku). Tyto modifikace korespondují s některými

přechodnými fázemi a ty jsou důležité pro dosažení lepšího pochopení vývoje CNS (Clarac et al., 1998).

Potkani se rodí ve velmi nezralém stavu, v hnízdě je jejich hlavní aktivitou spánek, nebo vyhledání matky pro krmení mateřským mlékem. Novorozený potkan má extendované končetiny mírně vzdálené od hlavní osy těla, hlava leží volně na podložce. Nicméně můžeme zaznamenat určité laterální pohyby, a když je potkan položen na zádech je schopen se otočit zpět na břicho. Druhý postnatální den (P2) je mládě potkana schopno provádět lehké pivotování a zvedání hlavy od podložky v pronační poloze, což přibližně koresponduje se třetím měsícem věku dítěte. Během prvního týdne života jsou schopni pohybovat zejména horní částí těla – objevuje se zde elevace ramen (P5), což je spojeno se zráním funkce předních končetin, které se postupně dostávají pod tělo, aby podpořily vzpřímení přední části těla. Poté se potkani mládě začíná lehce plazit pouze pomocí předních končetin. Zadní končetiny nejsou v období prvního týdne života potkanů schopny ještě vzpřímit pánev nad podložku (Clarac et al., 1998; Gramsbergen, 1998; Vinay et al., 2005).

Důležitou a bedlivě sledovanou složkou vývoje je lokomoce. Ta může být rozdělena na dvě složky. Fázická komponenta lokomoce je zodpovědná za rytmicky se střídající kontrakci svalů končetin a trupu. K tomu dochází zejména impulzy vycházející z centrálních generátorů vzorů (central pattern generators – CPGs) v páteřní míše (Vinay et al., 2005).

Tonická složka pohybu v prostoru je spojena s tonusem posturálních svalů. To je podmínkou pro lokomoci ventrální část těla nad povrchem podložky (lezení x chůze). Několik pozorování popisuje funkčnost dynamické složky (CPGs) již při narození. Oproti tomu tonická složka je při narození nevyvinutá. Signifikantní vývoj posturální kontroly probíhá zejména během prvního postnatálního týdne. Toto vyzávání je závislé na maturaci mnoha dalších systémů, jako například muskulo-skeletálního, senzomotorických drah, vyšších mozkových center, descendentních míšních drah a ascendentních traktů převádějících sensorické informace a eferentní kopie signálů do supraspinálních jader (Vinay et al., 2005).

Druhý týden života se objevuje první vzpřímení v pánevní oblasti a od P10 se poprvé přidává funkce prstů a distálních částí končetin. Zároveň jsou mláďata schopna zaujmout vzpřímenou quadrupedální polohu, kdy je břicho neseno nad podložkou. V této periodě dochází k akceleraci dozrávání funkce zadních končetin. Mezi P12-13 se objevuje první chůze. Podobně děti začínají s chůzí okolo konce prvního roku života. Ze

začátku chodí pomalu a zejména nápadná v druhém týdnu života je přítomnost zevní rotace zadních končetin během krokového cyklu. Přetrvává nedostatečná kontrola trupu při lokomoci. Trup se postupně aktivně podílí na lokomoci rytmickým zakříváním páteře. Od P14 začíná pohyb ve vertikální rovině, a také sezení na zadních končetinách, kdy jsou přední končetiny využity pro manipulaci. Po P15 jsou všechny komplexní reakce plynulé a účinné, zároveň se významně zvyšuje jejich rychlost a zadní končetiny zůstávají v addukci během stojné fáze kroku (Clarac et al., 1998; Gramsbergen, 1998; Vinay et al., 2005).

Pohyby hlavy před P15 jsou prováděny pouze ve statických polohách, ale po dosažení tohoto věku mohou prozkoumávat prostředí i pohyby hlavy během chůze. Tato proměna v motorickém chování je spojená se změnami EMG vzorů extenzorů zadních končetin – musculus (m.) gastrocnemius, m. soleus a jejich antagonisty m. tibialis anterior. Do P14 se zapojování těchto svalů značně liší vzhledem ke krokovému cyklu. Ovšem od P16 se vyvíjí zvyšování přesnosti reciproční aktivace extenzorů a flexorů v souvislosti s krokovým cyklem. Pro testování ontogeneze lokomoce se zkoumá několik komplexních motorických vzorů – jako například chůze po otáčivé tyči, chození nahoru a dolů po žebříku a šplhání po laně (Gramsbergen, 1998).

Postura se vyvíjí a přizpůsobuje nejvíce v prvních dvou týdnech života, po její úplné maturaci je možno využít i dynamickou stránku pohybu a to koresponduje s úplným dozráváním sensorických receptorů. Což například poukazuje na fakt, že lokomoce začíná být efektivní, až když zvířata otevrou oči (Gramsbergen, 1998).

Harmonogram vývoje motorických funkcí novorozeneckých potkanů nás odkazuje na soubor studií, které zaznamenávaly spontánní aktivitu mláďat umístěných v neutrálním prostředí (openfield, koridor) po několik minut. Na základě pořízených dat došlo k potvrzení progresivního vývoje motorické kapacity s anterio-posteriorním a proximo-distálním gradientem (Jamon, 2006).

Autoři rozlišují tři fáze motorické ontogeneze. Jako první brzké postnatální období do P4-5, kdy se vyskytovalo pouze zvedání hlavy a sací pohyby. Od P6 do P12-13 pozoroval schopnost zvednout ventrální část těla od podložky během provedení pár kroků. Třetí periodu od P16 definoval jako období komplexních motorických vzorů jako je lokomoce, stavění na zadní a péče o srst, což charakterizuje dospělost a plynulost těchto vzorů (Jamon, 2006).

3.4 Vývoj senzoričských funkcí laboratorního potkana

Anatomické a fyziologické studie prováděné na míšních animálních modelech přinesly poznatky o závislosti vývoje senzoričského i motorického systému. Studovány byly zejména dráhy monosynaptického napíacího reflexu (Clarac et al., 1998).

V důsledku adaptace na suchozemské prostředí se musí quadrupedi a bidepálové vypořádat při lokomoci s problémem gravitace. Dva hlavní senzoričské systémy jsou v přímé závislosti na gravitačních silách – vestibulární a somatosenzoričský. Tyto systémy jsou během ontogeneze nezralé, což často vede k neefektivní nebo neúplné koordinaci těla při pohybu. Jak již bylo popsáno výše, mláďata potkanů se rodí slepá a hluchá. I ostatní senzoričské systémy jsou nezralé i přes to, že je mají navádět k nalezení matky (Clarac et al., 1998; Jacobson, 1991).

Informace z vestibulárního aparátu jsou schopny regulovat posturu na úrovni vestibulárních jader, dále jsou integrovány se zrakovými a proprioreceptivními vjemy k vytvoření trojrozměrné reprezentace pohybu hlavy a trupu v prostoru stejně jako u člověka (Clarac et al., 1998; Jacobson, 1991). Vývoj vestibulárního systému dále zahrnuje senzoričské receptory, vestibulární jádra a jejich aferentní a eferentní dráhy (Clarac et al., 1998).

Invaginace otické membrány nastává osmý embryonální den (E8), otocysty se formují od E9 a endolymfatický ductus je viditelný od E10. Diferenciace neuroepithelia začíná od E12-13 a jednotlivé cristae ampullares a maculae utriculi a sacculi mohou být rozpoznány od E14. Terminální dělení vláskových buněk se vyskytuje od E14 do P2 s maximem v E17. První aferentní a eferentní nervová zakončení jsou identifikována v tomto pořadí od E17 a E18. Morfologická diferenciace na typ I a II vláskových buněk začíná od E19. Rozlišení neuronů vestibulárních jader mezi E11 a E15 následuje latero-mediální a kranio-kaudální gradient vývoje. Vývoj těchto jader je nejspíš spojen s jejich relativně důležitou rolí v průběhu prvních dnů života. Laterální jádro, které se účastní posturální stabilizace při narození, dozrává dříve než nuclei medialis et superior. Ty se naopak zapojují při stabilizaci pohledu, kdy se tato funkce objevuje o dva týdny později (Clarac et al., 1998).

Funkčně je vestibulární stimulace efektivní od P1. I přes to že jsou oba typy vláskových buněk zralé již na konci prvního postnatálního týdne, jejich konečná maturace s plně vyvinutou eferentní inervací vyžaduje další 2-3 týdny po narození. Během této fáze se objevují dvě hlavní vývojové změny – zvýšení počtu synaptických

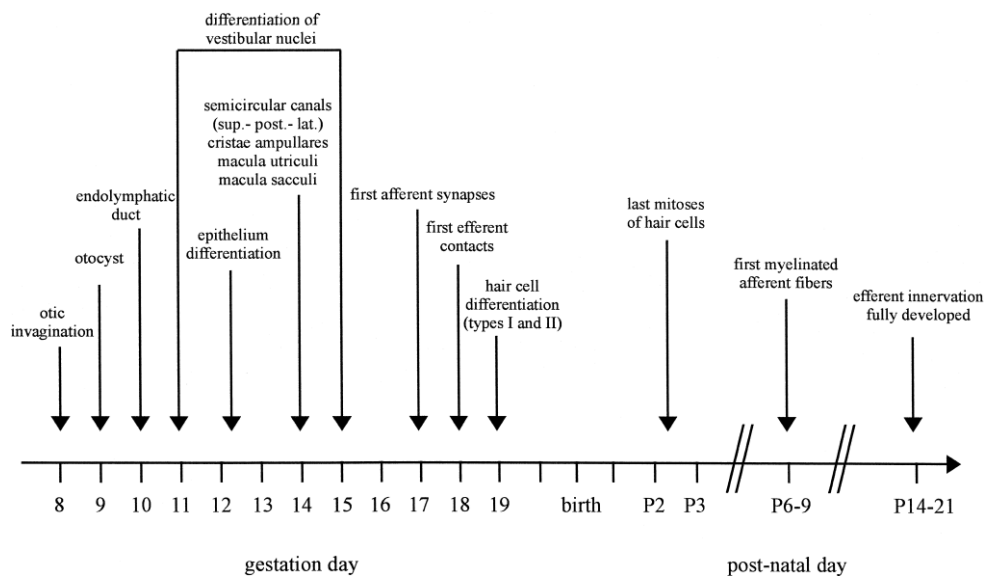
těl a synapsí mezi vláskovými buňkami a aferentními nervy a dozrávání transdukčních mechanismů v souvislosti s vývojem napěťově řízených iontových kanálů (Clarac et al., 1998).

Funkce sluchového orgánu začíná být účinná od P13, do té doby jsou mláďata funkčně hluchá. Ve své studii z roku 1964 uvádí Bolles a Woods poznatky, že v tento den se poprvé objevuje u potkanů úleková reakce (nejčastěji projevena typickým poskokem do výšky několik milimetrů), která je běžně vyvolána zvukovým cvaknutím. Během P13 tento zvuk způsobí úlekovou reakci téměř u všech potkanů, zatímco během P12 nebyla zaznamenána žádná reakce. Od tohoto dne až do doby odstavení od kojení, zvukový klik vyvolá úlek bez ohledu na to, jestli zvířata spí nebo ne, s lehkými odchylkami patrnými v prahu nebo razanci reakce. To je rozdílné od reakce matek, které vykazují na podnět o vyšší intenzitě během spánku stejnou reakci, zároveň mohou zvukový podnět ignorovat, nebo se podle něj orientovat bez vzniku úlekové reakce v bdělém stavu. Od P19 je někdy možné vyvolat orientaci u mladých potkanů i pomocí zvuků vytvořených mimo klec. Po skončení kojení, tedy od P21, se začíná zvyšovat jejich citlivost na zvuky mimo klec a vytváří se širší škála reakcí na hluk. Například se uvádí ztuhnutí, přiblížení se ke zdroji zvuku a šplhání po stěně klece spojené s větřením (Bolles a Woods, 1964).

Další senzorycký systém důležitý již při narození je čich. V prvních dnech života, kdy zrak není ještě plně vyvinut pro orientaci, využívají potkani pro orientaci zejména čichových podnětů, jak bylo názorně demonstrováno Leonem (1987,1992), který zkoumal tyto reakce od P2 a dále. Při narození se receptorové buňky (granulární a mitrální buňky) a jejich axony nacházejí v čichovém bulbu. Aferentní olfaktorický systém i přes to, že není plně zralý, se zdá být nejvíce funkční již při narození – receptorové synapse mohou být aktivní a schopny poslat informace do čichového kortexu. Hlavním rozdílem mezi novorozenci a dospělými potkany je nedostatek granulárních buněk tvořících synapse s mitrálními buňkami. Bez granulárních buněk, které zprostředkovávají mitrální inhibici, by mláďata nebyla schopna přesného rozlišení pachu, jež vyžaduje laterální inhibici. Absence v rozlišení mezi různými mateřskými podestýlkami by mohla být způsobena nezralostí organismu (Fady, nepublikované výsledky) (Clarac et al., 1998).

Oči se začínají u některých potkanů otevírat od P14 a až do P18 nejsou úplně rozevřené. U mláďat kmene Wistar ve Fyziologickém ústavu AV ČR se víčka rozlepují 13-14.den. Tomu předchází orientační reakce, jakoby se zvíře dívalo na věci. Tato

reakce zahrnuje natahování krku a někdy větření, což se stává běžné po otevření očí. Jakkoli se může zdát nepravděpodobné, že tato reakce závisí na vizuální stimulaci, vyskytuje se, i když jsou oční štěrbinu těsně zavřeny (objevuje se i u potkanů rozlišujících jenom světlo a tmu). Nešťastným faktem je, že se zdá, že mimo diskriminační test se nedá zjistit, na co nebo jestli vůbec se na něco dívají (Bolles a Woods, 1964).



Obrázek 4: Ontogeneze ucha a sluchového orgánu od prenatálního období (Vinay et al. 2005)

4 CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem diplomové práce bylo zjištění vlivu nového neuroaktivního steroidu pregnanolonpyroglutamátu na motoriku mláďat laboratorního potkana pomocí vybraných motorických testů v závislosti na věku zvířat. Testovány byly jak krátkodobé, tak i dlouhodobé vlivy. U dlouhodobých účinků bylo tendencí navíc zjistit možný vliv testované látky na anxieta a krátkodobou a dlouhodobou paměť. Porovnány byly mezi sebou jak jednotlivé věkové, tak i dávkové skupiny.

Hypotéza 1

H₀: motorika se v jednotlivých věkových skupinách signifikantně nemění.

H_A: motorika se v jednotlivých věkových skupinách signifikantně mění.

Hypotéza 2

H₀: motorika potkanů se po podání testované látky oproti kontrolní skupině signifikantně nemění.

H_A: motorika potkanů se po podání testované látky oproti kontrolní skupině signifikantně mění alespoň v jednom motorickém testu.

Hypotéza 3

H₀: opakované podání v časném vývojovém období neovlivní další vývoj motoriky potkanů.

H_A: opakované podání v časném vývojovém období ovlivní další vývoj motoriky potkanů.

Hypotéza 4

H₀: testovaná látka signifikantně neovlivňuje krátkodobou ani dlouhodobou paměť.

H_A: testovaná látka signifikantně ovlivňuje krátkodobou i dlouhodobou paměť.

5 METODIKA

5.1 Experimentální část práce

Testování bylo prováděno za podpory grantu školitele GAČR číslo 18-09296S. Dále bylo uznáno odbornou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (FGU AV ČR), že testování je prováděno v souladu se zákonem ČR o ochraně zvířat proti týrání, podle standardů humánní péče a využívání laboratorních zvířat.

5.2 Výběr zvířat

Pro testování byli vybráni samci bílého laboratorního potkana kmene Wistar. Jejich chov probíhal v prostředí s pravidelným světelným 12 hodinovým režimem, a to od 6:00 do 18:00 hodin, se stálou teplotou $22\pm 1^\circ\text{C}$ a vlhkostí $55\pm 5\%$. Zvířata byla 5. den po narození rozdělena po 10 samečích s 1 matkou. Potkani měli nepřetržitý přístup k potravě a vodě s výjimkou průběhu testu.

5.3 Průběh testování

Výzkum probíhal v místnosti bez přístupu denního světla s využitím umělého osvětlení, odvětráním a klimatizací udržující teplotu na 23°C . Motorické testy jsem prováděla, sledovala a vyhodnocovala vždy já ve stejném časovém rozmezí od 10. do 15. hodin.

5.3.1 Akutní účinky neuroaktivního steroidu

Testováno bylo celkem 116 samců laboratorního potkana ve třech věkových kategoriích pro hodnocení akutních účinků vybrané látky - 38 zvířat 12-denních, 39 zvířat 18-denních a 39 zvířat 25-denních. Další rozdělení bylo do čtyř skupin – skupina kontrolní s dávkou organického rozpouštědla cyklodextrinu (CDX) 10 ml/kg, skupiny s dávkou pregnanolonupyroglutamátu (PPG) 1 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg. Koncentrace neuroaktivního steroidu byla rozpuštěna v poměru 1 mg PPG/1 ml CDX. Každý potkan byl v této fázi testování použit pouze jednou. Pokusy byly prováděny v období od 15.3.2019 do 4.6.2019. Každý potkan byl před testováním zvážen a číselně označen. Pro zjištění akutního ovlivnění motoriky byly potkanům injekčně přes břišní stěnu aplikovány výše uvedené látky v 7 minutových intervalech. Dále se nechala

účinná látka 20 minut působit. Poté byla jednotlivě u každého potkana sledována spontánní motorika ve vyhrazeném prostoru (open field test) po dobu 5 minut a na tento test navazovaly vybrané speciální motorické testy. U 12 denních potkanů použit surface righting test, bar holding test, negative geotaxis test a wire mesh ascending test. U 18 a 25 denních potkanů jsme použili surface righting test, bar holding test, a test chůze po pravidelném a nepravidelném horizontálním žebříku.

5.3.2 Dlouhodobé účinky neuroaktivního steroidu

Testování bylo prováděno v období od 1.11.2019 do 19.12.2019. Každý potkan byl před testováním zvážen a označen. Využity byly dva vrhy zvířat. Ve vrhu A bylo 11 zvířat a ve vrhu B 10 zvířat. Od P7 do P11 jim byl pravidelně aplikován vybraný neuroaktivní steroid PPG a nebo CDX. Celkově jich bylo tedy 21 a byli rozděleni do 3 dávkových skupin. Tedy 8 potkanům bylo aplikováno PPG v dávce 5 mg/kg, 8 bylo aplikováno PPG v dávce 10 mg/kg a 5 potkanům bylo aplikováno CDX a byli bráni jako kontrolní skupina.

Od 12. dne se poté testovala v předem daných dnech motorika a také byl využit test na zjištění míry anxiety a ovlivnění krátkodobé a dlouhodobé paměti. Celkem bylo provedeno 9 měření ve věku 12, 15, 18, 21, 25, 29, 31, 52 a 60 dní. Nejdříve byli potkani vždy sledováni 5 minut v openfieldu pro zjištění spontánní motoriky. Data z openfielu byla zaznamenána a zpracována pomocí programu EthoVision XT. Poté byly provedeny 4 vybrané motorické testy podle věku - surface righting test, bar holding test, negative geotaxis test a wire mesh ascending test u 12 a 15 denních. U 18, 21, 25, 31 a 60 denních byly využity surface righting test, bar holding test a test chůze po pravidelném a nepravidelném žebříku. Dále byl 29 a 52 denním zařazen test passive avoidance pro zjištění možného ovlivnění krátkodobé a dlouhodobé paměti. Ovlivnění anxiety bylo hodnoceno u 31 denních potkanů testem jumping down with choice.

