

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Zdeněk Laštůvka

STUDIUM MECHANIZMŮ VZNIKU A ROZVOJE PERINATÁLNÍ HYPOXIE

PERINATAL HYPOXIA: MECHANISMS AND ETIOLOGY

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Vladimír Riljak, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 30.5.2022

MUDr. Zdeněk Laštůvka

Podpis

Poděkování:

Děkuji svému školiteli doc. MUDr. Vladimíru Riljakovi, Ph.D. za možnost studovat pod jeho vedením, za úsilí, které věnoval mé přípravě již během studia pregraduálního, cenné rady, konzultace, a především za trpělivost a snahu mi pomoci nejen při řešení mé disertační práce, ale také po celou dobu mého doktorského studia. Děkuji také za veškeré podněty, kterými obohatil mé odborné publikace, prezentace a také tuto disertační práci.

Dále bych rád poděkoval Ing. Kateřině Janišové za pomoc a ochotu při provádění experimentů v laboratoři, MUDr. Kateřině Jandové, Ph.D. za mnoho cenných rad, které mi věnovala, prof. MUDr. Jaromíru Myslivečkovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Borbélyové, Ph.D. za korektury odborných textů a prof. MUDr. Jakubu Otáhalovi, Ph.D. za velmi cenné připomínky v průběhu studia a vstřícný přístup. Velké poděkování za trpělivost a nekončící podporu patří také celé mé rodině.

Identifikační záznam:

LAŠTŮVKA, Zdeněk. *Studium mechanismů vzniku a rozvoje perinatální hypoxie*. [Perinatal hypoxia: mechanisms and etiology]. Praha, 2022. 84 s., 0 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Fyziologický ústav 1. LF UK. Školitel Riljak, Vladimír.

OBSAH

ABSTRAKT	7
ABSTRACT	8
SEZNAM ZKRATEK	9
1 ÚVOD	11
1.1 HYPOXIE	11
1.1.1 <i>Vymezení pojmů</i>	11
1.1.2 <i>Klasifikace hypoxie</i>	11
1.1.3 <i>Hypoxie a mozek</i>	12
1.1.3.1 Kompenzační schopnost nervové tkáně	12
1.1.3.2 Adaptabilita nezralého mozku	12
1.1.3.3 Neuroplasticita	13
1.1.3.4 Mechanismus poškození hypoxií na buněčné úrovni	14
1.1.3.5 Excitotoxicita jako mechanismus hypoxicko-ischemického poškození	16
1.1.3.5.1 Klasická excitotoxicita	16
1.1.3.5.2 Pomalá excitotoxicita.....	18
1.1.3.6 Pohlavně vázané změny v reakci na hypoxii	19
1.2 PERINATÁLNÍ HYPOXIE	21
1.2.1 <i>Etiologie perinatální hypoxie</i>	21
1.2.2 <i>Důsledky perinatální hypoxie</i>	22
1.2.3 <i>Diagnostická kritéria</i>	23
1.2.3.1 Klinická symptomatologie	23
1.2.3.2 Laboratorní vyšetření	24
1.2.3.3 Zobrazovací metody.....	25
1.2.4 <i>Současné terapeutické možnosti</i>	26
1.3 ZVÍŘECÍ MODELY PERINATÁLNÍ HYPOXIE.....	27
1.3.1 <i>Ontogeneze laboratorní myši ve srovnání s člověkem</i>	28
1.3.1.1 Obecné poznatky.....	28
1.3.1.2 Embryonální a postnatální vývoj myši	28
1.3.1.3 Senzorické systémy	29
1.3.1.4 Motorické systémy.....	29
1.3.1.4.1 Vývoj descendentních drah	30
1.3.1.4.2 Lokomoční aktivita.....	30
1.3.1.4.3 Vývoj postury	32
1.3.1.5 Porovnání motorického vývoje s člověkem	33
1.3.2 <i>Historický vývoj zvířecích modelů</i>	34
1.3.3 <i>Morfologické ukazatele poškození mozku</i>	36
1.3.4 <i>Behaviorální testování – test otevřeného pole</i>	37

2	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	40
2.1	HYPOTÉZY	40
2.2	CÍLE PRÁCE	40
3	METODIKA	41
3.1	POKUSNÁ ZVÍŘATA	41
3.2	EXPOZICE HYPOXICKO-ISCHEMICKÉMU POŠKOZENÍ MOZKU.....	41
3.2.1	<i>Podvaz společné krkavice</i>	<i>42</i>
3.2.2	<i>Expozice hypoxickému prostředí.....</i>	<i>42</i>
3.3	ANALÝZA CHOVÁNÍ – TEST V OTEVŘENÉM POLI	43
3.4	PERFUZE A HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ TKÁNĚ	43
3.4.1	<i>Nisslovo barvení.....</i>	<i>43</i>
3.5	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	44
4	VÝSLEDKY.....	45
4.1	ANALÝZA CHOVÁNÍ	45
4.1.1	<i>Doba strávená pohybem (locomotion).....</i>	<i>45</i>
4.1.2	<i>Panáčkování (rearing).....</i>	<i>46</i>
4.1.3	<i>Vzdálenost (distance).....</i>	<i>46</i>
4.1.4	<i>Šplhání (climbing)</i>	<i>47</i>
4.2	MORFOLOGICKÁ ANALÝZA	47
5	DISKUZE	61
6	ZÁVĚR	66
7	LITERATURA	67
8	PŘÍLOHY.....	83
8.1	SEZNAM PUBLIKOVANÝCH ČLÁNKŮ A ABSTRAKT	83
8.1.1	<i>Publikace v časopisech s IF se vztahem k tématu disertace</i>	<i>83</i>
8.1.2	<i>Publikace v časopisech bez IF se vztahem k tématu disertace</i>	<i>83</i>
8.1.3	<i>Abstrakta posterů/přednášek se vztahem k tématu disertace</i>	<i>83</i>
8.1.4	<i>Publikace v časopisech bez IF bez vztahu k tématu disertace.....</i>	<i>84</i>

ABSTRAKT

Perinatální hypoxie je souhrnné označení pro hypoxický infarkt proběhlý v perinatálním období. Zvířecí modely v průběhu let úspěšně reprodukovaly hypoxické podmínky a prohloubily znalosti mechanismů poškození mozku. Předním zástupcem je Rice-Vannucciho zvířecí model, který využívá jednostranný podvaz společné krkavice s následnou expozicí hypoxickému prostředí.

Sedmidenní myši mláďata kmene C57BL/6NTac podstoupila jednostranný podvaz pravé společné krkavice a byla exponována hypoxickému infarktu pobytem v komoře s 8% obsahem kyslíku (modifikovaný Rice-Vannucciho model). Byly vytvořeny též experimentální skupiny s izolovaným podvazem pravé společné krkavice nebo izolovanou expozicí hypoxickému infarktu. Pro pozorování změn chování myši byl využit automatizovaný systém pro dlouhodobou observaci chování drobných hlodavců v laboratorních podmínkách s názvem LABORAS. Změny chování byly sledovány 60. postnatální den, a to v několika různých doménách chování. Pro účely histologické analýzy byly zkoumány následující oblasti mozku: kortex, oblasti CA1 a CA3 hipokampu, hilus gyrus dentatus, ventrální a dorsální list gyrus dentatus.

Indukovaná hypoxie s ischemií vyvolaly podstatné behaviorální i morfologické změny, které vedly k výrazné poruše habituace a poruše schopnosti myši vyrovnávat se s novými podněty. Zjištěné změny spontánního chování nebyly doprovázeny morfologickými změnami mozkové tkáně ve skupinách s odděleně indukovanou hypoxií nebo ischemií. Jednotlivé oddělené infarkty ale byly schopny ovlivnit spontánní chování v pozdějším vývoji myši. Námí upravený model poukazuje na důležitost a nepostradatelnost behaviorálního testování, jelikož nižší míra hypoxického poškození nebyla morfologicky zjištělná, ačkoliv způsobila významné behaviorální změny. Zajímavým nálezem jsou změny v jednotlivých doménách chování z pohledu pohlavně vázaných rozdílů.

ABSTRACT

Perinatal asphyxia is a condition resulting from hypoxic-ischemic injury in utero or during birth and causing perinatal morbidity and mortality. Up until now, numerous models of neonatal hypoxia-ischemia were created and presented simulating brain damage patterns and motor deficits. Rice-Vannucci model is a leading representative of animal rodent models of hypoxic injury. It uses unilateral ligation of the common carotid artery in combination with exposure to hypoxic environment.

Seven-day-old mouse pups underwent unilateral ligation of the common carotid artery in combination with exposure to 8 % oxygen hypoxic air (Rice-Vannucci model modification). Experimental groups with isolated carotid artery ligation or only exposure to hypoxia were created, too. To assess the spontaneous behavior changes of mice we used an automated system for the continuous tracking of small rodent behavior (LABORAS™). On postnatal day 60, the spontaneous behavior of mice was analyzed in various behavioral domains. The observed areas for histological analysis were the cerebral cortex, CA1 and CA3 regions of the hippocampus, hilus, and the dorsal and ventral blades of the dentate gyrus.

Induced hypoxia and ischemia together generated substantial behavioral and morphological changes which led to significant differences in behavioral profiles for habituation and the ability of mice to cope with novelty. In contrast, the observed alterations in the spontaneous behavior were not accompanied by morphological changes in groups with separately induced hypoxia or ischemia. Nonetheless, the isolated insults significantly influenced the spontaneous behavior of these mice later in life. Our adapted animal model indicates the importance of behavioral testing, since mild hypoxic damage may not be morphologically detectable but may induce substantial behavioral changes in adult mice. An interesting outcome of the present study is that perinatal hypoxia resulted in generation of sex-specific consequences in some behavioral domains.

SEZNAM ZKRATEK

[-/-]	kontrolní skupina
[-/H]	izolovaná expozice hypoxickému prostředí
[CA/-]	izolovaný podvaz pravé společné krkavice
[CA/H]	modifikovaný Rice-Vannucciho model
ADHD	syndrom poruchy pozornosti s hyperaktivitou
ADP	adenosindifosfát
AIF	apoptózu-indukující faktor
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová kyselina
ANOVA	dvoufaktorová analýza rozptylu
APAF -1	faktor-1 aktivující proteázu
ATP	adenosintrifosfát
BCAO	animální model s oboustranným podvazem společné krkavice
BE	base excess
BG	bazální ganglia
BZD	benzodiazepiny
C57BL/6NTac	kmen myši
CA	Cornu Ammonis
CA1, CA2 a CA3	oblasti hipokampu
CPGs	central pattern generators
DAPI	4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, jaderné barvení
DMO	dětská mozková obrna
EPM	elevated Plus Maze
F	hodnota testového kritéria
GABA	kyselina gamaaminomáselná
Hb	hemoglobin
HCN	kyanovodík
HI	hypoxicko-ischemický
HIE	hypoxicko-ischemická encefalopatie
IAP	inhibitor apoptózy
IL	interleukin
KA	kyselina kainová, kainát

LABORAS	automatizovaný systém pro dlouhodobou observaci chování drobných hlodavců v laboratorních podmínkách
LPS	lipopolysacharidový komplex
M	molární koncentrace
MBP	myelinový bazický protein
MR	magnetická rezonance
N.s.	nesignifikantní
NAD	nikotinamidadenin dinukleotid
NADH	nikotinamidadenin dinukleotidfosfát
NBQX	vysoce selektivní kompetitivní antagonist AMPA a kainátových receptorů
NeuN	Neuronal nuclear antigen
NMDA	N-metyl-D-aspartát
No.	číslo
NOS	NO-syntáza
NSE	neuron specifická enoláza
p	hladina významnosti
P	hodnota statistické významnosti
PARP-1	poly (ADP-ribóza) polymeráza-1
pCO ₂	parciální tlak oxidu uhličitého
PND	postnatální den
pO ₂	parciální tlak kyslíku
PVL	periventrikulární leukomalacie
RV	Rice-Vannucci
SEM	standardní odchylka
t	t-hodnota
UZ	ultrazvuk
X	chromozom X
XIAP	X-vázaný inhibitor apoptózy

1 ÚVOD

1.1 Hypoxie

1.1.1 Vymezení pojmů

Hypoxie je chápána jako nedostatek kyslíku ve tkáních, anebo přesněji jako stav, kdy nabídka kyslíku tkáním není dostatečná k pokrytí aktuálních potřeb buněčného metabolismu (Murray, 1976).