5.4 Baterie motorických testů

K testování bylo využito 8 motorických testů podle Altmana a Sudarshana (1975) a Mikulecké a Mareše (2002) vypovídající o zrání CNS a dále také hodnocení spontánní motoriky ve vyhrazeném prostoru – open field test – pomocí kamery a vyhodnocení statistickým programem. Dále také byl u dlouhodobých účinků využity spíše kognitivní testy jumping down with choice a passive avoidance.

5.4.1 *Openfield test*

Data získaná z tohoto testování vypovídají o spontánní motorice a míře anxiety zvířat. Potkani byli jednotlivě umístěni do černého čtvercového objektu ohraničeného stěnami vysokými 30 cm proti útěku. Testované pole bylo rozděleno do dvou hlavních částí – střed a okolí stěn. Na začátku testování byli potkani vždy položeni do pravého dolního rohu. Poté bylo spuštěno nahrávání pomocí kamery (Panasonic Wv BP330), která byla umístěna 1 m nad středem sledovaného prostoru, která zaznamenávala spontánní motoriku zvířete po dobu 5 minut. Nashromážděná data z open fieldu byla ukládána a vyhodnocena pomocí programu EthoVision XT (© Noldus Information Technology). Měřenými parametry byla vzdálenost, kterou potkan ušel celkově a rychlost, kterou šel. Kognitivními parametry spontánní lokomoce byly latence prvního vstupu do středu open fieldu, frekvence vstupu do středu a čas strávený ve středu open fieldu.



Obrázek 5: Open field test (archiv autorky)

5.4.2 *Surface righting test*

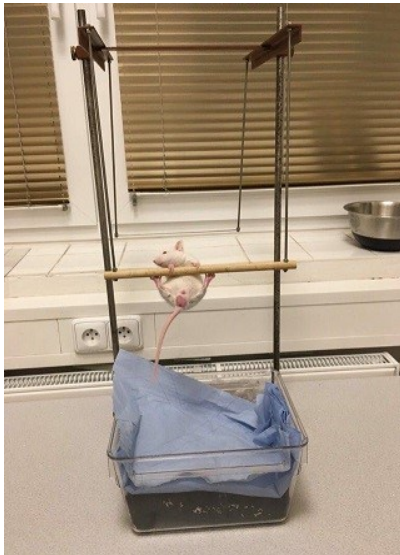
Potkan byl umístěn v supinační poloze na rovný povrch, kdy zadní část hlavy a trupu ležela na podložce. Zaznamenána byla doba potřebná pro otočení do polohy na břicho a v případě odchylek i subjektivní koordinovanost otočení. Úspěšné provedení testu bylo hodnoceno číslem 1, tedy k otočení došlo do 1 sekundy. Zvýšení času pro otočení ze zad na břicho značí patologii.

5.4.3 *Negative geotaxis test*

Potkan byl položen na nakloněnou plošinu se sklonem 30° s hrubým povrchem hlavou dolů. Měřena byla latence otočení hlavou směrem vzhůru, tedy o 180°. Maximální doba času pro splnění testu byla 90 sekund.

5.4.4 *Bar holding test*

Dřevěná hrazda o délce 25 cm a průměru 1 cm byla umístěna ve výšce 25 cm nad akváriem, které bylo vycpáno měkkým materiálem. Potkan byl umístěn za šíjí na hrazdu tak, aby se jeho přední packy mohly dotknout hrazdy. Testována byla síla uchopovacího reflexu předních a zadních končetin pro udržení na hrazdě. Limit testu byl 60 sekund. Dále bylo zaznamenáno, pokud se potkan dokázal přitáhnout a vylézt na hrazdu.



Obrázek 6: Bar holding test (archiv autorky)

5.4.5 *Wire mesh ascending test*

Tento test využívá 1 cm tlustou, 45 cm dlouhou a 15 cm širokou síť, která byla umístěna pod úhlem 70° s laboratorním stolem tak, že dolní hrana se dotýkala kraje laboratorního stolu a horní okraj byl v kontaktu s dřevěnou plošinou. Pro motivaci potkana k chůzi po síti vzhůru bylo umístěno vždy několik sourozenců do děrovaného akvárika na vrchol dřevěné plošiny. Každý potkan byl pro testování umístěn na spodní část sítě tak, aby se jeho všechny končetiny dotýkaly sítě. Zaznamenán byl čas, za který potkan vylezl po síti na plošinu. Časový limit byl 60 s. Pokud potkan slezl nebo spadl na

pracovní plochu, byla tato skutečnost zapsána a zaznamenána byla vzdálenost a čas, za který se potkan na určitou část sítě vyšplhal.

5.4.6 Test chůze po pravidelném a nepravidelném horizontálním žebříku

K tomuto testování byl použit horizontální žebřík vytvořený z konstrukce dvou plexiskel, která jsou spojena kovovými příčkami. Délka žebříku byla 1 m s umístěním 30cm nad pracovní plochou. U pravidelného žebříku byl rozestup příček 1 cm, u nepravidelného byla vzdálenost příček od 1 do 5 cm beze změny schématu. (Metz et al, 2009)

Oba konce žebříků byly umístěny na dvě průhledná akvária z plexiskla. Testování bylo zahájeno umístěním mláďete na začátek jednoho konce horizontálního žebříku. Na druhé straně v akváriu byli umístěni vždy sourozenci pro zesílení motivace k pohybu. Nejdříve se vždy testovala chůze po pravidelném a poté až po nepravidelném žebříku. Hodnocen byl čas, za který mláďe přejde žebřík a spustí se do akvária za sourozenci a také počet chyb, které mláďe během chůze udělalo. Chyba byla zaznamenána při kroku mimo příčku nebo sklouznutí. Limit pro překonání žebříku byl stanoven na 60 sekund. Pokud potkan za tuto dobu nezdolal celou vzdálenost nebo se nespustil za sourozenci do akvária, jednalo se o patologii a byla zaznamenána pouze vzdálenost a počet chyb, které za 60 sekund ušel a provedl.



Obrázek 7: Test chůze po horizontálním žebříku (archiv autorky)

5.4.7 Passive avoidance test

K tomuto testu se využívá dvoukomorový aparát, kde jedna komora je tmavá a zvíře ji preferuje a druhá bílá se silným osvětlením, kam je na začátku testu potkan umístěn. Nádoby jsou odděleny posuvnými dveřmi, které se otevrou po uplynutí 60

sekund od vložení zvířete do světlé komory pomocí dálkového ovladače. Dno konstrukce je sklopné a představuje tedy detekční mechanismus vyhodnocení pohybu zvířete v obou komorách. Pokud potkan vlezte otevřenými dveřmi do tmavé části konstrukce, dveře se za ním zavřou a dojde k averznímu podnětu představovaným mírnými elektrickými šoky do tlapek (nebolestivé, ale nepříjemné). Doba latence přemístění do tmavé komory je monitorována automaticky zařízením.

Tento test se využívá k hodnocení funkce krátkodobé a dlouhodobé paměti založené na souvislostech vytvořených mezi konkrétním environmentálním kontextem, kterému se potkan snaží vyhýbat, a nelibým zážitkem (mírný šok do tlapek). Intenzita šoku byla 1,5 mA a doba trvání 5 sekund. První test je o naučení averzní zkušenosti. Další test se provádí hodinu po prvním testu, což ukazuje na stav krátkodobé paměti. Poslední test se provádí 24 hodin po prvním testu, jenž vypovídá o ovlivnění dlouhodobé paměti. Při hodnocení se doba latence vstupu do tmavé komory s narůstajícím počtem testů zvyšuje. Maximum doby pro vstup do tmavé části bylo stanoveno na 120 sekund.



Obrázek 8: Passive avoidance test (archiv autorky)

5.4.8 Jumping down with choice test

Tento test hodnotí míru anxiety potkanů. Zvíře bylo během testu umístěno na plošinu ve výšce 40 centimetrů nad laboratorním stolem. Z každé strany bylo přiloženo jedno průhledné akvárium. Jedno bylo ponecháno prázdné a ve druhém byli na podestýlce sourozenci. Pokud mláďe potlačí strach z výšky a převládne pozitivní motivace (snaha dostat se k sourozencům) mělo by zvíře skočit co nejdříve do akvária se sourozenci. Test je ohraničen maximálním časem 120 sekund. Pokud potkan za

stanovený čas neskočí, nebo skočí do prázdného akvária, je tato skutečnost hodnocena jako patologie.



Obrázek 9: Jumping down with choice test (archiv autorky)

6 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Výsledky získané v open fieldu měřil automaticky program EthoVision XT, ostatní výsledky byly měřeny ručně stopkami.

Použili jsme pro zpracování program SigmaStat® (SYSTAT). Po spočítání průměrů a měř rozptylu (směrodatná odchylka a střední chyba průměru) pro jednotlivé věkové a dávkové skupiny jsme výsledky skupin (kontrolní zvířata s rozpouštědlem cyklodextrinem, zvířata s dávkami 1, 5 a 10 mg/kg, respektive 5 a 10 mg/kg) srovnávali parametrickou analýzou rozptylu ANOVA nebo pokud rozložení dat neodpovídalo normálnímu rozložení neparametrickou metodou ANOVA on Ranks vždy s následným párovým srovnáváním Holm-Sidakovým testem. Jako hladinu statistické významnosti jsme používali 5%.

V grafech připravovaných programem SigmaPlot® (SYSTAT) jsou uvedeny průměry se střední chybou průměru.

7 VÝSLEDKY

V této kapitole budou popsány výsledky provedených měření doplněné o grafy ze statistického zpracování softwarem SigmaStat a SigmaPlot® (SPSS).

Vzhledem k tomu, že stále ještě probíhá patentové řízení této použité látky, nemohli jsme bohužel tabulky se všemi naměřenými hodnotami z provedených testů zveřejnit v přílohách této práce, ale jsou dostupné k nahlédnutí u prof. Mareše.

7.1 Krátkodobé účinky

Jak již bylo uvedeno v metodické části práce, v této fázi experimentu bylo testováno celkem 116 samců laboratorního potkana ve třech věkových kategoriích - 12, 18 a 25 denní. Dále byli rozdělení do čtyř skupin – skupina kontrolní s dávkou organického rozpouštědla cyklodextrinu (CDX) 10 ml/kg, skupiny s dávkou pregnanolonu pyroglutamátu (PPG) 1 mg/kg, 5 mg/kg a 10 mg/kg.

Subjektivní hodnocení této skupiny z pohledu motoriky je takové, že zejména u 12 denních potkanů s dávkami 5 a 10 mg/kg došlo ke změně svalového tonu a ovlivněn byl také jak spontánní motorický projev, tak i výsledky motorických testů potkanů oproti kontrolní skupině ale i skupině dlouhodobého sledování.

7.1.1 *Surace righting test*

Při tomto testu jsme zjišťovali výsledky u všech tří vývojových stádií potkanů.

U 12 denních potkanů byla objevena statisticky významná změna - prodloužení času při provádění testu a to zejména po aplikaci PPG v dávkách 5 mg/kg a 10 mg/kg. U dávky PPG 5 mg/kg bylo zjištěno zvýšení času testu nad 1 sekundu u 6 potkanů z 10. U dávky PPG 10 mg/kg bylo zjištěno zvýšení času testu u 7 potkanů z 10. U poslední zmiňované skupiny 3 z 10 potkanů se neotočili ze zad vůbec a zůstali ležet.

U 18 denních došlo ke zvýšení doby pro otočení pouze u 2 potkanů po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg.

U 25 denních zvířat nebyla zaznamenána žádná změna v provádění testu otočení ze zad na břicho po podání testované látky v porovnání s kontrolní skupinou.

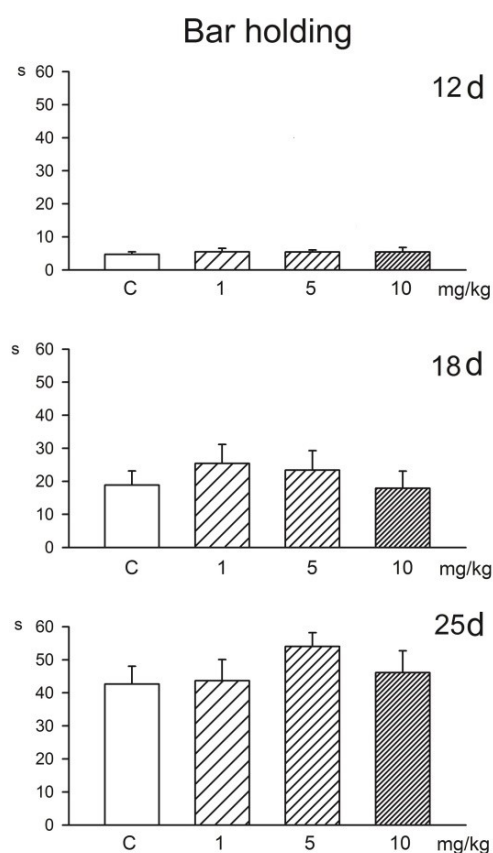
7.1.2 *Bar holding test*

Tento test byl hodnocen pro všechna tři vývojová stádia. S postupem vývoje se fyziologicky prodlužovala doba, po kterou se potkani na hrazdě udrželi (max. 60 s). Ani

v jedné věkové skupině nebyly zjištěny po podání sledované látky žádné zásadní odchylky od kontrolní skupiny (viz Graf 1).

Od 18 denních zvířat bylo také pozorováno, zda se zvládnou přitáhnout a vylézt na hrazdu. To bylo zjištěno v kontrolní skupině u 3 zvířat z 9, dále u zvířat s dávkou PPG 1 mg/kg u 1 z 10 a u dávky PPG 5 mg/kg 2 z 10.

U 25 denních potkanů u kontrolní skupiny vylezlo na hrazdu 3 z 12 zvířat, a také po dávce PPG 1 mg/kg 2 z 9, u dávky PPG 5 mg/kg 6 z 10 a nakonec po dávce PPG 10 mg/kg 3 z 8 zvířat.

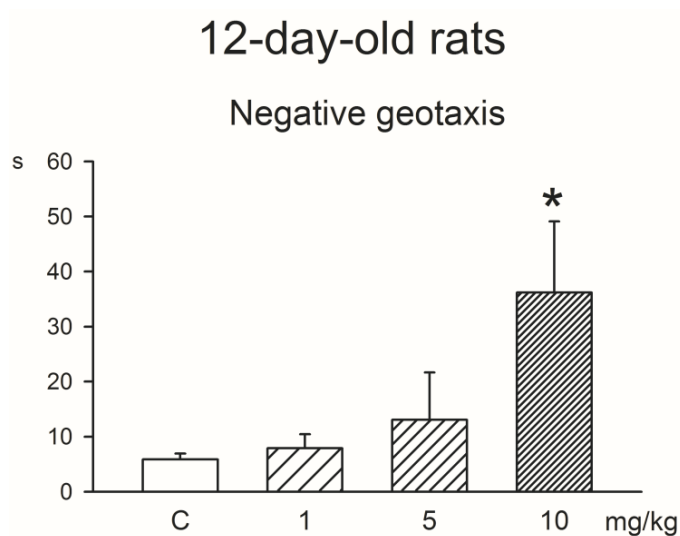


Graf 1: Sloupcový diagram představující výsledky bar holding testu po akutním podání u 12 až 25 denních potkanů. Osa X znázorňuje jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní tři skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 1, 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí čas (s), po který se zvířata udrželi na hrazdě. Žádná významná změna zde nebyla zaznamenána.

7.1.3 *Negative geotaxis test*

Tento test byl proveden pouze u 12 denních potkanů. Signifikantní změna nárůstu doby pro otočení o 180° na nakloněné rovině byla zjištěna u skupiny s dávkou PPG 10 mg/kg oproti kontrolní. U ostatních dvou dávek PPG byl zaznamenán pouze mírný nárůst doby pro otočení (viz Graf 2).

Zajímavým poznatkem také je, že u skupiny s dávkou PPG 10 mg/kg 5 potkanů z 10 tento test vůbec za vyměřený čas nedokončili.

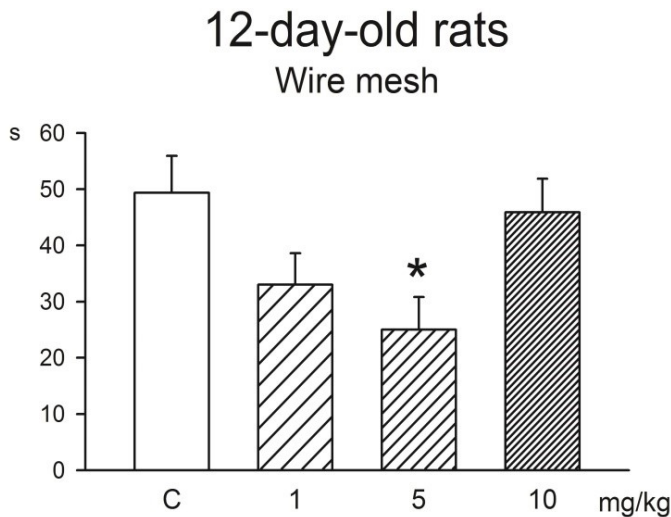


Graf 2: Sloupcový diagram představující výsledky negative geotaxis testu po akutním podání PPG u 12 denních potkanů. Osa X znázorňuje jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní tři skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 1, 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí čas (s), za který se zvířata otočila o 180° na nakloněné plošině. Hvězdička (*) značí signifikantní zvýšení času pro otočení po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg oproti kontrolní skupině.

7.1.4 *Wire mesh ascending test*

Test wire mesh ascending byl proveden také pouze u vývojového stádia 12 denních potkanů rozdělených do 4 skupin podle aplikované látky (viz Graf 3). Po aplikaci PPG v dávkách 1 a 5 mg/kg byl zaznamenán pokles času k vylezení po síti na plošinu oproti kontrolám, kdy u dávky PPG 5 mg/kg byl čas statisticky významně snížen. PPG v dávce 10 mg/kg téměř nezměnila čas potřebný k dokončení testu oproti kontrolní skupině.

I zde se objevily případy, kdy potkani test nedokončili vůbec. Buď z důvodu snížení svalového tonu, nebo místo lezení po síti nahoru, lezli do stran a spadli. U kontrolní skupiny to byly 2 zvířata z 8, u dávky PPG 1 a 5 mg/kg 2 z 10 a u dávky 10 mg/kg 5 z 10.



Graf 3: Sloupcový diagram představující výsledky wire mesh ascending testu po akutním podání PPG u 12 denních potkanů. Osa X znázorňuje jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní tři skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 1, 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí čas (s), za který zvířata vylezla po síti nahoru na plošinu. Hvězdička (*) značí signifikantní snížení času pro dokončení testu po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg oproti kontrolní skupině.

7.1.5 Chůze po pravidelném horizontálním žebříku

Chůze po pravidelném horizontálním žebříku byla vyhodnocena u dvou věkových kategorií, a to 18 a 25 denních potkanů. Zaznamenán byl čas, za který přešli žebřík a skočili do akvária se sourozenci a počet chyb, které během testu udělali (viz Graf 4).

Z výsledků vyplývá tendence, že u 18 denních potkanů došlo ke snížení času k dokončení testu oproti kontrole u dávky PPG 5 mg/kg, ostatní dvě dávky oproti kontrole se téměř nezměnily. Ve výkladu počtu provedených chyb došlo u dávky PPG 1 a 10 mg/kg ke zvýšení počtu a u dávky 5 mg/kg se počet téměř nezměnil.

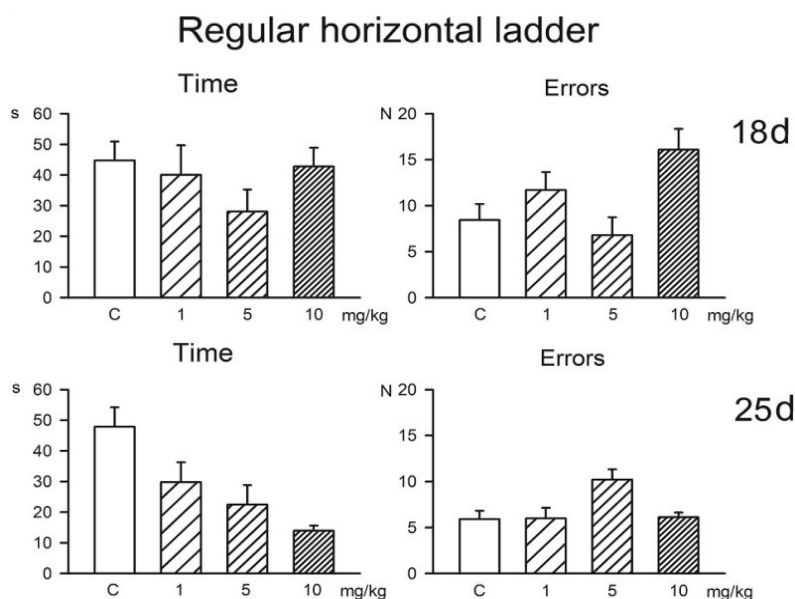
U 25 denních zvířat je vidět tendence postupného snižování času u všech dávek PPG oproti kontrolní skupině pro provedení testu. Chybovost oproti kontrole je u dávek PPG 1 a 10 mg/kg téměř stejná, na rozdíl od PPG v dávce 5 mg/kg, kdy se chybovost zvyšuje.

V porovnání časů potřebných pro dokončení testu mezi věkovými skupinami je kontrolní skupina téměř stejná a u 25 denních jsou všechny časy nižší, než u 18 denních.

Porovnání provedených chyb mezi dvěma uvedenými vývojovými skupinami udává, že již počet chyb u kontrolní skupiny 25 denních potkanů je nižší než u 18 denních. Až na dávku PPG 5 mg/kg je počet chyb u 25 denních potkanů nižší oproti 18 denním zvířatům.

Při tomto testování správně neprovedlo zadaný motorický úkol a do akvária za sourozenci neskočilo u 18 denních v kontrolní skupině 4 z 9 potkanů, u dávky PPG 1 a

5 mg/kg 3 z 10 potkanů a u dávky PPG 10 mg/kg 4 z 10. Zajímavým výsledkem je, že u 25 denních potkanů test neprovedl pouze 1 z 10 při dávce PPG 5 mg/kg.



Graf 4: Sloupcový diagram představující výsledky testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku u 18 a 25 denní vývojové skupiny po akutním podání PPG, kdy vlevo jsou znázorněny časy, za které potkani test dokončili a vpravo počet chyb, které během testu provedli. Osa X znázorňuje v obou případech jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní tři skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 1, 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí vlevo čas (s), za který zvířata přešla horizontální žebřík a skočila do akvária za sourozenci. Osa Y značí vpravo počet chyb (N), které byly provedeny potkany a zaznamenány během provedení testu. Žádné signifikantní změny času ani počtu chyb nebyly zaznamenány.

7.1.6 Chůze po nepravidelném horizontálním žebříku

Chůze po nepravidelném horizontálním žebříku byla vyhodnocena také u dvou věkových kategorií, a to 18 a 25 denních potkanů. Zaznamenán byl čas, za který přešli žebřík a skočili do akvária se sourozenci a počet chyb, které během testu udělali (viz Graf 5).

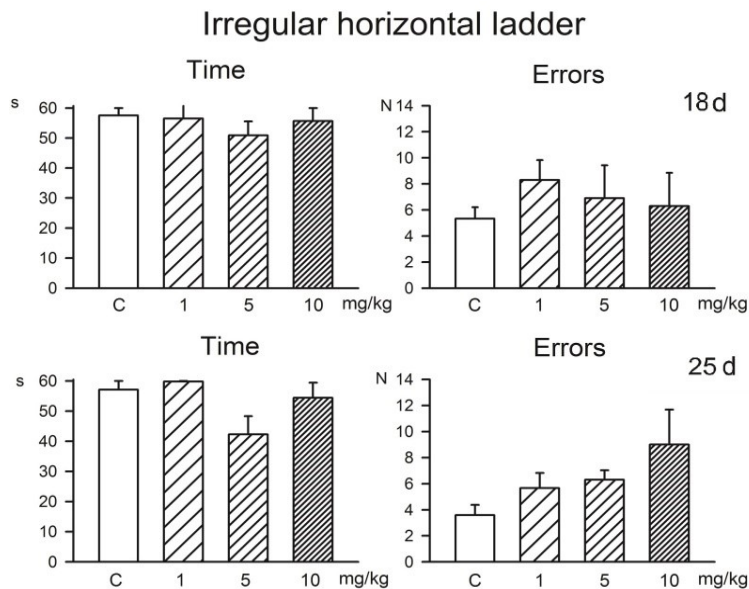
Z výsledků vyplývá, že u 18 denních potkanů nedošlo u všech dávek PPG téměř k žádné změně času k dokončení testu oproti kontrole. Ve výkladu počtu provedených chyb došlo u všech dávek PPG ke zvýšení oproti kontrole, nejvíce u dávky PPG 1 mg/kg.

U 25 denních zvířat se čas u dávek PPG 1 a 10 mg/kg oproti kontrolní skupině téměř nemění, pouze u dávky 5 mg/kg je zaznamenán mírný pokles času pro provedení testu. Chybovost oproti kontrole se u dávek postupně mírně zvyšuje, kdy nejvyšší je tedy u dávky PPG 10 mg/kg.

Porovnání časů potřebných pro dokončení testu mezi věkovými skupinami je téměř shodný ve všech dávkových skupinách. Pouze u 25 denních potkanů se čas u dávky PPG 5 mg/kg mírně snížil.

Porovnání provedených chyb mezi dvěma vývojovými skupinami udává, že již počet chyb u kontrolní skupiny 25 denních potkanů je nižší než u skupiny 18 denních. Až na dávku PPG 10 mg/kg je počet chyb u 25 denních potkanů nižší oproti 18 denním zvířatům.

Při tomto testování správně neprovedlo zadaný motorický úkol a do akvária za sourozenci neskočilo u 18 denních v kontrolní skupině 7 z 9 potkanů, u dávky PPG 1 mg/kg 3 z 10, PPG 5 mg/kg 6 z 10 a u dávky PPG 10 mg/kg 8 z 10. U 25 denních potkanů test neprovedlo v kontrolní skupině 5 z 12, u dávky PPG 1 mg/kg 3 z 9, PPG 5 mg/kg 0 z 10 a u dávky PPG 10 mg/kg 1 z 8 potkanů.



Graf 5: Sloupcový diagram představující výsledky testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku u 18 a 25 denní vývojové skupiny po akutním podání PPG, kdy vlevo jsou znázorněny časy, za které potkani test dokončili a vpravo počet chyb, které během testu provedli. Osa X znázorňuje v obou případech jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní tři skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 1, 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí vlevo čas (s), za který zvířata přešla horizontální žebřík a skočila do akvária za sourozenci. Osa Y značí vpravo počet chyb (N), které byly provedeny potkany a zaznamenány během provedení testu. Žádné signifikantní změny času ani počtu chyb nebyly zaznamenány.

7.1.7 Open field test

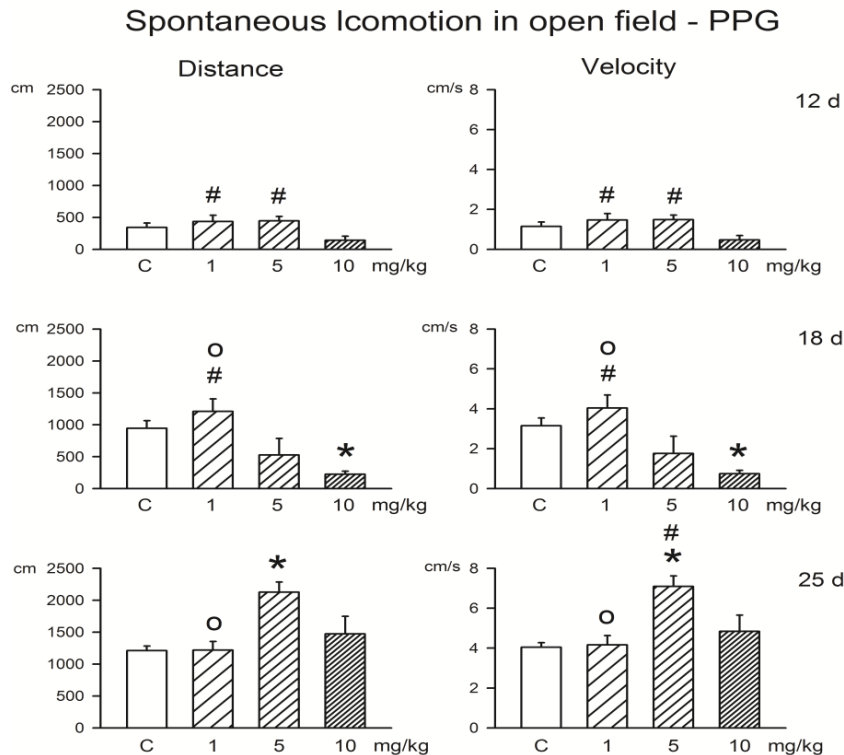
K hodnocení spontánní motoriky potkanů byl využit 5 minutový open field test.

Jedna z částí tohoto testu byla zaměřena více na čistě motorické chování a vyhodnocena zde byla tedy celková rychlost a vzdálenost, kterou za 5 minut v open fieldu potkani ušli (viz Graf 6).

U skupiny 12 denních potkanů se vzdálenost oproti kontrole mírně zvýšila po aplikaci PPG v dávkách 1 a 5 mg/kg, ale signifikantním výsledkem je snížení ušlé vzdálenosti po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg oproti dávčám PPG 1 a 5 mg/kg. U hodnocení rychlosti chůze jsou výsledky totožné, tedy průměrná rychlost se oproti kontrole mírně zvýšila u dávek PPG 1 a 5 mg/kg, ale signifikantním výsledkem je snížení ušlé vzdálenosti u dávky PPG 10 mg/kg oproti dávčám PPG 1 a 5 mg/kg.

Výsledky ušlé vzdálenosti u skupiny 18 denních ukazují signifikantní snížení ušlé vzdálenosti oproti kontrole u dávky PPG 10 mg/kg. Dále také významným výsledkem je snížení vzdálenosti oproti dávce PPG 1 mg/kg u dávek 5 a 10 mg/kg. U hodnocení rychlosti chůze jsou výsledky totožné, tedy signifikantním výsledkem je snížení ušlé vzdálenosti u dávky PPG 10 mg/kg oproti kontrole a snížení vzdálenosti oproti dávce PPG 1 mg/kg u dávek 5 a 10 mg/kg.

Signifikantní změny u skupiny 25 denních byly zaznamenány u dávky PPG 5 mg/kg, kdy ušlá vzdálenost byla významně větší než u dávky PPG 1 mg/kg a kontrolní skupiny. Z grafu rychlosti vychází signifikantní změna u dávky PPG 5 mg/kg, kdy rychlost chůze byla významně větší než u všech ostatních dávek, tedy u dávky PPG 1 a 5 mg/kg a také u kontrolní skupiny.



Graf 6: Sloupcové diagramy představující výsledky testu open field u 12, 18 a 25 denní vývojové skupiny po akutním podání PPG – kdy vlevo je znázorněná vzdálenost a vpravo rychlost, kterou šli. Osa X znázorňuje ve všech případech jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní tři skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 1, 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí vlevo vzdálenost (cm), kterou zvířata ušla při testování a rychlost (cm/s), kterou potkani šli. Hvězdička (*) značí vždy signifikantní změnu času oproti kontrolním skupinám. Křížek (#) značí signifikantní změnu oproti dávce PPG 10 mg/kg. Kolečko (O) značí signifikantní změnu mezi dávkami PPG 1 a 5 mg /kg.

Dalšími zjišťovanými parametry ohledně středu open fieldu byly latence času, za kterou do něj poprvé vstoupí, frekvence vstupu do středu a čas strávený ve středu open fieldu (viz Graf 7). Tato část testu spíše souvisí s vlivy na behaviorální chování, zejména vypovídá o míře anxiety. Test byl proveden ve všech třech věkových kategoriích.

Z dosavadních výsledků vyplývá, že u 12 denních potkanů se latence času prvního vstoupení do středu oproti kontrole téměř neliší. U frekvence vstupu do středu bylo zjištěno signifikantní snížení tohoto parametru oproti kontrole po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg. Čas strávený ve středu měl tendenci se zvyšovat pouze u skupiny s dávkou PPG 10 mg/kg.

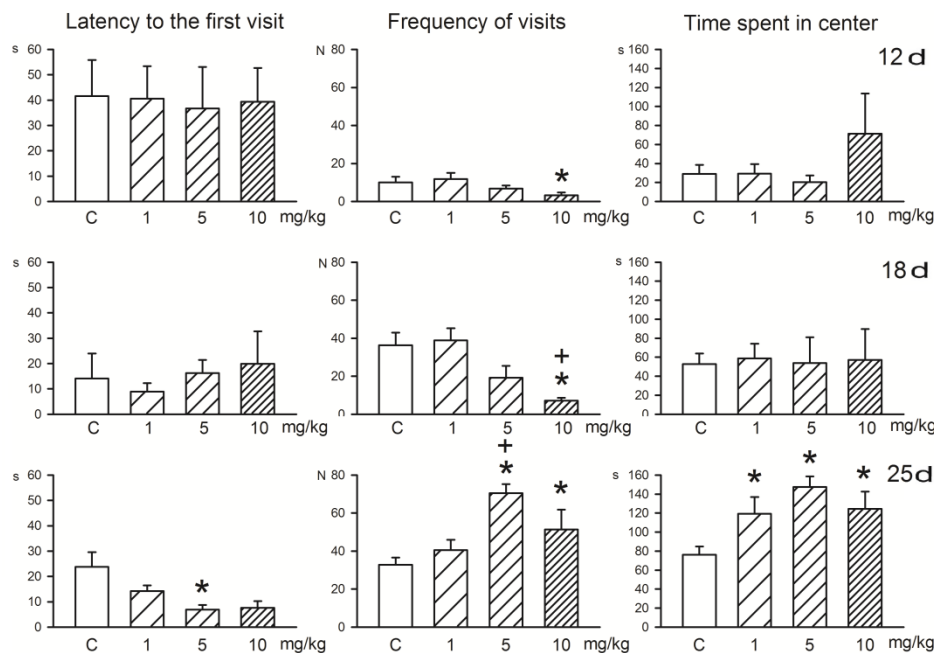
U skupiny 18 denních potkanů se latence času prvního dosažení středu oproti kontrole také téměř nemění, pouze po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg se čas lehce zvyšuje. Frekvence vstupu do středu je oproti kontrole snížena u dávek PPG 5 a 10 mg/kg. Přičemž dávka PPG 10 mg/kg signifikantně snižuje tento parametr jak oproti

kontrolu, tak oproti dávce PPG 1 mg/kg. Čas strávený ve středu se v této věkové skupině po podání PPG ve všech třech různých dávkách oproti kontrole téměř nezměnil.

Při hodnocení latence prvního dosažení středu open fieldu u skupiny 25 denních potkanů došlo ke snížení času u všech dávek PPG oproti kontrole, kdy signifikantní byla změna po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg. Frekvence vstupu do středu se zvyšovala u všech dávek oproti kontrole. Signifikantní zvýšení oproti kontrole bylo zaznamenáno u dávky PPG 5 a 10 mg/kg a také u dávky PPG 5 mg/kg oproti 1 mg/kg. Čas oproti kontrole byl signifikantně zvýšen u všech třech dávek PPG.

Při porovnání testů mezi věkovými kategoriemi je patrné snížení času latence prvního dosažení středu open fieldu spolu s postupujícím vývojovým věkem i ve vztahu k jednotlivým aplikovaným dávkám PPG a kontrolám. Naopak čas strávený ve středu se s věkem zvyšuje a frekvence vstupu do středu také i ve vztahu k jednotlivým dávkám.

Spontaneous locomotion in open field - PPG



Graf 7: Sloupcové diagramy představující výsledky testu open field u 12, 18 a 25 denní vývojové skupiny po akutním podání PPG – kdy vlevo je znázorněná latence času prvního dosažení středu, uprostřed frekvence vstupu do středu a vpravo čas strávený ve středu open fieldu. Osa X znázorňuje ve všech případech jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní tři skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 1, 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí vlevo čas (s), za který zvířata poprvé došla do středu, uprostřed počet vstupů (N) do středu a vpravo čas (s), který potkani ve středu strávili. Hvězdička (*) značí vždy signifikantní změnu času oproti kontrolním skupinám. Kříž (+) značí signifikantní změnu oproti dávce PPG 1 mg/kg.

7.2 Dlouhodobé účinky

Toto testování bylo provedeno po opakované aplikaci rozpouštědla CDX jako kontrolní látky 10 ml/kg a PPG v dávkách 5 a 10 mg/kg ve dnech P7 až P11 u 21 mláďat laboratorního potkana ve věkových kategoriích 12, 15, 18, 21, 25, 29, 31, 52 a 60 denních zvířat.

Subjektivně u této skupiny nebylo pozorováno téměř žádné ovlivnění motoriky, na rozdíl od akutních účinků. Více zde byl akcentován vliv na behaviorální stránku pohybu.