Jako **asfyxie** se označuje stav, při němž se rozvíjí hypoxémie (pokles pO_2 v arteriální krvi) a hyperkapnie (zvýšení pCO_2 v arteriální krvi) s metabolickou acidózou. Při snížení či zamezení dodávky arteriální krve do tkáně mluvíme o **ischémii**, která je jednou z hlavních příčin vzniku tkáňové hypoxie (Murray, 1976).

1.1.2 Klasifikace hypoxie

Hypoxii je možné dělit na základě mnoha hledisek, kdy každé z nich zastupuje jeden konkrétní dominující aspekt. S ohledem na délku trvání je možné hypoxii rozdělit na **akutní** a **chronickou**. Podle rozsahu postižení na **celkovou** a **místní** (Trojan, 1989). Klasicky se hypoxie člení na čtyři základní typy na základě toho, která část osy *atmosférický vzduch – oběh – krev – tkáň* vykazuje dominantní odchylku od fyziologické normy. **Hypoxická hypoxie** (způsobená např. pobytem ve vysoké nadmořské výšce) kdy při poklesu pO_2 nastává hypoxémie (snížené sycení krve kyslíkem). **Stagnační hypoxie** vzniká při nedostatečném průtoku krve, kdy není kyslík v adekvátním množství dodáván tkáním, ačkoliv je pO_2 i hladina hemoglobinu normální. **Anemická hypoxie** nastává, pokud je arteriální pO_2 v normě, ale je sníženo množství celkového hemoglobinu a je omezena schopnost krve transportovat kyslík. Při **histotoxické hypoxii** tkáň nemohou kyslík efektivně využívat. Příkladem může být blokáda oxidoredukčních enzymových soustav (např. otrava kyanovodíkem) (Tab.1) (Jílek, 1970).

Stran důsledků je možno hypoxii dělit podle intenzity: **Hypoxie funkční**, která vede ke složitému souboru reflexních a humorálních odpovědí. **Hypoxie adaptační**, kdy se organismus již musí adaptovat metabolickou přestavbou na úrovni buněk. **Hypoxie destruktivní**, u níž energetický metabolismus buňky nezvládne zachovat vnitřní uspořádání živé hmoty. **Anoxie**,

kteřá znamená praktické vyčerpání zásob kyslíku v organismu, čímž vede k porušení všech buněk nezávisle na jejich vývojové zralosti nebo funkci (Mareš J., 1985, Kittnar, 2011).

Tabulka 1 Klasifikace hypoxie

typ	mechanismus vzniku	příklad
hypoxická	↓parciálního tlaku kyslíku v atmosféře	výstup do ↑ nadmořské výšky, náhlá dekomprese
stagnační	neadekvátní cévní zásobení	globální – šok, lokální – trombóza, embolie
anemická	↓transportní kapacity krve pro O ₂ (↓ Hb)	anémie, otrava CO
histotoxická	poškození enzymů respiračního řetězce	otrava kyanidem draselným

1.1.3 Hypoxie a mozek

Mozek spotřebovává přibližně 20 % klidové minutové spotřeby kyslíku, při pouhých 2% hmotnosti dospělého člověka. Má nejvyšší prioritu pro adekvátní oxygenaci a vysoké energetické požadavky společně s malou anaerobní tolerancí, což jej činí vulnerabilním k hypoxickému inzultu (Myslivoček, 2009, Barrett & Ganong, 2010, Riljak et al., 2016, Mysliveček, 2020).

1.1.3.1 Kompenzační schopnost nervové tkáně

Hypoxie a ischemie zapříčiněná celkovou hypoxemií nebo sníženou perfuzí nervové tkáně je patofyziologickým jevem vedoucím k nenávratnému poškození mozku. V rámci kompenzačních mechanismů dochází v prvním kroku k autoregulaci průtoku krve mozem. Jde o fyziologickou reakci vedoucí k udržení stálého krevního průtoku mozem nezávislou na změnách systémového krevního tlaku. Posléze dochází k redistribuci srdečního výdeje, kdy je preferován mozek a myokard na úkor splachniku, ledvin a kůže. Vzestup arteriálního krevního tlaku z důvodu vyplavení adrenalinu posiluje tuto kompenzační odpověď. Ischemie nervové tkáně s funkčními dopady na aktivitu neuronů vzniká při poklesu průtoku mozem pod 50 %. Když se sníží průtok krve pod 30 %, nastanou nevratné změny vedoucí ke strukturálnímu poškození neuronů (Grosenbaugh et al., 2018).

1.1.3.2 Adaptabilita nezralého mozku

U vývojově nezralých tkání, mezi které patří i nervová tkáň, probíhá odpověď na poškození odlišným způsobem než u tkání vysoce diferencovaných. Tato odpověď je v mnohém odlišná, pokud srovnáme stejný děj u mláďat a v dospělosti. Lze říci, že živočichové vývojově nezralí jsou odolnější vůči hypoxii než živočichové zralejší či dospělí. Nejvýraznější riziko hypoxie

nastává především v perinatálním období. Je pravděpodobné, že se lepší odolnost vůči hypoxii u mláďat vyvinula díky selekci, neboť byla pro organismus výhodou z hlediska evoluce (Cremer, 1982, Trojan et al., 2000).

Změna vzájemného poměru aerobního a anaerobního metabolismu, především vyšší podíl anaerobní glykolýzy, jsou podstatou zvýšené odolnosti mláďat (Nalivaeva et al., 2018). Stejný hypoxický inzult vyvolá u nezralého organismu ve srovnání s dospělcem vyšší akumulaci laktátu, což podporuje větší schopnost mláďat získávat energii právě anaerobní glykolýzou (Nehlig & Pereira de Vasconcelos, 1993). Tyto nálezy potvrzuje rovněž vysoký obsah glykogenu v nervové tkáni novorozených potkanů během období hypoxie. Glykogen je ve srovnání s glukózou také mnohem efektivněji využíván, kdy je zisk makroergních vazeb o 30 % vyšší (Vannucci, 1990).

Další důležitý rozdíl mezi nezralým a zralým mozkem můžeme pozorovat na úrovni hematoencefalické bariéry, která u nezralých mláďat vykazuje zvýšenou permeabilitu ve srovnání s dospělými. To vede k rozdílné zánětlivé odpovědi z důvodu přechodu zvýšeného množství imunoglobulinu G (Muramatsu et al., 1997, Millar et al., 2017).

Nezralý mozek je na jedné straně schopen efektivně kompenzovat hypoxii, nicméně pokud nakonec dojde k energetickému selhání, a tedy k buněčnému poškození, zánětlivá reakce probíhá fulminantněji se závažnějšími důsledky ve srovnání s dospělými (Puyal et al., 2013, Riljak et al., 2016).

1.1.3.3 Neuroplasticita

Plasticita je schopnost nervového systému reagovat na změny vnitřního a zevního prostředí, případně se jim přizpůsobit, a to za fyziologických i nefyziologických stavů (Pokorný, 1996). Plasticitu můžeme rozdělit na základě dvou charakteristických projevů: první typ označujeme jako „funkční“ a je pro něj typický rychlý nástup a reverzibilní změny; druhý typ označujeme jako „adaptační“ a je charakterizován změnou exprese genotypu ve fenotyp (Trojan & Pokorný, 1999).

Neuroplastické mechanismy jsou založeny na změně vztahů mezi neurony (např. množství zapojených neuronálních okruhů) nebo na modulaci přenosu signálu na úrovni synapse (např.

aktivita receptorů na postsynaptické membráně, výdej neurotransmiteru). Výsledkem je úprava komunikace mezi jednotlivými neurony nebo vzájemných vztahů funkčních center mozku. Odrazem neuroplastické aktivity mohou být změny stavby neuronů (růst jejich výběžků, aktivace proteosyntézy, tvorba a výdej mediátorů, aktivace receptorů, vytváření synapsí, úprava aktivity iontových kanálů). Pro aktivaci neuroplastického procesu je důležitý typ působícího faktoru, možnosti odpovědi organismu a citlivost jednotlivých struktur. Proto má jiný efekt zásah, jenž působí intrauterinně, během narození, postnatálně a v dospělosti. Stejně tak hraje významnou roli i individuální citlivost organismu. Reparační plasticitu lze označit jako schopnost neuronů obnovovat svoji porušenou funkci. Vedle funkce reparační se setkáváme také s plasticitou reaktivní (při krátkodobé expozici vyvolávajícího inzultu) a adaptační (při dlouhodobém působení vyvolávajícího inzultu) (Trojan et al., 2004).

1.1.3.4 Mechanismus poškození hypoxií na buněčné úrovni

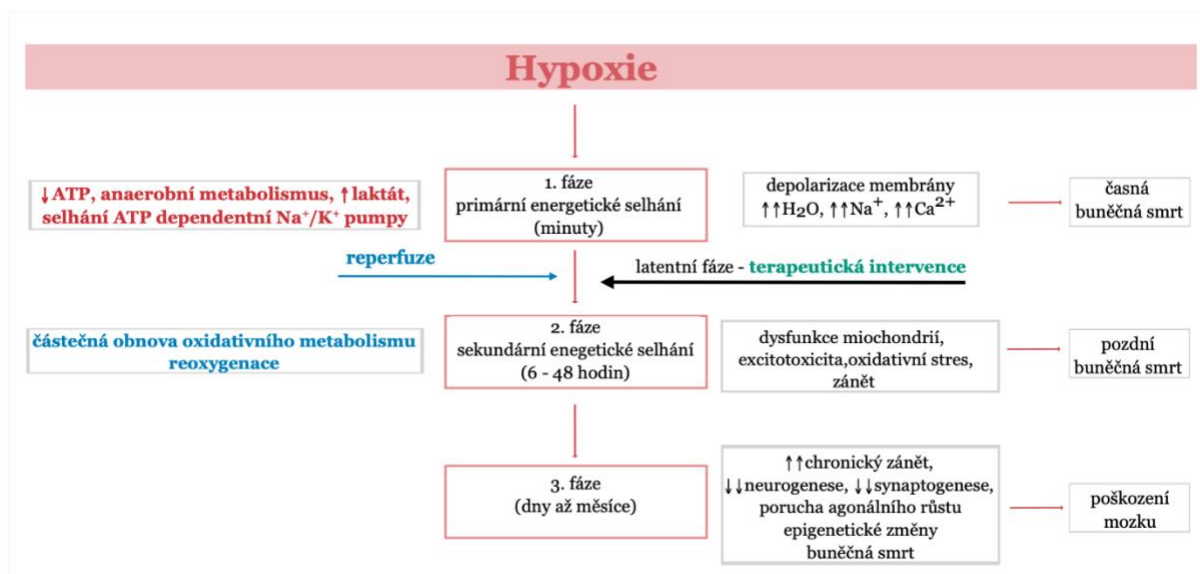
Mechanismus poškození buňky můžeme rozdělit do tří fází (obr. 1). **První fáze**, charakterizovaná primárním energetickým selháním, trvá řádově minuty. Poškození buněk obecně vzniká, klesne-li pO_2 pod 0,133 kPa (1 mmHg) (Chance & Williams, 1955). Pokles pO_2 vede ke snížené oxidativní fosforylaci a následně k úbytku ATP (Mourek, 1980, LaManna et al., 1984, Riljak et al., 2016). Následně dojde k přesmyku na anaerobní metabolismus, kde se hlavním energetickým zdrojem stane anaerobní glykolýza. Neuron metabolizuje vedle glukózy i laktát a acetoacetát (Takata et al., 2004). I přes snahu o kompenzaci deficitu však nakonec dochází k energetickému selhání. Intracelulárně se hromadí metabolity, nikotinamidadenindinukleotid (NADH), laktát a snižuje se pH (Foster et al., 2005). Snížení energetických rezerv má za následek poruchu funkce membránových iontových kanálů a intracelulární hromadění Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- a vody (Kozler et al., 2002, Martinez-Sanchez et al., 2004). Extracelulárně se zvyšuje množství K^+ . Tyto procesy způsobují depolarizaci membrány (Graham et al., 1993). Při depolarizaci se také ze synaptických váček v axonálním zakončení uvolňuje glutamát, který se váže na NMDA (N-metyl-D-aspartát) a na non-NMDA receptory a potencuje tímto tok Na^+ do buňky. Toto následně vede k depolarizaci postsynaptické membrány, otevření NMDA kanálu a proudění Ca^{2+} do postsynaptického neuronu. Zvýšená hladina intracelulárního Ca^{2+} aktivuje lipázy, proteázy a nukleázy, které se následně podílejí na poškození buněčné integrity (Verma, 2001). Významné je působení fosfolipázy, která způsobuje deesterifikaci membránových fosfolipidů a uvolnění volných mastných kyselin (Lipton, 1999). Z uvolněných fosfolipidů se poté tvoří kyselina arachidonová (Marro et al., 1994, Vannucci & Perlman, 1997), která vyvolá invazi neutrofilů a změnu průtoku krve.