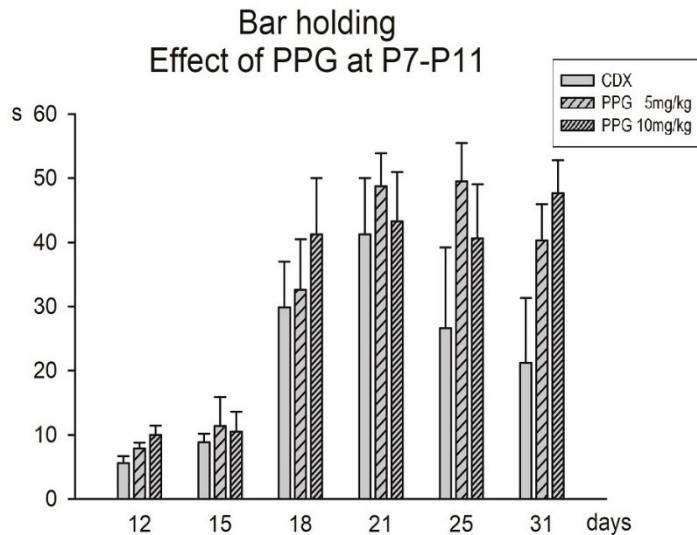
7.2.1 *Surface righting test*

Tento test byl proveden a hodnocen u 7 věkových kategorií – 12, 15, 18, 21, 25, 31 a 60 denních potkanů. Pouze u jednoho 12 denního potkana ze všech testovaných došlo ke zvýšení času pro otočení ze zad na břicho po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg.

7.2.2 *Bar holding test*

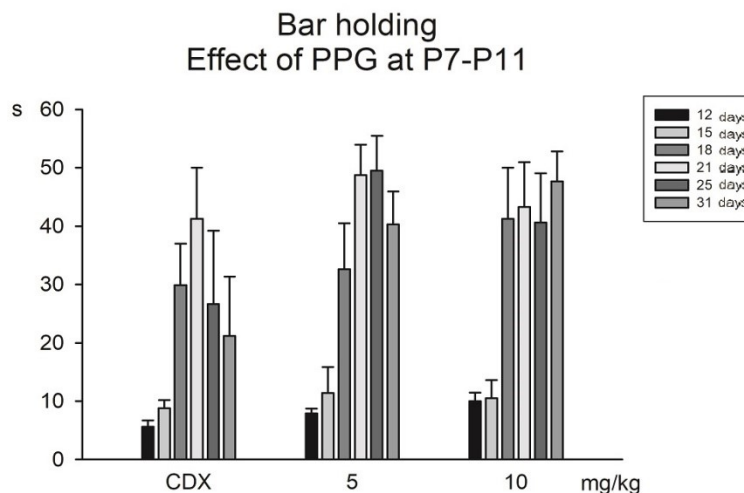
Bar holding test byl proveden u stejných 7 věkových kategorií jako test surface righting. Do zpracování nebyli zahrnut výsledky 60 denních potkanů, z důvodu na tento test vysokého stadia vývoje a snahy z hrazdy spíše slézt. Statistickým programem byly vypracovány dva grafy, kdy jeden porovnává vztah dávky na čas, za který se na hrazdě udrželi v jednotlivých vývojových skupinách (viz Graf 9). Druhý naopak zjišťuje, jak se měnil čas v jednotlivých dnech vývoje u 3 vyšetřovaných dávkových skupin (viz Graf 8).

Na Grafu 8 je znázorněna změna času provedení testu po podání různých dávek u jednotlivých věkových kategorií. Ze všech dávek je v každé věkové skupině nejnižší vždy kontrola. U 12, 18 a 31 denních potkanů se čas na hrazdě postupně zvyšuje s narůstající aplikovanou dávkou. U 15, 21 a 25 denních potkanů je čas po dávce PPG 10 mg/kg menší než po dávce 5 mg/kg. Při tomto porovnání také nebyly zjištěny žádné signifikantní změny.



Graf 8: Sloupcový diagram představující výsledky bar holding testu u 12 až 31denních potkanů po dlouhodobé aplikaci PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den). Osa X znázorňuje jednotlivé věkové skupiny. Osa Y značí čas (s), po který se zvířata udrželi na hrazdě. Žádná významná změna zde nebyla zaznamenána.

Z Grafu 9 vyplývá, že v každé dávkové skupině dochází vlivem věku ke zvýšení času pro udržení na hrazdě. U kontrolní skupiny je patrné, že u 25 a 31 denních potkanů došlo ke snížení času oproti 18 a 21 denním. Také po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg bylo zaznamenáno snížení doby pro udržení na hrazdě u 31 denních potkanů oproti 25 denním. Tuto skutečnost přisuzují spíše vyššímu vývojovému stadiu a snaze z hrazdy utéct. Žádné významné signifikance nebyly zaznamenány.



Graf 9: Sloupcový diagram představující výsledky bar holding testu u 12 až 31denních potkanů po dlouhodobé aplikaci PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den). Osa X znázorňuje jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí čas (s), po který se zvířata udrželi na hrazdě. Žádná významná změna zde nebyla zaznamenána.

Od 18 denních zvířat bylo také pozorováno, zda se zvládnou přitáhnout a vylézt na hrazdu. To bylo v této věkové kategorii zjištěno u 1 potkana z 8 po dávce PPG 10 mg/kg a 1 z 8 při dávce PPG 5 mg/kg.

U 21 denních potkanů u kontrolní skupiny vylezlo na hrazdu 2 z 5 zvířat, a dále u dávky PPG 5 mg/kg 4 z 8 a u dávky PPG 10 mg/kg 4 z 8 zvířat.

U 25 denních potkanů u kontrolní skupiny vylezlo na hrazdu 2 z 5 zvířat, a také u dávky PPG 5 mg/kg 5 z 8 a u dávky PPG 10 mg/kg 4 z 8 zvířat.

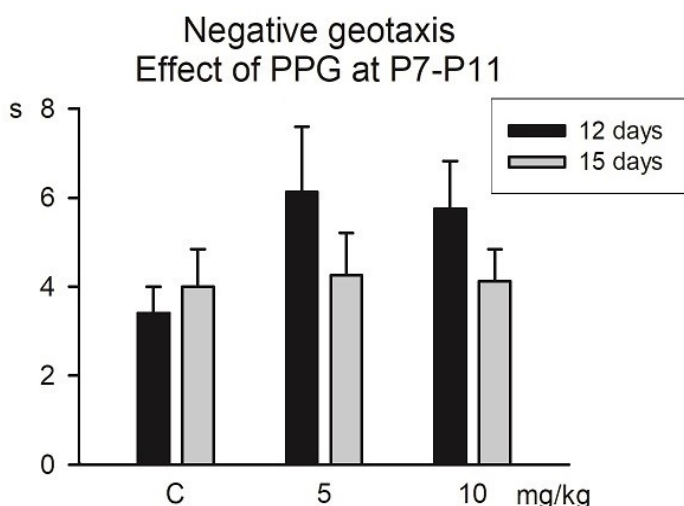
U 31 denních potkanů u kontrolní skupiny vylezlo na hrazdu 1 z 5 zvířat, a dále u dávky PPG 5 mg/kg 2 z 8 a u dávky PPG 10 mg/kg 4 z 8 zvířat.

7.2.3 *Negative geotaxis test*

Negative geotaxis test byl proveden vzhledem k věkové závislosti pouze u 12 a 15 denních potkanů. Z výsledků porovnání času potřebného k otočení vzhledem k dávce vyplývá, že se zde neobjevily žádné signifikantní změny (viz Graf 10).

U 12 denních potkanů je patrné zvýšení času testu oproti kontrole u dávky PPG 5 mg/kg. U dávky PPG 10 mg/kg došlo k mírnému snížení času oproti dávce 5 mg/kg.

Při vyhodnocení výsledků tohoto testu u 15 denních potkanů nedošlo téměř k žádné odchylce oproti kontrole. Obecně u vývojově starších potkanů je průměrný čas testu nižší než u 12 denních.

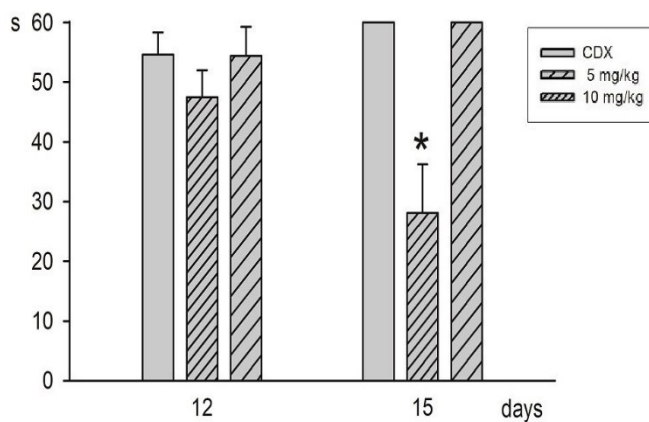


Graf 10: Sloupcový diagram představující výsledky negative geotaxis testu u 12 a 15 denních potkanů po dlouhodobé aplikaci PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den). Osa X znázorňuje jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí čas (s), za který se zvířata otočila o 180° na nakloněné plošině. Při tomto testu nedošlo k žádným signifikantním změnám.

7.2.4 Wire mesh ascending test

Tento test byl také proveden s ohledem na věk pouze u 12 a 15 denních potkanů. Při závislosti času na věku jsou hodnoty u kontroly a dávky PPG 10 mg/kg téměř stejné jak u 12, tak i u 15 denních potkanů. U obou věkových skupin došlo po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg ke snížení času k dokončení testu oproti ostatním dávkám, zejména signifikantní snížení bylo zaznamenáno u 15 denních mláďat oproti kontrolní skupině (viz Graf 11).

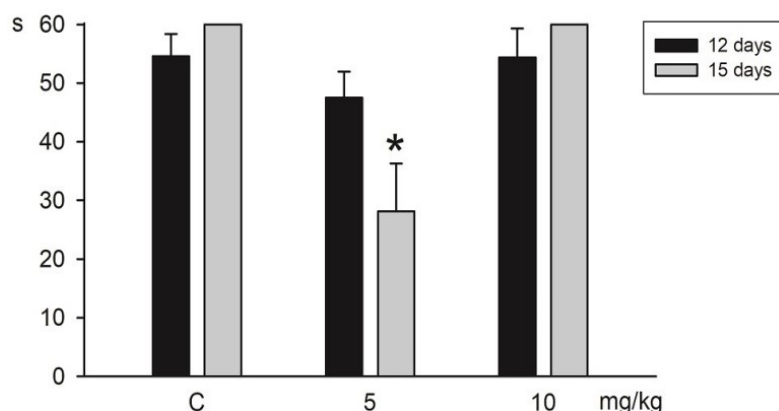
Effect of PPG (P7-P11) on wire mesh ascending



Graf 11: Sloupcový diagram představující výsledky wire mesh ascending testu po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) u 12 a 15 denních potkanů. Osa X znázorňuje jednotlivé věkové kategorie. Osa Y značí čas (s), za který zvířata vylezla po síti nahoru na plošinu. Hvězdička (*) značí signifikantní snížení času pro dokončení testu u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v koncentraci 5 mg/kg oproti kontrolní skupině.

Z grafu závislosti času pro vylezení na plošinu na aplikované dávce vyplývá, že u 15 denních zvířat je čas vyšší než u 12 denních u kontroly a dávky PPG 10 mg/kg. Signifikantní snížení času pro dokončení testu bylo zaznamenáno u dávky PPG 5 mg/kg 15 denních potkanů oproti 12 denní skupině (viz Graf 12).

Effect of PPG (P7-P11) on wire mesh ascending



Graf 12: Sloupcový diagram představující výsledky wire mesh ascending testu po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) u 12 a 15 denních potkanů. Osa X znázorňuje jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí čas (s), za který zvířata vylezla po síti nahoru na plošinu. Hvězdička (*) značí signifikantní snížení času pro dokončení testu 15 denních potkanů po aplikaci PPG v koncentraci PPG 5 mg/kg oproti skupině 12 denních potkanů.

7.2.5 Chůze po pravidelném horizontálním žebříku

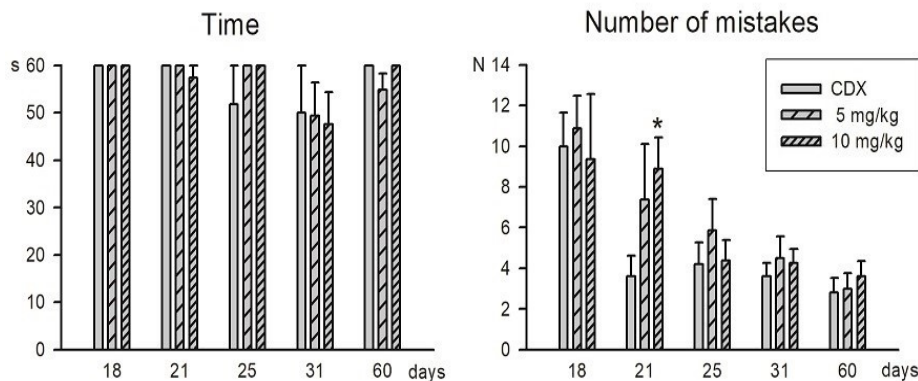
Chůze po pravidelném horizontálním žebříku byla testována při dlouhodobé aplikaci PPG u 18 až 60 denních potkanů.

Z grafu je patrné, že vlivem vývoje nedošlo téměř k žádným významným změnám času pro provedení testu v závislosti na aplikovaných dávkách (viz Graf 13).

Při vyhodnocení změn v chybovosti při chůzi po pravidelném horizontálním žebříku vplývá, že se zvyšujícím vývojovým věkem dochází k tendenci snížení počtu chyb ve všech dávkových skupinách. Signifikantní výsledkem je zde ale zvýšení počtu chyb po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg oproti kontrole u 21 denních potkanů (viz Graf 13).

Effects of PPG (P7-P11)

Regular horizontal ladder



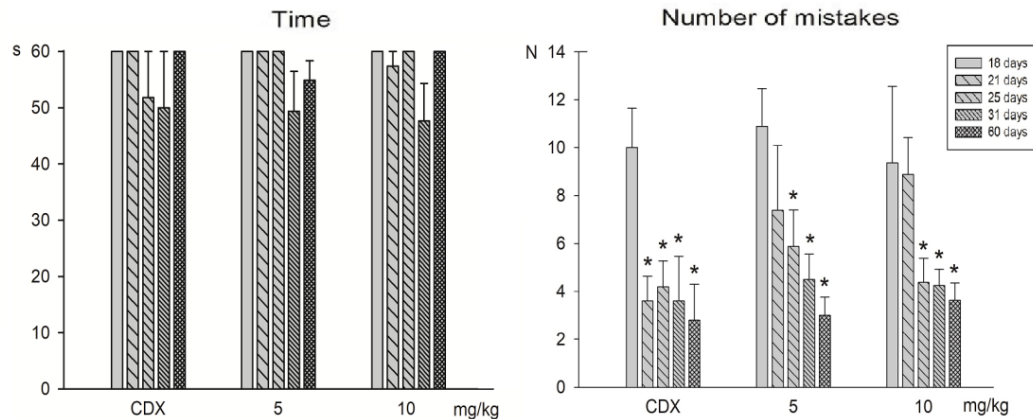
Graf 13: Sloupcový diagram představující výsledky testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku u 18 až 60 denních potkanů po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) v dávce 5 a 10 mg/kg a CDX 10 ml/kg jako kontroly, kdy vlevo jsou znázorněny časy, za které potkani test dokončili a vpravo počet chyb, které během testu provedli. Osa X znázorňuje v obou případech jednotlivé věkové kategorie potkanů. Osa Y značí vlevo čas (s), za který zvířata přešla horizontální žebřík a skočila do akvária za sourozenci. Osa Y značí vpravo počet chyb (N), které byly provedeny potkany a zaznamenány během provedení testu. Hvězdička (*) značí signifikantní zvýšení počtu chyb u 21 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg oproti kontrole.

Porovnání času pro dokončení testu z pohledu jednotlivých dávek vůči věku nedošlo ke zjištění žádných signifikantních změn. V kontrolní skupině došlo ke snížení času pouze u skupin 25 a 31 denních potkanů oproti ostatním věkovým skupinám. Ve skupině s dávkou PPG 5 mg/kg došlo ke snížení pouze u 31 a 60 denních potkanů oproti ostatním. Ve skupině s dávkou PPG 10 mg/kg došlo ke snížení u 21 a 31 denních potkanů (viz Graf 14).

Počet chyb u kontrolní skupiny byl signifikantně snížen u všech věkových kategorií oproti 18 denním potkanům. Ve skupině s dávkou PPG 5 mg/kg došlo ke snížení počtu chyb u 25, 31 a 60 denních potkanů oproti 18 denním potkanům. Ve skupině s dávkou PPG 10 mg/kg došlo ke snížení počtu chyb taktéž u 25, 31 a 60 denních potkanů oproti 18 denním potkanům (viz Graf 14).

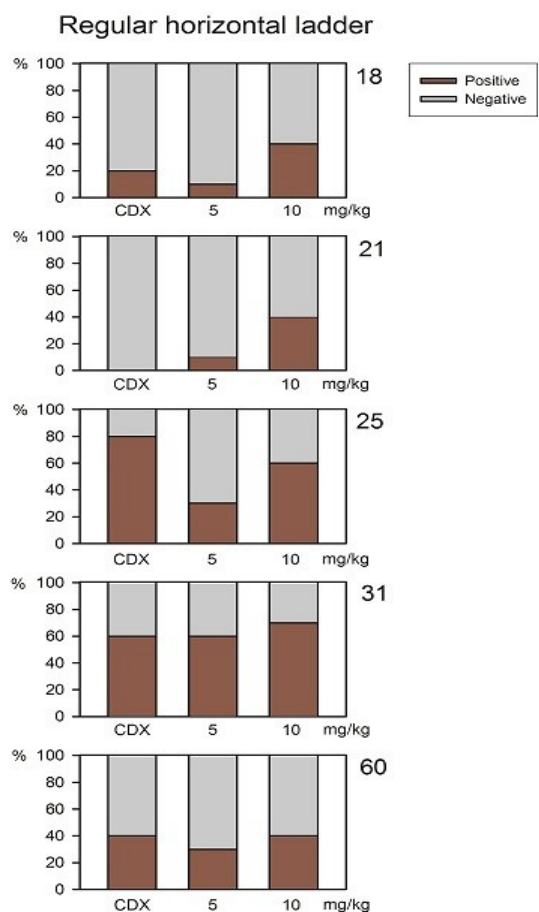
Effects of PPG (P7-P11)

Regular horizontal ladder



Graf 14: Sloupcový diagram představující výsledky testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku u 18 až 60 denních potkanů po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) v dávce 5 a 10 mg/kg a CDX 10 ml/kg jako kontroly, kdy vlevo jsou znázorněny časy, za které potkani test dokončili a vpravo počet chyb, které během testu provedli. Osa X znázorňuje v obou případech jednotlivé dávkové kategorie potkanů. Osa Y značí vlevo čas (s), za který zvířata přešla horizontální žebřík a skočila do akvária za sourozenci. Osa Y značí vpravo počet chyb (N), které byly provedeny potkany a zaznamenány během provedení testu. Hvězdička (*) značí signifikantní snížení počtu chyb u vyznačených věkových i dávkových kategorií potkanů.

Zajímavým výstupem z tohoto měření je nepoměr mezi potkany, kteří alespoň došli na konec žebříku a těmi, kteří ne. Z celkového počtu 21 zvířat ani polovina potkanů nedolezla ani jednou za celých 60 sekund testu na konec žebříku u 18, 21 a 60 denních ve všech dávkách (viz Graf 15).