Aktivované leukocyty produkují řadu enzymů proteolýzy, které mění permeabilitu kapilár a vedou k edému buněk. V reakci na tuto fázi nastane časný buněčný zánik.

Bezprostředně po obnovení oxygenace hypoxicky zasažené oblasti okysličenou krví nastupuje **latentní fáze** (Mátéffyová et al., 2006). Je to období charakterizované obnovením buněčného metabolismu, předcházející nástup sekundární fáze poškození. Délka latentní fáze je nepřímo úměrná intenzitě hypoxického infarktu – větší intenzita infarktu zkracuje latentní fázi (Iwata et al., 2007). Typicky toto období trvá 6 hodin a reprezentuje časové okno vhodné pro terapeutickou intervenci s cílem minimalizovat sekundární poškození mozku (Laptook, 2009, Cotten & Shankaran, 2010).

Druhá fáze, charakterizovaná excitotoxicitou, oxidativním stresem a zánětem, probíhá v období od 6 do 48 hodin po hypoxicko-ischemickém (HI) infarktu. V průběhu reoxygenace, tedy obnovy oxidativního metabolismu, dochází ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů, které vznikají v mitochondriích při redukčních procesech (Tan & Parks, 1999, Monje et al., 2000, White et al., 2000). Volné kyslíkové radikály peroxidací membránových lipidů narušují integritu buněčné membrány (Surai et al., 1999). Prakticky všechny buněčné součásti jsou senzitivní k poškození volnými kyslíkovými radikály (Kalous & Drahota, 1996). Jejich účinky jsou hlavním mechanismem buněčného poškození při reperfuzi (Vannucci & Perlman, 1997). Volné kyslíkové radikály způsobují poškození mitochondrií, které vede k další produkci kyslíkových radikálů. Během ischemického infarktu je indukována NO-syntáza (NOS) (Delivoria-Papadopoulos & Mishra, 2004), která produkuje nadbytek oxidu dusnatého, který působí neurotoxicky (Verma, 2001, Rodrigo et al., 2004). Popsané procesy kolapsu buněčné energetické přeměny, působení kyslíkových radikálů, nahromadění Ca^{2+} v buňce (Hedrick et al., 2005), neurotoxicita oxidu dusnatého (NO) a glutamátu a acidóza vedou ke ztrátě membránové integrity, progresivní proteolýze, k poškození strukturního uspořádání buňky a ke ztrátě kontroly nad obranou proti těmto procesům (Lipton, 1999, Hagberg et al., 2004). Veškerá výše popsaná sekvence pochodů vede ke vzniku chronické zánětlivé odpovědi a k tzv. pozdnímu buněčnému zániku.

Třetí fáze, trvající dny až měsíce po HI infarktu, je charakterizovaná exacerbací buněčného poškození a chronickým zánětem. V nervové tkáni dojde k narušení zrání oligodendrocytů, změnám procesu synaptogeneze a poškození axonálního růstu. Všechny tyto faktory omezují plastickou regenerativní schopnost mozku a vedou k jeho funkčnímu poškození.



Obrázek 1 Mechanismus poškození na buněčné úrovni

1.1.3.5 Excitotoxicita jako mechanismus hypoxicko-ischemického poškození

Excitotoxicita významně souvisí s druhou fází sekundárního energetického selhání. Mechanizmy geneze excitotoxicity obecně můžeme rozdělit na tzv. klasickou a pomalou formu (Doble, 1999, Riljak V., 2009):

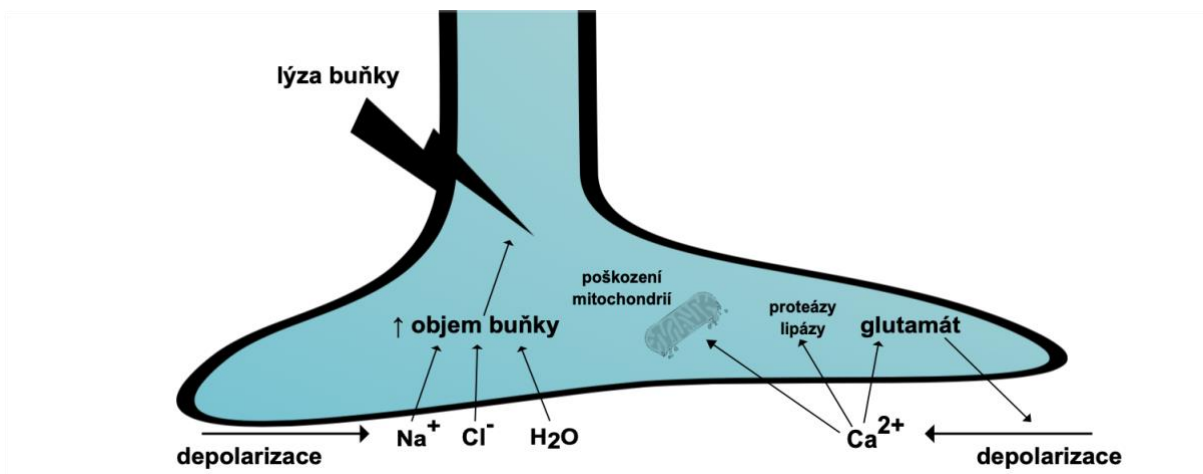
1.1.3.5.1 Klasická excitotoxicita

Dle tohoto konceptu se na excitotoxickém poškození nebo zániku buňky podílejí následující tři mechanismy (obr. 2):

- 1. Na⁺ - dependentní:** Aktivace AMPA/KA receptorů a poté aktivace napěťově řízených Na⁺ kanálů vede k influxu Na⁺ do buňky a k další depolarizaci. Opakující se depolarizace může vést k až k funkčnímu přetížení nervové buňky. Influx Na⁺ je následován pasivním vstupem Cl⁻ a dále díky osmotickému gradientu přestupem H₂O do buňky. Toto vede k nárůstu objemu buňky, mechanickému poškození organel až k lýze buňky. Tato tzv. osmotická komponenta excitotoxicity je vratná, pokud je depolarizační stimul včas odstraněn (Kiedrowski et al., 1994).
- 2. Ca²⁺ - dependentní:** Při opakované depolarizaci se zvyšuje koncentrace intracelulárního Ca²⁺. Zdrojem Ca²⁺ je extracelulární prostředí. Pomocí napěťově řízených kalciových kanálů, NMDA receptorů (aktivovaných kyselinou glutamovou) (Koch & Barish, 1994, Mody & MacDonald, 1995), snížení nebo zhroucení aktivity sodno-kalciového (Na⁺/Ca²⁺) výměníku nebo vyplavení Ca²⁺

nastává mobilizace zásob v buněčných organelách (aktivací NMDA receptorů, ale i dosud neznámými mechanismy). Vzestup intracelulární koncentrace Ca^{2+} je zřejmě ireverzibilní proces, neboť i při odstranění stimulu vedoucího k depolarizaci neuronu dojde k zániku buňky. Z tohoto důvodu je schopnost buňky pufrovat intracelulární Ca^{2+} chápána jako rozhodující mechanismus rezistence vůči excitotoxickému poškození (Lukas & Jones, 1994). Nitrobuněčná elevace Ca^{2+} vede k aktivaci řady enzymatických systémů, které vedou k nevratnému poškození homeostázy buňky, aktivaci nukleáz, fragmentaci DNA, fosforylaci řady proteinů pomocí aktivované proteinkinázy C, destrukci buněčné membrány pomocí fosfolipázy 2 a v konečném výsledku k zániku neuronu (Mody & MacDonald, 1995, Doble, 1999).

- 3. Glutamátová smyčka:** V průběhu zmiňovaných procesů se zvyšuje extracelulární koncentrace kyseliny glutamové jejím uvolněním při lýze okolních buněk, uvolněním při masivní depolarizaci buňky nebo uvolněním Ca^{2+} dependentním mechanismem ze synaptických váčků. Zvýšená hladina koncentrace kyseliny glutamové v extracelulárním prostoru vede k šíření vlny depolarizace i mimo původní fokus. Okolní buňky se v důsledku toho stávají náchylnější k působení původní noxy a následně se také podílejí na uvolňování kyseliny glutamové (Doble, 1999).



Obrázek 2 Mechanismus klasické excitotoxicity – úloha Na^+ , Ca^{2+} a glutamátu.
Převzato z (Riljak V., 2009).

1.1.3.5.2 Pomalá excitotoxicita

Tento koncept pracuje s teorií, že excitotoxický mechanismus zániku buňky může nastat i bez působení excitotoxinu (Zeevalk & Nicklas, 1990). Důsledkem metabolického poškození jsou neurony citlivější k fyziologické hladině kyseliny glutamové. Klíčová role se přisuzuje mitochondriím, které vlivem strukturálního poškození nebo poškození enzymu dýchacího řetězce nejsou schopny produkovat ATP, tedy krýt energetické nároky buňky (především ATP-dependentní procesy). Nejdříve nastane zhroucení sodno-draselné (Na^+/K^+) pumpy udržující klidový membránový potenciál a dále poškození (Na^+/K^+) výměníku, což vede ke slabé depolarizaci neuronu. V důsledku toho dojde se zvýšenou pravděpodobností k otevření napětově řízených Na^+ a Ca^{2+} kanálů a ke zvýšené pravděpodobnosti odpovědi buňky na excitační stimulus (Riepe et al., 1995). Tímto způsobem může i fyziologická a netoxická koncentrace kyseliny glutamové spustit excitotoxickou kaskádu (Doble, 1999).

Koncept pomalé excitotoxicity hraje velmi pravděpodobně veliký význam u chronických neurodegenerativních onemocnění, kdy byla prokázána vyšší incidence Alzheimerovy choroby u jedinců s perinatální HIE (Zhang et al., 2013).

Na fenomén excitotoxicity je nutno vždy nahlížet komplexně – jednotlivé děje podílející se na excitotoxickém zániku buňky nelze oddělovat. I když se influx natria řadí mezi mechanismus klasické excitotoxicity, neznamená to, že se nepodílí na vzniku excitotoxicity pomalé. Stejně tak kolaps elektrochemického sodného gradientu, společně s metabolickým zhroucením buňky významně ovlivňuje $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ výměník a vede k elevaci koncentrace kalcia v buňce, blokaci efluxu protonů, poklesu pH intracelulárně, což opět významně narušuje homeostázu buňky (Riljak V., 2009).

HI poškození mozkové tkáně vede k vyplavení kyseliny glutamové a k následné aktivaci jak pre – tak post – synapticky lokalizovaných glutamátových receptorů. Následná elevace zvýšení intracelulárního Ca^{2+} může zasahovat do metabolismu mitochondrií a poškozovat je. Navíc je aktivována řada enzymů, včetně proteáz a endonukleáz, které nevratně poškozují buňku (Hazell, 2007). Samotná kyselina glutamová poškozuje i nebuněčné komponenty nervové tkáně, jako je např. myelin, způsobené pravděpodobně akumulací Ca^{2+} v axonech neuronů a rozvratem iontové homeostázy na buněčné membráně oligodendrocytů (Alberdi et al., 2002).