Graf 15: Sloupcový diagram představující výsledky procentuálního zastoupení těch potkanů, kteří došli po pravidelném horizontálním žebříku až na konec u 18 až 60 denních potkanů po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. Až 11. postnatální den) v dávce 5 a 10 mg/kg a CDX 10 ml/kg jako kontroly. Osa X znázorňuje v každé věkové kategorii jednotlivé aplikované dávky. Osa Y značí procentuální zastoupení potkanů (%), kteří došli, nebo nedošli na konec žebříku. Tmavě červená barva znázorňuje ty, kteří až na konec žebříku došli a šedá barva naopak ty, kteří nedošli.

7.2.6 Chůze po nepravidelném horizontálním žebříku

Chůze po nepravidelném horizontálním žebříku byla testována při dlouhodobé aplikaci PPG taktéž u 18 až 60 denních potkanů.

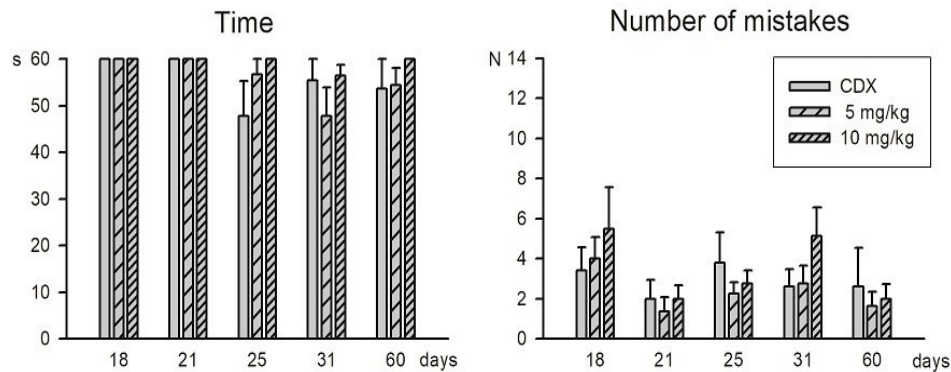
Z grafu je patrné, že vlivem vývoje nedošlo téměř k žádným významným změnám času pro provedení testu v závislosti na aplikovaných dávkách. Pouze u 25 denních došlo k mírnému snížení času kontrolní skupiny oproti skupinám s PPG a také snížení času u 31 denních u dávky PPG 5 mg/kg oproti jak kontrole, tak i dávce PPG 10 mg/kg. U 60 denních potkanů došlo ke snížení času u kontrolní skupiny a skupiny s PPG v dávce 5 mg/kg oproti dávce PPG 10 mg/kg (viz Graf 16).

Při vyhodnocení změn v chybovosti při chůzi po nepravidelném horizontálním žebříku vplývá, že se zvyšujícím vývojovým věkem dochází k tendenci snížení počtu chyb, ovšem ne tak markantní, jako u pravidelného žebříku. U 18 a 31 denních je ovšem tendence ke zvyšování chybovosti u obou dávek PPG oproti kontrole. U ostatních

věkových kategorií došlo oproti kontrole ke snížení chybovosti. Žádné signifikantní změny zde ovšem naměřeny nebyly (viz Graf 16).

Effects of PPG (P7-P11)

Irregular horizontal ladder



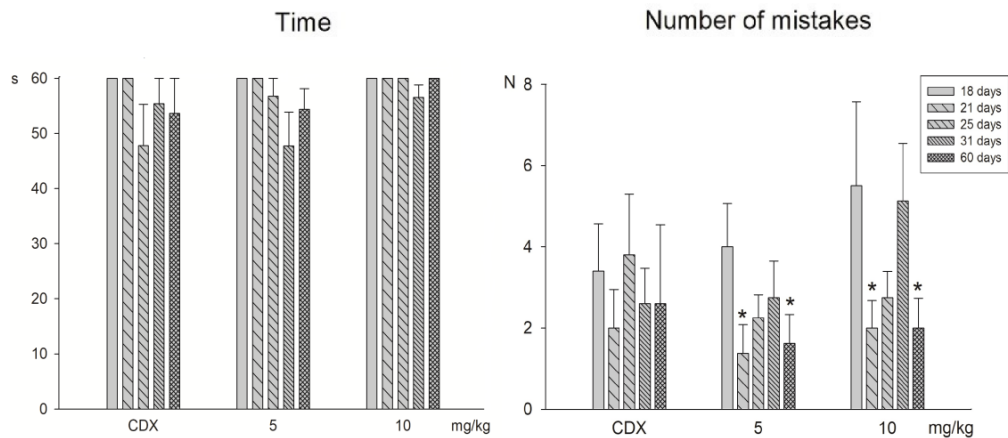
Graf 16: Sloupcový diagram představující výsledky testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku u 18 až 60 denních potkanů po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) v dávce 5 a 10 mg/kg a CDX 10 ml/kg jako kontroly, kdy vlevo jsou znázorněny časy, za které potkani test dokončili a vpravo počet chyb, které během testu provedli. Osa X znázorňuje v obou případech jednotlivé věkové kategorie potkanů. Osa Y značí vlevo čas (s), za který zvířata přešla horizontální žebřík a skočila do akvária za sourozenci. Osa Y značí vpravo počet chyb (N), které byly provedeny potkany a zaznamenány během provedení testu. Z výsledků nevychází žádné signifikantní změny.

V porovnání účinků jednotlivých dávek napříč věkovými kategoriemi z pohledu času pro přežení nepravidelného horizontálního žebříku nedošlo k významným změnám. V kontrolní skupině došlo k mírnému snížení času zejména u 25, 31 a 60 denních potkanů oproti ostatním věkovým skupinám, u skupiny s dávkou PPG 5 mg/kg došlo ke snížení času u 25, 31 a 60 denních a u dávky PPG 10 mg/kg došlo ke snížení času u 31 denních potkanů oproti ostatním věkovým skupinám (viz Graf 17).

Výsledky v počtu chyb při chůzi po nepravidelném horizontálním žebříku v závislosti na jednotlivých dávkách ukazují, že v kontrolní skupině nedošlo k žádným významným změnám v průběhu vývoje potkanů. Postupně došlo s věkem ke snižování počtu zaznamenaných chyb, až na 25 denní potkany, u kterých se chybovost mírně zvýšila. U dávky 5 mg/kg se od 18 denních zvířat chybovost s věkem snižovala. Signifikantně zejména u 21 a 60 denních potkanů oproti 18 denním. Chybovost po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg byla signifikantně snížena u 21 a 60 denních potkanů oproti 18 denním potkanům (viz Graf 17).

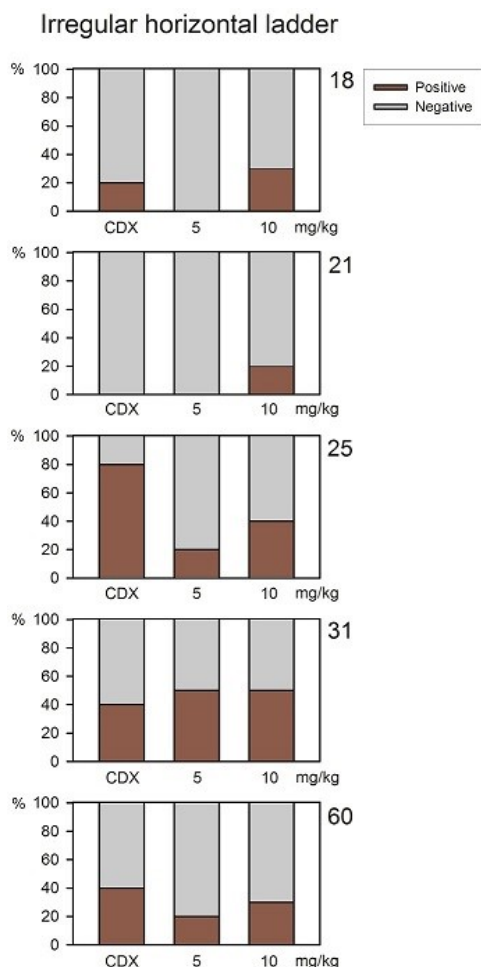
Effects of PPG (P7-P11)

Irregular horizontal ladder



Graf 17: Sloupcový diagram představující výsledky testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku u 18 až 60 denních potkanů po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) v dávce 5 a 10 mg/kg a CDX 10 ml/kg jako kontroly, kdy vlevo jsou znázorněny časy, za které potkani test dokončili a vpravo počet chyb, které během testu provedli. Osa X znázorňuje v obou případech jednotlivé dávkové kategorie potkanů. Osa Y značí vlevo čas (s), za který zvířata přešla horizontální žebřík a skočila do akvária za sourozenci. Osa Y značí vpravo počet chyb (N), které byly provedeny potkany a zaznamenány během provedení testu. Z výsledků jsou patrné signifikantní změny (*) zejména ve snížení chybovosti po dávce PPG 5 a 10 mg/kg u 21 a 60 denních potkanů oproti 18 denním.

Zajímavým výstupem z tohoto měření je nepoměr mezi potkany, kteří alespoň došli na konec žebříku a těmi, kteří ne. Z celkového počtu 21 zvířat ani polovina potkanů nedolezla ani jednou za celých 60 sekund testu na konec žebříku u 18, 21 a 60 denních ve všech dávkách (viz Graf 18).

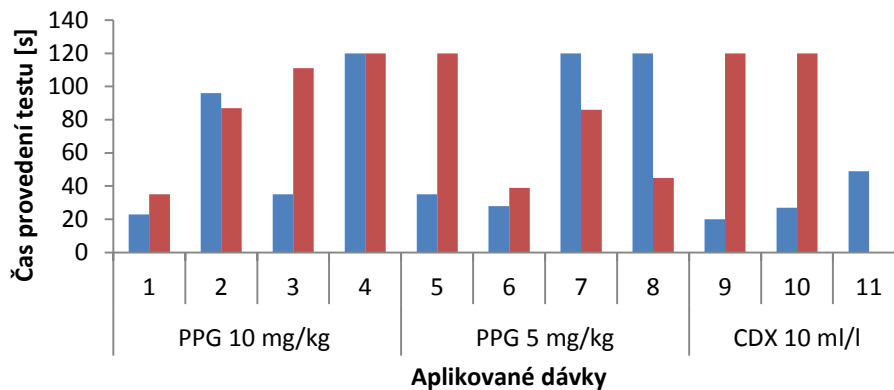


Graf 18: Sloupcový diagram představující výsledky procentuálního zastoupení těch potkanů, kteří došli po nepravidelném horizontálním žebříku u až na konec u 18 až 60 denních potkanů po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) v dávce 5 a 10 mg/kg a CDX 10 ml/kg jako kontroly. Osa X znázorňuje v každé věkové kategorii jednotlivé aplikované dávky. Osa Y značí procentuální zastoupení potkanů (%), kteří došli, nebo nedošli na konec žebříku. Tmavě červená barva znázorňuje ty, kteří až na konec žebříku došli a šedá barva naopak ty, kteří nedošli.

7.2.7 *Jumping down with choice test*

Tento test byl proveden orientačně pouze jednou u skupiny 31 denních potkanů. Z 21 potkanů 7 neskočilo z plošiny do akvária vůbec a 1 skočil do prázdného akvária místo k sourozencům. Podle dávek se jedná o 3 potkany z 8 u PPG v dávce 10 mg/kg, 3 z 8 u PPG v dávce 5 mg/kg a 2 z 5 u skupiny kontrolní. Tento test slouží pro vyšetření míry anxiety a bylo by vhodné ho zařadit při dalším testování této látky (viz Graf 19).

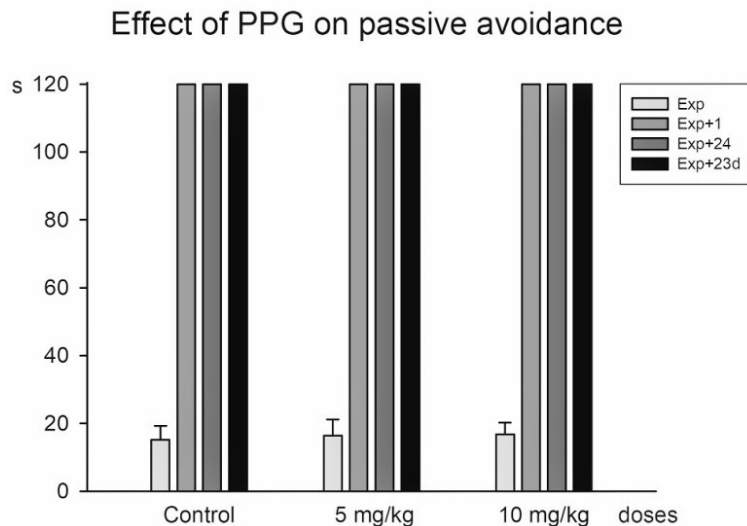
Jumping down with choice test 31 denní potkani



Graf 19: Sloupcový graf představující výsledky jumping down testu u 31 denních potkanů po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den). Osa X značí jednotlivé aplikované dávky. Na ose Y je zaznamenán čas (s), za který potkani skočili z plošiny do akvária. Modrá barva značí vrh A a červená barva vrh B.

7.2.8 *Passive avoidance test*

Test passive avoidance byl proveden ve věku 29 dní, poté byl zopakován po 1 a 24 hodinách pro zhodnocení možnosti ovlivnění krátkodobé a dlouhodobé paměti. Dále byl zopakován za 23 dní (P52) pro zjištění délky zapamatování podnětu. Po prvotním testu a fázi učení, kdy každý potkan vlezl do tmavé části přístroje a dostal lehký elektrický výboj do pacek, ani jeden z potkanů při opakování testu nevezl do tmavé části zařízení. Což může naznačovat, že aplikovaná látka nemá vliv na ovlivnění jak krátkodobé, tak dlouhodobé paměti (viz Graf 20).

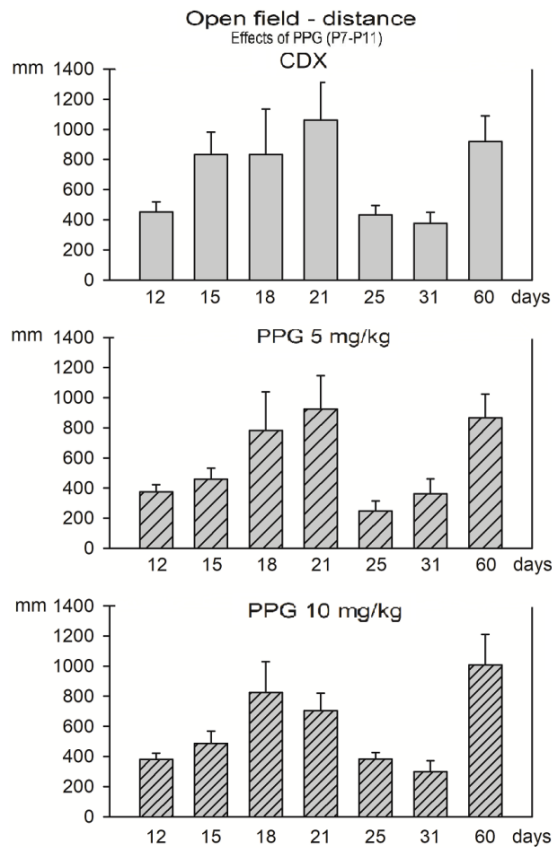


Graf 20: Sloupcový graf představující vyhodnocení latence vstupu do tmavého prostoru po dlouhodobém podání PPG (P7-P11 – aplikace 7. až 11. postnatální den) ve věku zvířat 29 dní. Osa X znázorňuje jednotlivé aplikované koncentrace látek. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa Y značí čas (s), za který zvířata vlezla do tmavého prostoru. Nejsvětlejší sloupec značí fázi učení, kdy po vstupu do tmavé části zařízení zvířata dostávala elektrické ranky do tlapek. Tmavší sloupce zleva doprava: vybavení za 1 hodinu, za 24 hodin a za 23 dní po počátečním učení. Výsledky všech testů po počátečním učení jsou signifikantně delší než latence při učení.

7.2.9 *Open field test*

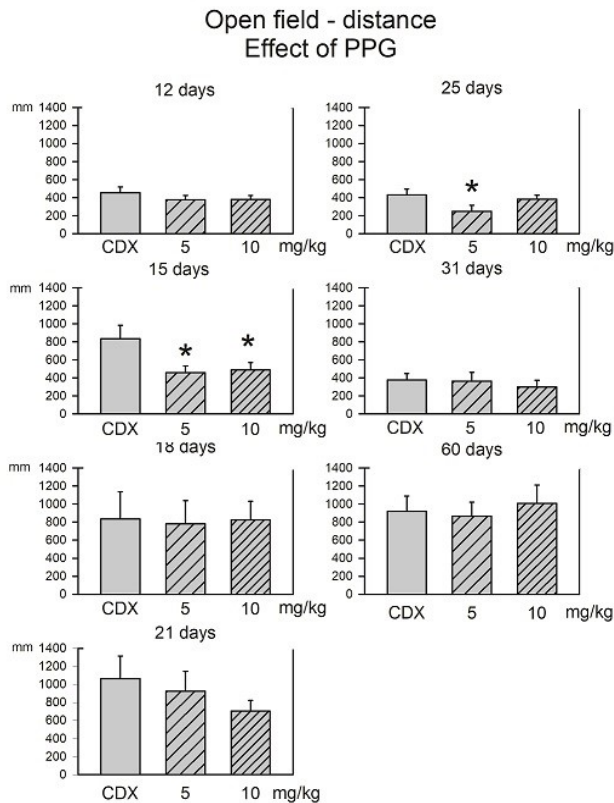
Z hlediska vysokého počtu testovaných věkových skupin u dlouhodobých účinků musely být výsledky open field testu rozděleny do více grafů.

Vyhodnocení ušlé vzdálenosti, kdy se v jednotlivých dávkových kategoriích porovnávaly věkové skupiny, neprokázalo žádné signifikantní změny (viz Graf 21). Oproti kontrolní skupině došlo v průměru k mírnému snížení ušlé celkové vzdálenosti u obou skupin s dávkami PPG. Postupem vývoje došlo až do 21. dne ke zvyšování ušlé vzdálenosti ve všech dávkových skupinách. Zajímavým poznatkem je, že ve všech třech dávkových skupinách došlo ke snížení počtu ušlých milimetrů u 25 a 31 denních potkanů. Průměrně nejdelší vzdálenost byla ušlá u 21 a 60 denních.



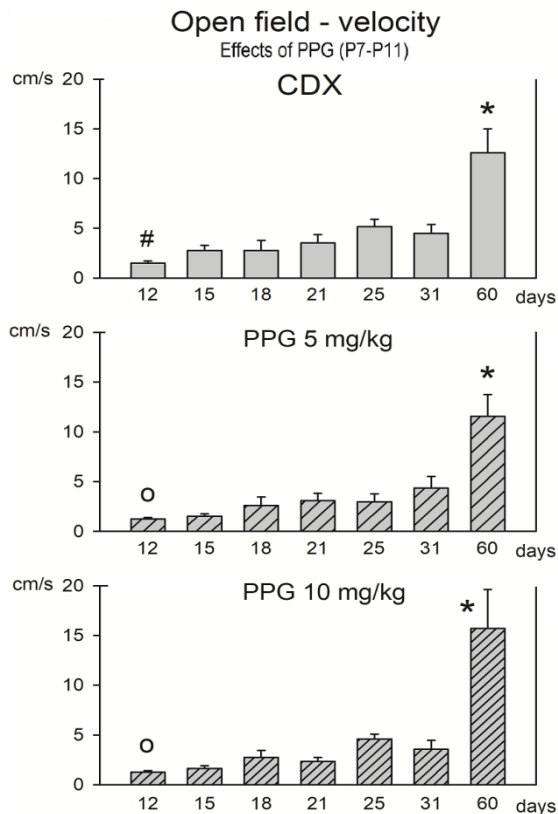
Graf 21: Sloupcové diagramy představující výsledky ušlé vzdálenosti z testu open field u 12 až 60 denní vývojové skupiny po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny tři aplikované koncentrace. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X značí jednotlivé věkové kategorie potkanů 12 až 60 denních (days). Osa Y znázorňuje ve všech případech ušlou vzdálenost (mm). Žádné signifikantní změny zde nebyly zaznamenány.

Při hodnocení ušlé vzdálenosti v jednotlivých věkových kategoriích byly zjištěny signifikantní změny u 15 denních potkanů, kdy došlo ke snížení ušlé vzdálenosti po aplikaci PPG v dávce 5 i 10 mg/kg oproti kontrolní skupině. Také u 25 denních zvířat došlo ke snížení vzdálenosti po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg oproti kontrole. Postupně během vývoje došlo obecně ke zvýšení vzdálenosti (viz Graf 22).



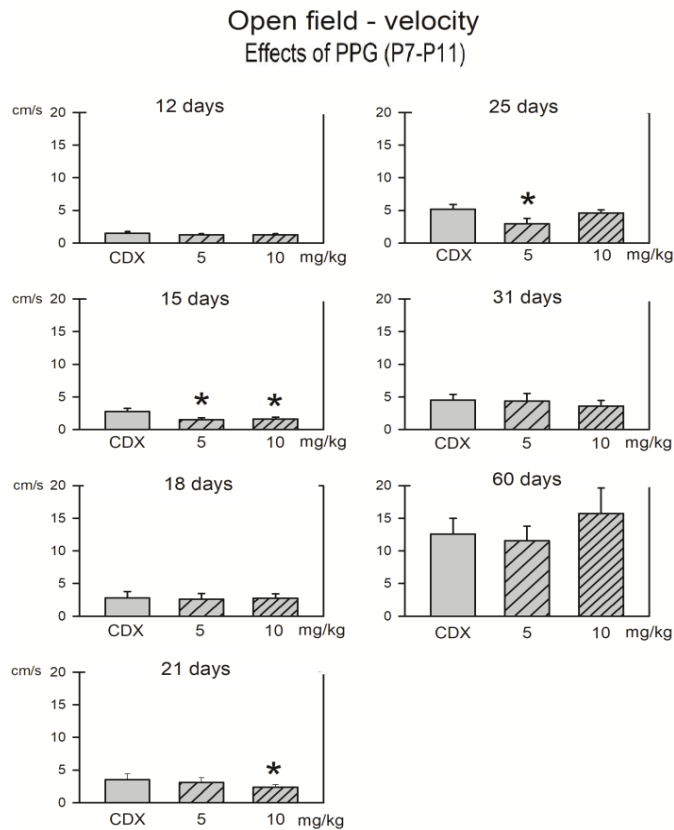
Graf 22: Sloupcové diagramy představující výsledky ušlé vzdálenosti z testu open field po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny jednotlivé věkové skupiny 12 až 60 denní a v každé jsou porovnány změny vzdálenosti v jednotlivých aplikovaných dávkách. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X znázorňuje ve všech případech tři aplikované dávky (mg/kg, ml/kg). Osa Y značí ušlou vzdálenost (mm). Hvězdička (*) značí vždy signifikantní změnu ušlé vzdálenosti oproti kontrolním skupinám.

Výsledky změn rychlosti chůze při open field testu z pohledu porovnání jednotlivých věkových změn ukázali postupné zvyšování rychlosti ve všech třech dávkových kategoriích, kdy signifikantní zvýšení bylo zaznamenáno u všech dávek 60 denních potkanů oproti ostatním věkovým kategoriím. Dále u kontrolní skupiny bylo zjištěno významné snížení rychlosti u 12 denních potkanů oproti všem ostatním věkovým skupinám. Po aplikaci PPG jak v dávce 5 mg/kg, tak i 10 mg/kg došlo k signifikantnímu snížení rychlosti chůze u 12 denních potkanů oproti 18 denním a starším (viz Graf 23).



Graf 23: Sloupcové diagramy představující výsledky rychlosti chůze z testu open field u 12 až 60 denní vývojové skupiny po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny tři aplikované koncentrace. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X značí jednotlivé věkové kategorie potkanů 12 až 60 denních (days). Osa Y znázorňuje ve všech případech rychlost chůze (cm/s). Hvězdička (*) značí signifikantní zvýšení rychlosti oproti všem ostatním věkovým skupinám. Křížek (#) značí snížení rychlosti oproti všem ostatním věkovým skupinám. Kolečko (O) značí signifikantní snížení rychlosti oproti 18 denním a starším potkanům.

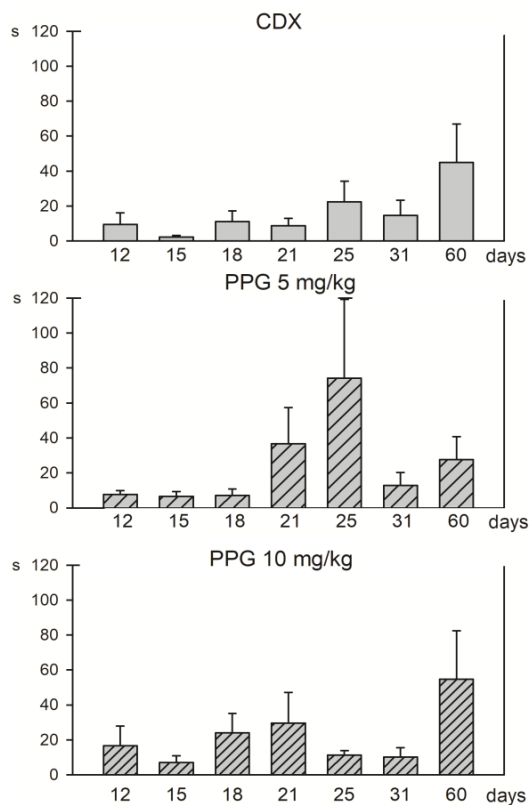
Porovnání rychlostí chůze po aplikaci tří dávek v jednotlivých věkových kategoriích ukazuje signifikantní změny u 15, 21 a 25 denních potkanů. U 15 denních došlo k významnému snížení rychlosti po aplikaci PPG v dávkách 5 a 10 mg/kg oproti kontrole. U 21 denních potkanů došlo k významnému snížení rychlosti po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg oproti kontrolní skupině. U 25 denních potkanů došlo po aplikaci 5 mg/kg k signifikantnímu snížení rychlosti oproti kontrolní skupině (viz Graf 24). I z tohoto grafu je patrné postupné zvyšování rychlosti chůze se zvyšujícím se věkem.



Graf 24: Sloupcové diagramy představující výsledky rychlosti chůze z testu open field po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny jednotlivé věkové skupiny 12 až 60 denní a v každé jsou porovnány změny rychlosti v jednotlivých aplikovaných dávkách. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X znázorňuje ve všech případech tři aplikované dávky (mg/kg, ml/kg). Osa Y značí rychlost chůze (cm/s). Hvězdička (*) značí vždy signifikantní změnu rychlosti chůze oproti kontrolním skupinám.

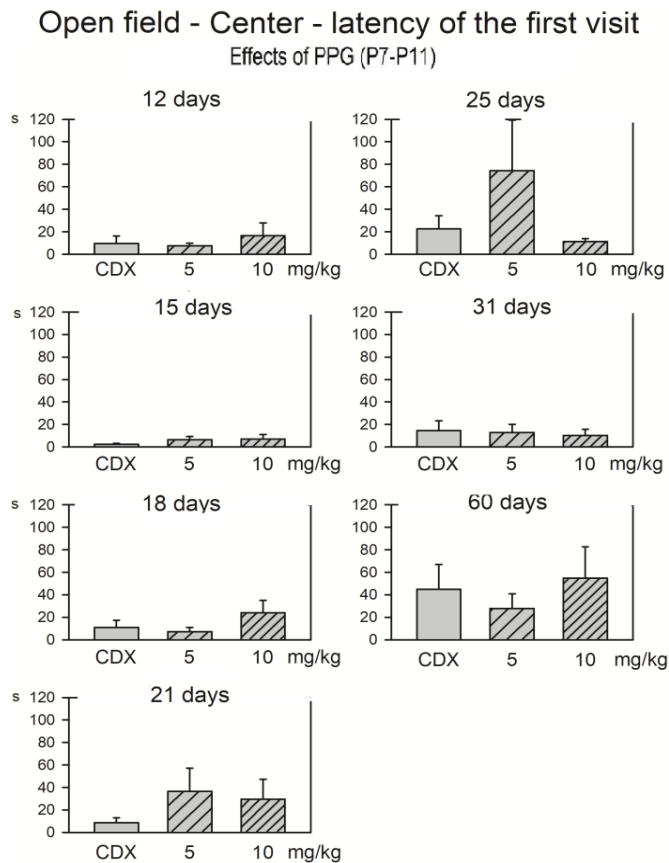
Zjišťovanými parametry ohledně středu open fieldu byly latence času, za který se do něj poprvé dostanou, kolikrát do něj došli a čas strávený ve středu open fieldu. Tato část testu spíše souvisí s vlivy na behaviorální chování, zejména vypovídá o míře anxiety.

Výsledky změn času latence prvního vstupu do středu open fieldu z pohledu porovnání jednotlivých věkových změn ukázali postupné mírné zvyšování času ve všech dávkových kategoriích (viz Graf 25). U kontrolní skupiny došlo u 15 denních potkanů ke snížení času latence oproti 12 denním. U 31 denních došlo ke snížení času latence oproti 25 denním a 60 denním potkanům. U skupiny s aplikací PPG v dávce 5 mg/kg došlo ke zvýšení času oproti ostatním vývojovým stádiím zejména u 21, 25 a 60 denních zvířat. U skupiny s aplikací PPG v dávce 10 mg/kg došlo ke zvýšení času latence u 18 a 21 denních potkanů oproti všem ostatním věkovým kategoriím s výjimkou 60 denních.

Open field - Center - latency of the first visit
Effects of PPG (P7-P11)

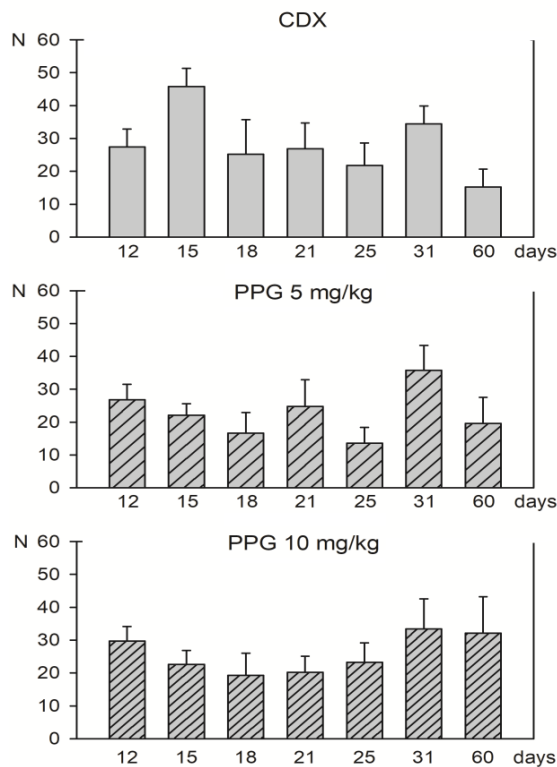
Graf 25: Sloupcové diagramy představující latenci času prvního dosažení středu open fieldu u 12 až 60 denní vývojové skupiny po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny tři aplikované koncentrace. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X ve všech případech značí jednotlivé věkové kategorie potkanů 12 až 60 denních (days). Osa Y znázorňuje ve všech čas (s), za který potkan poprvé došel do středu open fieldu. Žádné signifikantní změny zde nebyly zaznamenány.

Z porovnání změn po aplikaci tří různých dávek v jednotlivých věkových kategoriích se čas latence prvního vstupu do středu open fieldu postupně zvyšuje. Ovšem u 31 denních potkanů se čas latence snížil po aplikaci všech třech zadaných látek. Největší změna byla pozorována u 25 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg, kdy došlo ke zvýšení času latence oproti kontrolní skupině i dávce PPG 10 mg/kg (viz Graf 26).



Graf 26: Sloupcové diagramy představující výsledky latence času prvního dosažení středu open fieldu po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny jednotlivé věkové skupiny 12 až 60 denní a v každé jsou porovnány změny rychlosti v jednotlivých aplikovaných dávkách. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X znázorňuje ve všech případech tři aplikované dávky (mg/kg, ml/kg). Osa Y znázorňuje ve všech časech (s), za který potkan poprvé došel do středu open fieldu. Žádné signifikantní změny zde nebyly zaznamenány.

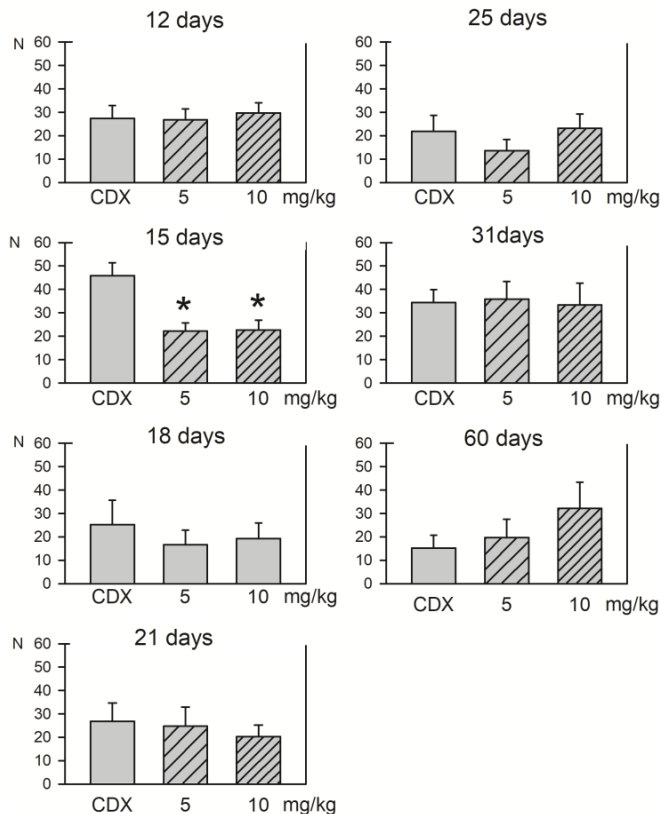
Z pohledu porovnání jednotlivých věkových změn, jsme zjistili, že u kontrolní skupiny došlo u 15 a 31 denních potkanů ke zvýšení frekvence vstupu do centra open fieldu oproti ostatním vývojovým skupinám. Naopak snížení frekvence jsme zaznamenali u 25 a 60 denních zvířat oproti ostatním. U skupiny s aplikací PPG v dávce 5 mg/kg jsme vyhodnotili snížení frekvence u 15, 18, 25 a 60 denních potkanů oproti ostatním. Největší frekvence překročení středu open fieldu byla zaznamenána u 31 denních zvířat. U skupiny s aplikací PPG v dávce 10 mg/kg jsme vyhodnotili snížení frekvence u 15, 18, 21 a 25 denních potkanů oproti ostatním. Ke zvýšení naopak došlo oproti ostatním u 31 a 60 denních zvířat (viz Graf 27).

Open field - center - frequency of visits
Effects of PPG (P7-P11)

Graf 27: Sloupcové diagramy představující frekvenci vstupů do středu open fieldu u 12 až 60 denní vývojové skupiny po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny tři aplikované koncentrace. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X ve všech případech značí jednotlivé věkové kategorie potkanů 12 až 60 denních (days). Osa Y znázorňuje ve všech počet vstupů do středu open fieldu (N). Žádné signifikantní změny zde nebyly zaznamenány.

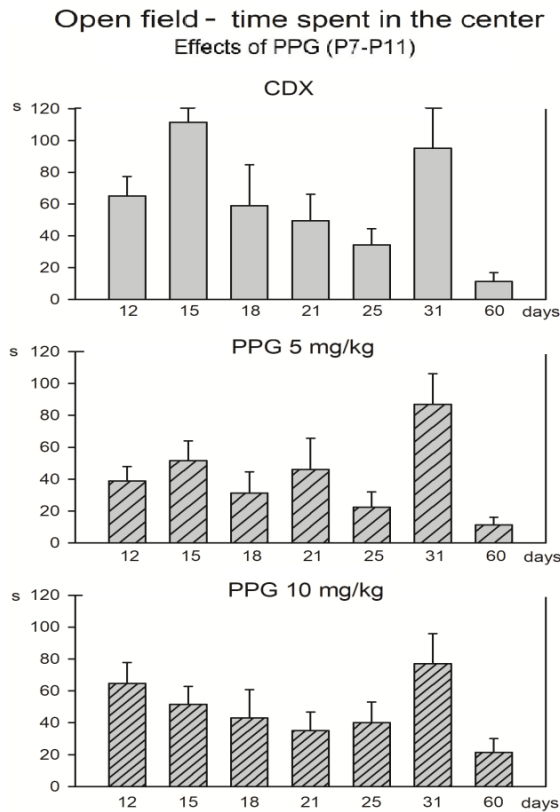
Frekvence vstupů do středu open fieldu byla po aplikaci tří dávek v jednotlivých věkových kategoriích signifikantně snížena zejména u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 a 10 mg/kg oproti kontrole (viz Graf 28).