HI poškození je také významným mechanismem vedoucím k edému mozkové tkáně. Kyselina glutamová zde hraje klíčovou roli. Kyselina glutamová je fyziologicky pufována astrocyty. Překoná-li však její extracelulární koncentrace pufovačnou kapacitu těchto buněk, je ve zvýšené koncentraci přeměňována na glutamin. Glutamin je významně osmoticky aktivní a vede k edému astrocytů a k jejich částečné depolarizaci s následným uvolněním kyseliny glutamové do extracelulární matrix. Původně fyziologický mechanismus přeměny kyseliny glutamové se tak opět mění na patologickou smyčku vedoucí k potenciálnímu poškození až lýze nervové tkáně (Kimelberg, 1992).

1.1.3.6 Pohlavně vázané změny v reakci na hypoxii

Mužské pohlaví má dvakrát vyšší incidenci perinatální hypoxie, infekce a intracerebrálního krvácení (Hill & Fitch, 2012). Mužské pohlaví je navíc citlivější vůči hypoxii a její důsledky jsou spojeny s vyšší mortalitou a morbiditou ve srovnání s pohlavím ženským. Mezi závažné zdravotní důsledky řadíme: dětská mozková obrna (DMO), hluchota, slepota, poruchy autistického spektra, nebo dyslexie (Donders & Hoffman, 2002, Jarvis et al., 2005, Zhu et al., 2006, Johnston & Hagberg, 2007, Du et al., 2009, Hill et al., 2011, Hill & Fitch, 2012, Gorelik et al., 2016, Riljak et al., 2016, Borbelyova et al., 2019, Murden et al., 2019).

Při studiu morfologických změn byly na myších modelech prokázány změny nejvíce v oblasti hipokampu, kde u mužského pohlaví dochází k signifikantnímu úbytku nervové tkáně a k demyelinizaci v reakci na stejný hypoxický inzult ve srovnání s pohlavím ženským (Ment et al., 1998, Curristin et al., 2002, Mayoral et al., 2009).

I když přesný mechanismus pohlavně vázaných rozdílů není dosud plně objasněn, do popředí se dostávají teorie působícího vlivu steroidů. Je známo, že estrogeny působí protektivně a jsou spojeny s nižším rizikem cévní mozkové příhody, srdečního infarktu a obecně lepší rekonvalescencí (Fukuda et al., 2000, Nuñez et al., 2007). Je nicméně prokázáno, že v závislosti na pohlaví dochází ke zvýšené expresi buď estrogenů, nebo dihydrotestosteronu, a to již v perinatálním období. Tyto pohlavně vázané změny exprese steroidů jsou dále akcentovány hypoxickým inzultem (Mayoral et al., 2009). In vitro bylo prokázáno, že estrogen působí neuroprotektivně v reakci na hypoxii (Heyer et al., 2005) a glukózovou deprivaci (Liu et al., 2007). Oproti tomu dihydrotestosteron je spojován se zvýšenou excitotoxicitou a apoptózou buněk (Nuñez & McCarthy, 2008, Vannucci & Hurn, 2009). Negativní vliv testosteronu byl podpořen zajímavou studií, kdy při simulaci perinatální hypoxie byl u obou pohlaví aplikován

testosteron propionát a samice s aplikovaným testosteron propionátem společně se samci vykazovali vyšší intenzitu poškození mozku ve srovnání s kontrolními samicemi. (Hill et al., 2011). In vivo je protektivní efekt estrogenů více variabilní, závisející na věku, typu inzultu a konkrétním hormonu (Nuñez & McCarthy, 2003, Renolleau et al., 2008, Wagner, 2008).

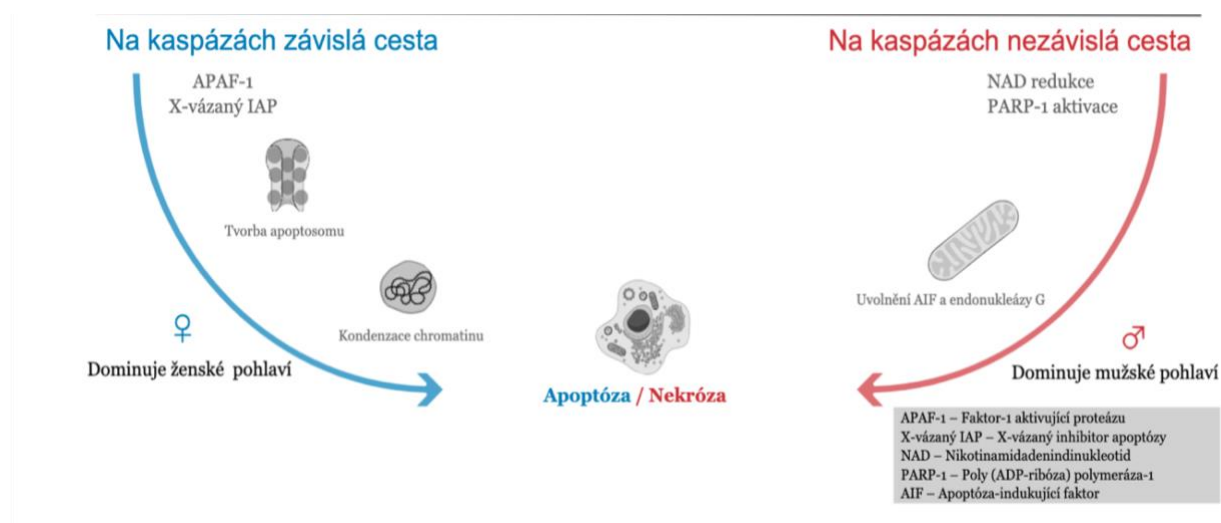
Vedle hormonálního vlivu se pohlavně vázané změny v reakci na hypoxii vysvětlují odlišnou aktivací apoptotické kaskády (Haast et al., 2012, Hill & Fitch, 2012, Arambula et al., 2019). V reakci na stejný hypoxický inzult bylo u mužského pohlaví evidováno větší množství aktivovaných kaspáz, a tedy větší množství zaniklých buněk v porovnání s ženským pohlavím (Liu et al., 2009, Hill & Fitch, 2012, Netto et al., 2017).