Open field - center - frequency of visits Effects of PPG (P7-P11)



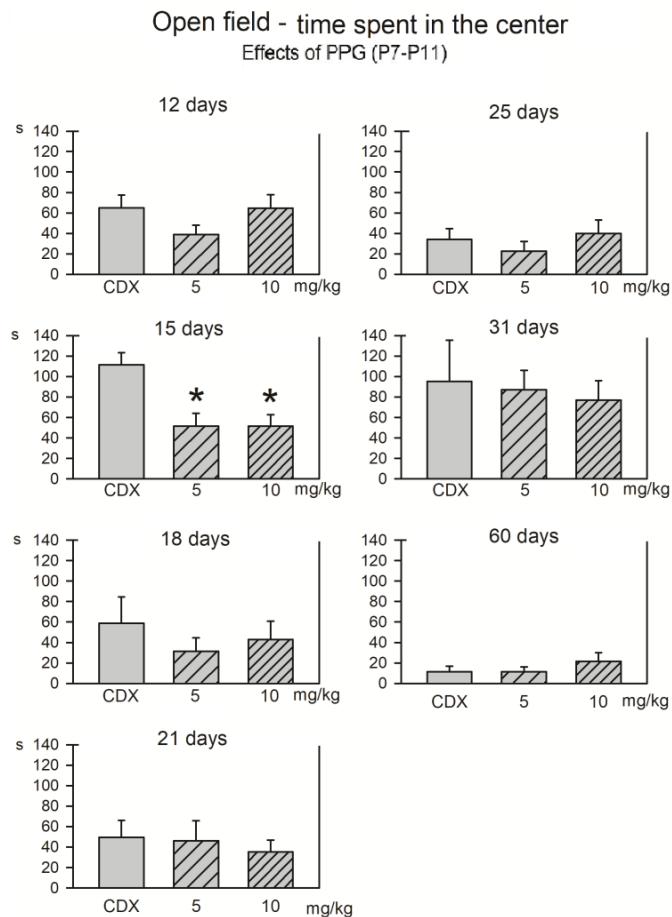
Graf 28: Sloupcové diagramy představující výsledky frekvence vstupů do středu open fieldu po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny jednotlivé věkové skupiny 12 až 60 denní a v každé jsou porovnány změny rychlosti v jednotlivých aplikovaných dávkách. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X znázorňuje ve všech případech tři aplikované dávky (mg/kg, ml/kg). Osa Y znázorňuje ve všech případech počet vstupů do středu open fieldu (N). Hvězdička (*) značí signifikantní snížení počtu vstupů do středu u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 a 10 mg/kg oproti kontrolní skupině.

U kontrolní skupiny došlo ke zvýšení času stráveného ve středu open fieldu u 15 a 31 denních zvířat oproti ostatním vývojovým stádiím. Od 18 denních potkanů došlo ke snížení času u 21 a 25 denních potkanů. Ke snížení také došlo u 60 denních potkanů vůči 31 denním. U skupiny s aplikací PPG v dávce 5 mg/kg jsme vyhodnotili zvýšení času stráveného ve středu u 31 denních potkanů oproti všem ostatním. Nejnižší čas ve středu byl zaznamenán u 60 denních zvířat. U skupiny s aplikací PPG v dávce 10 mg/kg jsme zjistili s postupujícím věkem ke snižování času stráveného ve středu, kromě skupiny 31 denních, kdy jejich čas byl vyšší než všech ostatních (viz Graf 29).



Graf 29: Sloupcové diagramy představující celkový čas strávený ve středu open fieldu u 12 až 60 denní vývojové skupiny po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny tři aplikované koncentrace. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X ve všech případech značí jednotlivé věkové kategorie potkanů 12 až 60 denních (days). Osa Y znázorňuje ve všech případech čas (s) strávený ve středu open fieldu. Žádné signifikantní změny zde nebyly zaznamenány.

Čas strávený v centru open fieldu byl po aplikaci tří dávek v jednotlivých věkových kategoriích signifikantně snížen u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v dávkách 5 a 10 mg/kg oproti kontrole (viz Graf 30).



Graf 30: Sloupcové diagramy představující výsledky celkového času stráveného ve středu open fieldu po dlouhodobém podání PPG – kdy jsou pod sebou znázorněny jednotlivé věkové skupiny 12 až 60 denní a v každé jsou porovnány změny rychlosti v jednotlivých aplikovaných dávkách. U kontrolní skupiny C bylo aplikováno CDX v množství 10 ml/kg. Ostatní dvě skupiny s aktivní látkou PPG v koncentracích 5 a 10 mg/kg. Osa X znázorňuje ve všech případech tři aplikované dávky (mg/kg, ml/kg). Osa Y znázorňuje ve všech případech čas (s) strávený ve středu open fieldu. Hvězdička (*) značí signifikantní snížení času stráveného ve středu u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 a 10 mg/kg oproti kontrolní skupině.

7.3 Výsledky hypotéz

Hodnocení hypotéz programem SigmaStat® (SYSTAT):

Hypotéza 1

H₀: byla zamítnuta, tj. motorika se v průběhu vývoje mění.

Hypotéza 2

H₀: byla zamítnuta, tj. motorika potkanů se po podání testované látky oproti kontrolní skupině signifikantně mění alespoň v jednom motorickém testu.

Hypotéza 3

H₀: byla ve většině případů potvrzena, našli jsme jen malé časové posuny, tj. opakované podání v časném vývojovém období ve většině případů neovlivní dlouhodobý vývoj motoriky potkanů.

Hypotéza 4

H₀: byla potvrzena, tj. testovaná látka signifikantně neovlivňuje krátkodobou ani dlouhodobou paměť.

8 DISKUZE

Při tvorbě rešerše k této diplomové práci jsem narazila na zajímavou problematiku v souvislosti s nejednotností názvosloví základních dvou skupin steroidních látek s vlivem na nervovou tkáň. Obecně je známé rozdělení na exogenní a endogenní steroidy, nebo na neuroaktivní steroidy a neurosteroidy, které sice mají podobné účinky, ale nejedná se o synonyma.

Termín neurosteroidy poprvé použil Baulieu v 80. letech 20. století k popisu endogenních steroidů syntetizovaných v CNS z cholesterolu nebo sterolových prekurzorů (Baulieu, 1997). Naopak po prokázání schopnosti jak exogenních tak i endogenních steroidů modulovat funkce nervového systému navrhl Paul a Prudy (1992) pro tyto látky termín neuroaktivní steroidy. Ten je ale v dnešní době připisování synteticky vytvořeným neurosteroidům (Dorda et al., 2001). Příkladem může být práce Morey et al. (2019) z USA, kde zkoumají možný pozitivní vliv hladiny neuroaktivních steroidů na šířku cerebrálního kortexu u válečných veteránů. Zde ovšem měřili koncentrace 7 neuroaktivních steroidů, jako například allopregnanolonu, pregnenolonu a progesteronu, kdy tyto látky se přirozeně vyskytují a tvoří v nervovém systému člověka, tudíž označení neuroaktivní steroidy je nesprávné a mělo by se mluvit o neurosteroidech.

Cílem práce bylo zjistit vliv vybraného neuroaktivního steroidu pregnanolonpyroglutamátu zejména na motoriku mláďat laboratorního potkana a možná implementace těchto výsledků na klinické využití a další testování. Toto testování nežádoucích účinků je důležité, protože při mapování několika desítek látek v FGÚ AV ČR byly prokázány antikonvulzivní účinky zejména u námi vybraného pregnanolonpyroglutamátu. Z interních výsledků FGÚ doposud vyplývá, že silnější antikonvulzivní účinek byl zaznamenán u záchvatů mláďat laboratorního potkana zatím na dvou modelech indukovaných pentylentetrazolem a transkorneální stimulací frekvencí 6 Hz. Zajímavostí je, že pregnanolonpyroglutamát je doposud jediným neuroaktivním steroidem, který byl testován v motorických testech u mláďat laboratorního potkana, stejně tak i v passive avoidance test.

ÚCHOB vzhledem k potenciálnímu kladnému antikonvulzivnímu efektu pregnanolonpyroglutamátu zadal také farmakokinetickou studii této látky. Z interních sdělení vyplývá relativně rychlý pokles hladin v plasmě, o něco pomalejší v mozku. To

přináší možnost využití spíše v akutních situacích, zejména pro status epilepticus. To by mohlo být předmětem dalšího testování.

Z našich dosavadních poznatků o této látce vyplývá, že přechodně po akutním podání a neadekvátní dávce látky vzhledem k věku a hmotnosti může dojít k lehkému ovlivnění motoriky, ale z dlouhodobého hlediska žádné negativní účinky z pohledu motoriky nezůstávají.

Zajímavý poznatek experimentu jsme objevili při testování chůze po pravidelném žebříku (který byl prováděn vždy před testem chůze po nepravidelném žebříku). Kdy jak u akutních tak dlouhodobých účinků pregnanolonpyroglutamátu jsme zjistili tendenci k tomu, že kontrolní skupina s aplikovaným cyklodextrinem má nižší procento zvířat, kteří došli až na konec žebříku, a naopak pregnanolonpyroglutamát toto procento zvyšuje. Což může například naznačovat vliv látky na motivaci, anxieta, nebo motoriku a potencionálně by mělo být dále prostudováno.

Vlivem neuroaktivních steroidů nebo neurosteroidů se v posledních letech zabývá čím dál více prací, což naznačuje zájem o zkoumání jejich vlivu na organismus a popřípadě jejich využití v klinické praxi.

Například práce Barker-Haliski et al. (2016) testovala vliv několika antiepileptik na motoriku potkanů po akutním podání. K účelu zjištění spontánní motoriky byl vybrán openfield test, kdy byla zvířata monitorována po dobu 10 minut. Výsledky ukázaly signifikantní snížení motorického chování při dávce TD50 například u Valproátu, Carbamazepinu a Fenobarbitalu. Zejména se zkrátila celková vzdálenost, kterou ušli a také stavění na zadní. To souhlasí s našimi výsledky akutních účinků PPG, kdy došlo k negativnímu ovlivnění motoriky zejména v testu open field, bar holding a i v testech chůze po žebřících.

Zajímavým experimentem je práce Snyder a Peeke (2001), kde zjišťují vliv neuroaktivních steroidů na GABA-A receptory a pokračují v práci, která zahrnovala efekt benzodiazepinu na motorickou aktivitu u humrů (*Homarus Americanus*). Aplikované aktivní látky byly rozpuštěny v oleji ze sójových bobů. Použity byly 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one (allopregnanolon, 3 α ,5 α - TH PROG) jako agonista GABA-A receptoru a pregnenolon sulfát (PREGS) jako antagonist. Kontrolní skupině byl podán pouze olej ze sójových bobů. Pro jednoduché testování lokomoce byl vytvořen aparát ponořený v tekoucí slané vodě podle klasického open fieldu používaného u obratlovců. Okraje byly vytvořeny z černého materiálu. Kruhovitý tvar zařízení snižoval možnost, že se humr stáhne do rohu jako do svého krytu. Předešlá práce demonstrovala,

že humři stráví nejvíce času po okrajích kruhové arény (což je totožné s chováním suchozemských laboratorních zvířat, jako například potkanů). Na začátku byl humr položen do středu zařízení a měřil se čas, za jak dlouho doleze ke stěně arény. Dále byla také měřena vzdálenost, kterou za dobu 18 minut testování humři urazili. Výsledkem bylo snížení motorické aktivity po podání $3\alpha,5\alpha$ -TH PROG, zatímco PREGS signifikantně zvýšil aktivitu v závislosti na dávce. Což naznačuje, že neuroaktivní steroidy ovlivňují podobné GABA receptory jak u korýšů, tak i u obratlovců a mají vliv na motorické chování.

Potenciální využití látek steroidní povahy s účinkem na CNS v klinické praxi je široké a potvrzené mnoha studii. Například v České republice se tématu neurosteroidů a neuroaktivních steroidů, a zejména vlivu těchto látek na paměť a učení věnuje například RNDr. Karel Valeš, PhD. V práci z roku 2011 testovali s kolegy $3\alpha,5\beta$ -pregnanolon glutamát, jakožto antagonistu NMDA receptorů. Jelikož NMDA receptory jsou jedny z nejrozšířenějších v CNS uvádí, že aplikace jejich antagonistů často vede k závažným vedlejším účinkům od zhoršení motoriky po indukci psychóz podobných schizofrenii. Výsledky ukázaly, že sledovaná látka nezvyšuje psychomimetické symptomy (jako hyperlokomoci a senzomotorický deficit), redukuje excitotoxické poškození mozkové tkáně a následné nežádoucí behaviorální změny u potkanů. Což přineslo možnost nového terapeutického využití dané látky pro léčbu onemocnění způsobených zvýšenou reakcí NMDA receptorů (Rambousek et al, 2011).

Dalším potenciálním vlivem těchto steroidních látek by mohl být podle přehledového článku Schüle et al. (2011) také na afektivní poruchy, jako deprese a anxiety. Během deprese se zvyšuje koncentrace steroidních látek, jako například $3\beta,5\alpha$ -tetrahydroprogesteronu, které mohou působit jako antagonisté GABA-ergních steroidů. Některá antidepresiva poté mají vliv na enzymy klíčové pro neurosteroidogenezi a normalizují nerovnováhu neurosteroidů. Dalším důležitým prvkem v této problematice je translokátorový protein (TSPO). Ligandy TSPO zvyšují neurosteroidogenezi a jsou možným zdrojem pro vytvoření nových anxiolytických léků, které by nezpůsobovaly vedlejších účinky, jenž se normálně vyskytují při užití například benzodiazepinů, jako sedace a vznik tolerance.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit vliv nově syntetizovaného neuroaktivního steroidu pregnanolonpyroglutamátu (PPG) na motoriku mláďat laboratorního potkana. Testování probíhalo ve dvou fázích.

Nejdříve jsme se zaměřili na sledování motoriky laboratorního potkana po akutním podání pregnanolonpyroglutamátu.

Při hodnocení surface righting testu bylo zjištěno zvýšení času pro otočení ze zad na břicho pouze u 12 denních potkanů, zejména u dávek 5 mg/kg (6 z 10) a 10 mg/kg (7 z 10) oproti kontrolní skupině.

Bar holding test neprokázal žádné významné změny. Pouze je z grafu patrné postupné zvyšování času pro udržení na hrazdě se zvyšujícím se vývojovým věkem potkanů. Od 18. dne jsme zaznamenali, že někteří potkani vylezli na hrazdu.

Test negative geotaxis provedený pouze u 12 denních potkanů prokázal signifikantní zvýšení času oproti kontrolní skupině po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg.

Z grafu wire mesh ascending testu vyplývá, že se doba pro vylezení na plošinu oproti kontrole signifikantně snížila po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg.

Chůze po pravidelném a nepravidelném horizontálním žebříku testovaná u 18 a 25 denních potkanů neprokázala žádné významné změny v čase ani chybovosti. Pouze je z grafů patrné, že u 18 denních jsou jak čas, tak chybovost průměrně vyšší, než u 25 denních. U 25 denních potkanů jsme při chůzi po pravidelném žebříku pozorovali s narůstající dávkou PPG dokonce postupné snižování času pro dokončení testu. Také jsme u této věkové kategorie zaregistrovali při chůzi po nepravidelném žebříku postupné zvyšování počtu provedených chyb oproti kontrole.

Open field test byl proveden u všech třech věkových kategorií. Hodnocena byla latence prvního vstupu do středu, frekvence vstupů, čas strávený ve středu, ušlá vzdálenost a rychlost chůze v open fieldu. V každé věkové kategorii byly zaznamenány určité významné změny. U 12 denních potkanů bylo zaznamenáno signifikantní snížení frekvence vstupů do středu open fieldu oproti kontrole po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg. V této věkové kategorii došlo také ke zvýšení ušlé vzdálenosti po aplikaci PPG v dávkách 1 a 5 mg/kg oproti dávce 10 mg/kg. Z pohledu rychlosti došlo ke zvýšení po aplikaci PPG v dávkách 1 a 5 mg/kg oproti dávce 10 mg/kg.

U 18 denních potkanů bylo zjištěno významné snížení frekvence vstupů do středu open fieldu oproti kontrole a zároveň oproti dávce PPG 1 mg/kg po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg. Dále také došlo ke snížení ušlé vzdálenosti po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg oproti kontrole a také bylo zaznamenáno zvýšení ušlé vzdálenosti po aplikaci PPG v dávce 1 mg/kg oproti dávám 5 a 10 mg/kg. Rychlost chůze byla snížena po aplikaci PPG 10 mg/kg oproti kontrole a zároveň došlo ke zvýšení rychlosti chůze po aplikaci PPG v dávce 1 mg/kg oproti dávám 5 a 10 mg/kg.

U 25 denních potkanů bylo zaznamenáno snížení času prvního vstupu do středu open fieldu oproti kontrole po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg. Dále také došlo k signifikantnímu zvýšení frekvence vstupů do středu open fieldu oproti kontrole po aplikaci PPG u dávek 5 a 10 mg/kg a ke zvýšení došlo také po aplikaci PPG 5 mg/kg oproti dávce PPG 1 mg/kg. Významně se také zvýšil čas strávený v centru open fieldu oproti kontrolní skupině u všech třech aplikovaných dávek PPG (1, 5 a 10 mg/kg). Zvýšení ušlé vzdálenosti bylo zaznamenáno po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg oproti kontrolní skupině a dávce 1 mg/kg. Zvýšení rychlosti u této věkové skupiny bylo zjištěno po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg oproti kontrole a dávám 1 a 10 mg/kg.

Další testování bylo zaměřeno na změny motoriky po dlouhodobé aplikaci pregnanolonpyroglutamátu.

Při vyšetření surface righting testu nebyly zjištěny žádné změny po aplikaci PPG.

Z hodnocení bar holding testu vyplývá, že po aplikaci PPG nedošlo k žádným signifikantním změnám. V grafu nebyly zaznamenány výsledky 60 denních potkanů, protože ti se snažili z hrazdy spíše aktivně slézt. Tuto skutečnost přisuzují spíše vyššímu vývojovému stadiu. Můžeme ale pozorovat postupné zvyšování doby udržení na hrazdě s postupujícím věkem a obě dvě dávkové kategorie PPG vykazovaly průměrně vyšší čas pro udržení na hrazdě oproti kontrolní skupině. Od 18. dne jsme zaznamenávali, zda potkan vyleze na hrazdu, kdy v této skupině šlo o 2 potkany z 21. U 21 denních potkanů vylezlo na hrazdu 10 z 21 zvířat. U 25 denních se jedná o 11 z 21 potkanů a u 31 denních 7 z 21 zvířat.

Z hodnocení negative geotaxis testu provedeného u 12 a 15 denních potkanů nedošlo k prokázání žádných signifikantních změn. Čas pro otočení kontrolní skupiny u obou věkových kategorií byl vždy nižší nebo stejný, než po aplikaci dávek PPG. U 15 denních potkanů došlo průměrně ke snížení času ve všech aplikovaných dávkách oproti 12 denním.

Signifikantní změna u wire mesh ascending testu byla zaznamenána u 15 denních potkanů, kdy došlo ke snížení času pro vylezení na plošinu po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg oproti kontrole a zároveň oproti 12 denním potkanům.

Z hodnocení chůze po pravidelném žebříku jsme zaznamenali signifikantní zvýšení počtu chyb u 21 denních potkanů oproti kontrole. V porovnání jednotlivých dávek vyšlo signifikantní snížení počtu chyb kontrolní skupiny u 21, 25, 31 a 60 denních potkanů oproti 18 denním. U skupiny s PPG 5 a 10 mg/kg došlo k signifikantnímu snížení chybovosti u 25, 31 a 60 denních potkanů oproti 18 denním. Zároveň také se zvyšujícím se věkem dochází obecně ke snížení chybovosti. Čas k dokončení testu se téměř neměnil. Zajímavým poznatkem je, že u 18, 21 a 60 denních potkanů ani polovina nedošla na konec žebříku po aplikaci všech dávek.

Z hodnocení chůze po nepravidelném žebříku vychází signifikantní snížení v chybovosti při chůzi po žebříku po aplikaci PPG v dávkách 5 a 10 mg/kg u 21 a 60 denních potkanů oproti 18 denním potkanům. Chybovost se průměrně se zvyšujícím se věkem snižuje. Čas pro dokončení testu se téměř neměnil. Zajímavým poznatkem je, že u 18, 21 a 60 denních potkanů ani polovina z nich nedošla na konec žebříku po aplikaci všech dávek.

Passive avoidance test prokázal, že po dlouhodobé aplikaci nedochází k ovlivnění jak krátkodobé, tak i dlouhodobé paměti.

Orientačně provedený jumping down with choice test u 31 denních potkanů udává, že 3 z 8 potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 i 10 mg/kg a 2 z 5 po aplikaci CDX nesplnili zadaný úkol.

Oproti kontrolní skupině došlo v testu open field v průměru k mírnému snížení ušlé celkové vzdálenosti u obou skupin s dávkami PPG. Zajímavým poznatkem je, že ve všech třech dávkových skupinách došlo ke snížení počtu ušlých milimetrů u 25 a 31 denních potkanů. Průměrně nejdelší vzdálenost byla ušlá u 21 a 60 denních. Signifikantní snížení ušlé vzdálenosti bylo zaznamenáno u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 a 10 mg/kg oproti kontrole a také u 25 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg oproti kontrole.

Rychlost chůze v open fieldu byla signifikantně vyšší u 60 denních potkanů ve všech třech dávkových kategoriích. U kontrolní skupiny potom také bylo zjištěno významné snížení rychlosti oproti ostatní vývojovým stádiím. U skupiny s aplikací PPG v dávce 5 a 10 mg/kg došlo u 12 denních potkanů ke snížení rychlosti oproti 18 denním a starším potkanům. Signifikance ohledně snížení rychlosti byly také zaznamenány u 15

denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 a 10 mg/kg oproti kontrole. Dále taktéž u 21 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 10 mg/kg oproti kontrole a u 25 denních po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg oproti kontrole.

Čas latence vstupu do středu open fieldu byl nejvyšší po aplikaci PPG v dávce 5 mg/kg u 21 a 25 denních potkanů oproti všem ostatním. Zajímavé je, že u 31 denních potkanů došlo ke snížení času latence po všech aplikovaných dávkách.

Frekvence vstupu do středu open fieldu se v jednotlivých dávkách vlivem věku zásadně nemění. Ovšem signifikantní snížení frekvence vstupu do středu jsme vyhodnotili u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 a 10 mg/kg oproti kontrole.

Celkový čas strávený ve středu open fieldu je nejvíce zvýšen oproti ostatním věkovým skupinám u 15 a 31 denních potkanů ve skupině kontrolní. 31 denní potkani vykazují nejdelší čas strávený ve středu open fieldu ve všech třech dávkových skupinách. Nejnížší čas ve všech třech dávkových skupinách jsme naopak zaznamenali u 60 denních potkanů. Signifikantní snížení času ve středu open fieldu byl vyhodnocen u 15 denních potkanů po aplikaci PPG v dávce 5 a 10 mg/kg oproti kontrole.

Tato studie potvrzuje, že po podání pregnanolonpyroglutamátu nedochází z dlouhodobého hlediska k ovlivnění motorických schopností. Zároveň by se mohlo předpokládat, že by po podání nemělo dojít k ovlivnění krátkodobé a dlouhodobé paměti. Další testování by mělo být zaměřeno na vliv této látky například na kognitivní funkce nebo na motivaci. Z farmakokinetických vlastností této látky vyplývá možnost využití pro pacienty se status epilepticus, což je dalším bodem v navazujícím zkoumání.

Možnost účastnit se tohoto experimentu a zjištění, kolik práce a úsilí se skrývá za vývojem nových léčiv, pro mne byla velmi inspirativní a donutila mne více nad touto problematikou přemýšlet. Vědecká práce obnáší mnoho úskalí a velice si díky této zkušenosti pracovníků ve výzkumu vážím. Myslím si, že právě i z pohledu fyzioterapie je potřeba u pacientů zejména s chronickou farmakoterapií dobře znát užívané léky a jejich možné vedlejší účinky.

REFERENČNÍ SEZNAM

ALTMAN, J. a K. SUDARSHAN. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour* [online]. 1975, **23**, 896-920 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/0003-3472(75)90114-1. ISSN 00033472. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003347275901141>

BACA, Ch. B., B. G. VICKERY a et al. Psychiatric and medical comorbidity and quality of life outcomes in childhood-onset epilepsy. *Pediatrics*. 2011, **128**(6), p. 1532-1543.

BARKER-HALISKI, M. L., F. VANEGAS, M. J. MAU, T. K. UNDERWOOD a H. S. WHITE. Acute cognitive impact of antiseizure drugs in naive rodents and corneal-kindled mice. *Epilepsia*. 2016, **57**(9), 1386-1397. DOI: 10.1111/epi.13476. ISSN 00139580. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/epi.13476>

BAULIEU, E-E, P. ROBEL a M. SCHUMACHER. *Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system*. Totowa, N.J.: Humana Press, c1999. Contemporary endocrinology (Totowa, N.J.), 21. ISBN 08-960-3545-X.

BAULIEU, E. E. Neurosteroids: Of the Nervous System, by the Nervous System, for the Nervous System. Recent Progress in Hormone Research. 1997, 52, 1-32 p.. ISSN 00799963.

BIČÍKOVÁ, M. a R. HAMPL. Neurosteroidy a jejich význam. *Časopis lékařů českých*. 2007, **146**(3), p. 223-226. ISSN 0008-7335.

BIRCH, P. J., C. J. GROSSMAN, A. G. HAYES, T. PRIESTLEY, R. TRIDGETT, L. L. IVERSEN a G. N. WOODRUFF. Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *European Journal of Pharmacology*. 1988, **154**(1), 85-87. DOI: 10.1016/0014-2999(88)90367-6. ISSN 00142999. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299988903676>

BOLLES, R. C. a P. J. WOODS. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Animal Behaviour*. 1964, **12**(4), 427-441. DOI: 10.1016/0003-3472(64)90062-4. ISSN 00033472. Dostupné také z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003347264900624>

BRODIE, M. J., S. C. SCHACHTER a P. KWAN. *Fast facts: Epilepsy*. Third edition. Oxford: Health press, 2005. ISBN 1-903734-30-4.

CARVER, Ch. M. a D. S. REDDY. Neurosteroid interactions with synaptic and extrasynaptic GABAA receptors: regulation of subunit plasticity, phasic and tonic inhibition, and neuronal network excitability. *Psychopharmacology* [online]. 2013, **230**(2), 151-188 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1007/s00213-013-3276-5. ISSN 0033-3158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-013-3276-5>

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

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017398000241>

DHIR, A. a K. CHOPRA. On the anticonvulsant effect of allopregnanolone (a neurosteroid) in neonatal rats. *Life Sciences*. 2015, **143**, 202-208. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.09.008. ISSN 00243205. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320515300126>

DORDA, M. a et al. Neurosteroidy - mechanismus působení a možnost užití v klinické praxi. *Psychiatrie: Časopis pro moderní psychiatrii*. 2001, **5**(Supplementum 3), p. 5-9. ISSN 1212-6845.

FARRANT, M. a K. KAILA. The cellular, molecular and ionic basis of GABAA receptor signalling. *Gaba and the Basal Ganglia - From Molecules to Systems* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 59-87 [cit. 2020-04-01]. Progress in Brain Research. DOI: 10.1016/S0079-6123(06)60005-8. ISBN 9780444521842. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079612306600058>

FISHER, R. S., C. ACEVEDO, A. ARZIMANOGLU a et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014, **55**(4), 475-482.

GRAMSBERGEN, A. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [online]. 1998, **22**(4), 547-553 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/S0149-7634(97)00043-2. ISSN 01497634. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763497000432>

HAMMOND, R. S., A. L. ALTHAUS, M. A. ACKLEY, C. MACIAG, G. MARTINEZ BOTELLA, F. G. SALITURO, A. J. ROBICHAUD a J. J. DOHERTY. Anticonvulsant profile of the neuroactive steroid, SGE-516, in animal models. *Epilepsy Research*. 2017, **134**, 16-25. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2017.05.001. ISSN 09201211. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121116302637>

JACOBSON, M. *Developmental Neurobiology*. 1991. DOI: 10.1007/978-1-4757-4954-0.

JAMON, M. The early development of motor control in neonate rat. *Comptes Rendus Palevol* [online]. 2006, **5**(3-4), 657-666 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/j.crpv.2005.11.018. ISSN 16310683. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1631068305001880>

KEMP, J. A., A. C. FOSTER, P. D. LEESON, T. PRIESTLEY, R. TRIDGETT, L. L. IVERSEN a G. N. WOODRUFF. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988, **85**(17), 6547-6550. DOI: 10.1073/pnas.85.17.6547. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.85.17.6547>

KING, S. R. *Neurosteroids and the nervous system*. New York: Springer, c2013. SpringerBriefs in neuroscience. ISBN 978-1-4614-5558-5.

KLETEČKOVÁ, L., G. TSENOV, H. KUBOVÁ, A. STUHLÍK a K. VALEŠ. Neuroprotective effect of the 3 α 5 β -pregnanolone glutamate treatment in the model of focal cerebral ischemia in immature rats. *Neuroscience Letters*. 2014, **564**(11), 11-15. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.01.057. ISSN 03043940. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394014000925>

- KNYTL, P. a P. MOHR. Neuroaktivní steroidy, neurosteroidy a jejich úloha ve schizofrenii. *Psychiatrie: Časopis pro moderní psychiatrii*. 2016, **20**(3), p. 139-146. ISSN 1212-6845.
- KOMÁREK, V. Dětská epileptologie. *Neurologie pro praxi*. 2003, **4**(4), p. 171.
- MAREŠ, P., A. MIKULECKÁ, R. HAUGVICOVÁ a A. KASAL. Anticonvulsant action of allopregnanolone in immature rats. *Epilepsy Research* [online]. 2006, **70**(2), 110-117 [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2006.03.009. ISSN 09201211.
- MOREY, R. A., S. L. DAVIS, C. C. HASWELL, et al. Widespread Cortical Thickness Is Associated With Neuroactive Steroid Levels. *Frontiers in Neuroscience*. 2019, **13**. DOI: 10.3389/fnins.2019.01118. ISSN 1662-453X. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2019.01118/full>
- OLEJŠKOVÁ, H. Epilepsie a její léčba. *Praktické lékarenství*. 2008, **4**(2), 55-59. ISSN 1803-5329.
- PAUL, S. M. a R. H. PURDY. Neuroactive steroids. *The FASEB Journal*. 1992, **6**(6), 2311-2322. DOI: 10.1096/fasebj.6.6.1347506. ISSN 0892-6638. Dostupné také z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.6.6.1347506>
- PELLOCK, J. M., D. R. NORDLI a J. W. WHELESS. Pellock's pediatric epilepsy: diagnosis and therapy. 2017. ISBN 9781620700730.
- RAMBOUSEK, L., V. BUBENIKOVA-VALESOVA, P. KACER, et al. Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor 3 α 5 β -pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology*. 2011, **61**(1-2), 61-68. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.02.018. ISSN 00283908. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390811000888>
- RATNER, M. H., V. KUMARESAN a D. H. FARB. Neurosteroid Actions in Memory and Neurologic/Neuropsychiatric Disorders. *Frontiers in Endocrinology*. 2019, **10**. DOI: 10.3389/fendo.2019.00169. ISSN 1664-2392. Dostupné také z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00169/full>
- REDDY, D. S. Neurosteroids. *Sex Differences in the Human Brain, their Underpinnings and Implications*. Elsevier, 2010, 113-137. Progress in Brain Research. DOI:

10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7. ISBN 9780444536303. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444536303000087>

RHO, J. M. a R. SANKAR. The Pharmacologic Basis of Antiepileptic Drug Action. *Epilepsia*. 1999, **40**(11), 1471-1483. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb02029.x. ISSN 0013-9580. Dostupné také z:
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1528-1157.1999.tb02029.x>

RITSNER, M. S. a A. WEIZMAN. *Neuroactive steroids in brain function, behavior, and neuropsychiatric disorders: novel strategies for research and treatment*. London: Springer, c2008. ISBN 14-020-6853-0.

SHAROPOV, S., P. WINKLER, R. UEHARA, A. LOMBARDI, L. HALBHUBER, A. OKABE, H. J. LUHMANN a W. KILB. Allopregnanolone augments epileptiform activity of an in-vitro mouse hippocampal preparation in the first postnatal week. *Epilepsy Research*. 2019, **157**. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2019.106196. ISSN 09201211. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0920121119302918>

SCHÜLE, C., D. ESER, T.C. BAGHAI, C. NOTHDURFTER, J.S. KESSLER a R. RUPPRECHT. Neuroactive steroids in affective disorders: target for novel antidepressant or anxiolytic drugs? *Neuroscience*. 2011, **191**, 55-77. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.025. ISSN 03064522. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452211002831>

STAFSTROM, C. E., J. L. THOMPSON a G. L. HOLMES. Kainic acid seizures in the developing brain: status epilepticus and spontaneous recurrent seizures. *Developmental Brain Research*. 1992, **65**(2), 227-236. DOI: 10.1016/0165-3806(92)90184-X. ISSN 01653806. Dostupné také z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016538069290184X>

STÁRKA, L. a M. DUŠKOVÁ. Allopregnanolon – neurosteroid s nadějnými léčebnými výhledy. *Diabetologie - Metabolismus - Endokrinologie - Výživa*. 2015, **18**(1), p. 24-30. ISSN 1211-9326.

SUCKOW, M. A., S. H. WEISBROTH a C. L. FRANKLIN. *The laboratory rat*. 2006. ISBN 0120749033.

SNYDER, M. J. a H. V. S. PEEKE. Neuroactive steroids modulate crustacean locomotor activity. *Neuroscience Letters*. 2001, **313**(1-2), 65-68. DOI: 10.1016/S0304-3940(01)02257-1. ISSN 03043940. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394001022571>

SÝKORA, P. Liečba epilepsie a epileptických syndrómov u detí. *Neurologie pro praxi*. 2015, **16**(2), p. 74-6.

VINAY, L., F. BEN-MABROUK, F. BROCARD, F. CLARAC, C. JEAN-XAVIER, E. PEARLSTEIN a J-F. PFLIEGER. Perinatal Development of the Motor Systems Involved in Postural Control. *Neural Plasticity* [online]. 2005, **12**(2-3), 131-139 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1155/NP.2005.131. ISSN 2090-5904. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/np/2005/984010/abs/>

VINAY, L., F. BROCARD, F. CLARAC, J-Ch. NORREEL, E. PEARLSTEIN a J-F. PFLIEGER. Development of posture and locomotion: an interplay of endogenously generated activities and neurotrophic actions by descending pathways. *Brain Research Reviews* [online]. 2002, **40**(1-3), 118-129 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/S0165-0173(02)00195-9. ISSN 01650173. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017302001959>

VOJTA, V. a A. PETERS. *Vojtův princip: svalové souhry v reflexní lokomoci a motorická ontogeneze*. Vyd. 1. čes. Praha: Grada, 1995. ISBN 80-716-9004-x.

ZHENG, P. Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: Action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology*. 2009, **89**(2), 134-152. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.07.001. ISSN 03010082. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008209000975>.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Zjednodušené znázornění steroidogeneze (Knytl, 2016)	15
Obrázek 2: Struktura allopregnanolonu (Dorda, 2001)	19
Obrázek 3: Vztah mezi vývojem člověka a potkana (Vinay et al., 2005)	23
Obrázek 4: Ontogenze ucha a sluchového orgánu od prenatálního období (Vinay et al. 2005)	28
Obrázek 5: Open field test (archiv autorky)	32
Obrázek 6: Bar holding test (archiv autorky)	33
Obrázek 7: Test chůze po horizontálním žebříku (archiv autorky)	34
Obrázek 8: Passive avoidance test (archiv autorky)	35
Obrázek 9: Jumping down with choice test (archiv autorky)	36

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Výsledky bar holding testu po akutním podání.....	39
Graf 2: Výsledky negative geotaxis testu po akutním podání.....	40
Graf 3: Výsledky wire mesh ascending testu po akutním podání.....	41
Graf 4: Výsledky testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku po akutním podání (čas a počet chyb).....	42
Graf 5: Výsledky testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku po akutním podání (čas a počet chyb).....	43
Graf 6: Výsledky open field testu po akutním podání (latence, frekvence vstupu a čas strávený ve středu).....	45
Graf 7: Výsledky open field testu po akutním podání (vzdálenost a rychlost).....	46
Graf 8: Výsledky bar holding testu po dlouhodobém podání (závislost věku na čase)..	48
Graf 9: Výsledky bar holding testu po dlouhodobém podání (závislost dávky na čase).	48
Graf 10: Výsledky negative geotaxis testu po dlouhodobém podání	49
Graf 11: Výsledky wire mesh ascending testu po dlouhodobém podání (závislost věku na čase).....	50
Graf 12: Výsledky wire mesh ascending testu po dlouhodobém podání (závislost dávky na čase).....	51
Graf 13: Výsledky testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku po dlouhodobém podání (závislost věku na čase a počtu chyb).....	52
Graf 14: Výsledky testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku po dlouhodobém podání (závislost dávky na čase a počtu chyb).....	53
Graf 15: Procentuální zastoupení potkanů, kteří přešli celý pravidelný horizontální žebřík po dlouhodobém podání.....	54
Graf 16: Výsledky testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku po dlouhodobém podání (závislost věku na čase a počtu chyb).....	55
Graf 17: Výsledky testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku po dlouhodobém podání (závislost dávky na čase a počtu chyb).....	56
Graf 18: Procentuální zastoupení potkanů, kteří přešli celý nepravidelný horizontální žebřík po dlouhodobém podání.....	57
Graf 19: Výsledky testu jumping down with choice u 31 denních potkanů po dlouhodobém podání.....	58
Graf 20: Výsledky testu passive avoidance po dlouhodobém podání	59
Graf 21: Výsledky ušlé vzdálenosti v open fieldu po dlouhodobém podání (závislost věku na vzdálenosti)	60
Graf 22: Výsledky ušlé vzdálenosti v open fieldu po dlouhodobém podání (závislost dávky na vzdálenosti)	61
Graf 23: Výsledky rychlosti chůze v open fieldu po dlouhodobém podání (závislost věku na rychlosti).....	62
Graf 24: Výsledky rychlosti chůze v open fieldu po dlouhodobém podání (závislost dávky na rychlosti).....	63
Graf 25: Výsledky latence času prvního vstupu do středu open fieldu (závislost věku na čase)	64
Graf 26: Výsledky latence času prvního vstupu do středu open fieldu (závislost dávky na čase).....	65
Graf 27: Výsledky počtu frekvence vstupu do středu open fieldu (závislost věku na počtu vstupů).....	66
Graf 28: Výsledky počtu frekvence vstupu do středu open fieldu (závislost dávky na počtu vstupů).....	67

Graf 29: Výsledky celkového času stráveného v cetru open fieldu (závislost věku na čase)	68
Graf 30: Výsledky celkového času stráveného v cetru open fieldu (závislost dávky na čase).	69