Vedle samotného množství aktivovaných kaspáz hraje významnou roli samotný mechanismus aktivace apoptózy. U ženského pohlaví dojde převážně k aktivaci na kaspázách závislé cesty apoptózy. Aktivuje se faktor-1 aktivující proteázu (APAF-1), vytvoří se apoptozom navázáním se specifickými kaspázami a DNA se fragmentuje (Renolleau et al., 2008). Oproti tomu u mužského pohlaví dominuje na kaspázách nezávislá cesta. Dojde ke snížení koncentrace nikotinamidadenindinukleotidu (NAD), aktivaci tzv. poly (ADP-ribóza) polymerázy-1 (PARP-1), uvolnění apoptózu-indukujícího faktoru (AIF) a endonukleázy G z mitochondrií a v samotném závěru k buněčné smrti (Wang et al., 2004, Zhu et al., 2006, Renolleau et al., 2007, Lang & McCullough, 2008) (Obr. 3).

Jednotlivé signální molekuly apoptotické kaskády se z tohoto důvodu staly předmětem mnoha studií. Například u samčích hlodavců s deficitem PARP-1 byla prokázána nižší intenzita poškození mozku v důsledku hypoxického inzultu ve srovnání s kontrolní skupinou (Yuan et al., 2009). Toto potvrzuje skutečnost, že v případě inhibice PARP-1 byla prokázána nižší intenzita apoptotického poškození mozku u samců. U samic změna intenzity poškození v reakci na inhibici PARP-1 nebyla pozorována (Mabley et al., 2005). Samotné hladiny PARP-1 a AIF se vyskytují u samčího pohlaví ve vyšších koncentracích ve srovnání se samicemi. Dalším zajímavým objevem je skutečnost, že inhibice kaspázy-3 vede u sledovaných hlodavců k neuroprotekcí (Zhu et al., 2006).

Velikou pozornost získal X-vázaný inhibitor apoptózy (XIAP - X-linked inhibitor of apoptosis). Jedná se o jednoho z hlavních zástupců anti-apoptotických signálních molekul. XIAP se efektivně váže na kaspázu 9 a blokuje signální kaskádu vedoucí k apoptóze. Zvýšená genová

exprese XIAP je potvrzena u samic a přispívá k nižší citlivosti vůči HI inzultu (Deveraux & Reed, 1999, Askalan et al., 2011).



Obrázek 3 Pohlavně vázané rozdíly v reakci na hypoxii

1.2 Perinatální hypoxie

Fyziologický průběh intrauterinního vývoje, porodu a časného poporodního období, též souhrnně označovaného jako **perinatální období**, je rozhodující pro adekvátní vývoj jedince. Není neobvyklé, že k hypoxickému poškození dochází právě v tomto období. Hypoxický inzult, proběhlý v perinatálním období souhrnně označujeme jako **perinatální hypoxii** a patří mezi hlavní příčiny morbidity a mortality v tomto období. Devadesát procent všech hypoxií v perinatálním období vznikne prenatálně a intrapartálně, zbylých 10 % postnatálně (Berger & Garnier, 1999, Bryce et al., 2005, Lawn et al., 2005, Vlassaks et al., 2013).

1.2.1 Etiologie perinatální hypoxie

Etiologické faktory můžeme pro přehlednost rozdělit do tří kategorií: **maternální**, **placentární** (placenta/pupečník) nebo **fetální** (plod/novorozenec). Mezi **maternální** faktory řadíme: ruptura děložní, hypertonus děložní, infekce, hypotenze/šok, onemocnění vzniklá v těhotenství (gestační diabetes, gestační hypertenze, preeklampsie, eklampsie), onemocnění vzniklá před těhotenstvím (obezita, kardiorespirační onemocnění, nikotinismus, hemoglobinopatie, anémie, diabetes, nefropatie). Mezi **placentární** faktory řadíme: abrupce placenty, poruchy placentace, fetomaternální hemoragie, infekce, pupečnickové komplikace (uzel, prolaps). Mezi **fetální** rizikové faktory řadíme: předčasný porod, kefalopelvicový nepoměr, makrosomie, anémie,

infekce nebo vrozené srdeční vady, pneumopatie. Z časového hlediska je možné příčiny rozdělit na **prenatální** (např. onemocnění vzniklá během a před těhotenstvím), dále **intrapartální**, (např.: hypertonus děložní, ruptura děložní, pupečnickové komplikace) nebo **postnatální** (např.: vrozené srdeční vady) (Golan et al., 2009, Guo et al., 2010, Patterson & Zhang, 2010, Curtis et al., 2014, Gonzalez-Rodriguez et al., 2014, Jain et al., 2015, Eskild et al., 2016, Wang et al., 2016). Přehled jednotlivých faktorů rozvoje perinatální hypoxie podává tabulka (Tab. 2).

Tabulka 2 Etiologické faktory perinatální hypoxie

maternální	placentární	fetální
hypertonus děložní	abrupce placenty	předčasný porod
ruptura děložní	poruchy placentace	makrosomie
infekce	fetomaternální hemoragie	kefalopelvický nepoměr
hypotenze/šok	infekce	infekce
onemocnění vzniklá v těhotenství	pupečnickové komplikace	anémie
gestační hypertenze	prolaps	pneumopatie
preeklampsie	uzel	vrozené srdeční vady
eklampsie		
gestační diabetes		
onemocnění vzniklá před těhotenstvím		
kardiorespirační onemocnění		
nefropatie		
nikotinismus		
anémie		
hemoglobinopatie		
diabetes		
obezita		

1.2.2 Důsledky perinatální hypoxie

Perinatální hypoxie je 5. nejčastější příčinou úmrtí u dětí do 5 let věku a je zodpovědná za 23 % úmrtí všech novorozenců celosvětově (Bryce et al., 2005, Lawn et al., 2005). Incidence hypoxického infarktu v perinatálním období je 3 ‰ u donošených dětí, nicméně u předčasně narozených je mnohonásobně vyšší (Takada et al., 2011). Důsledky vyvolané perinatální hypoxií mohou být velice závažné a mohou významně ovlivnit možnosti, schopnosti a uplatnění jedince v budoucím životě. Mají tedy významné socio-ekonomické dopady a studium

mechanizmů poškození a hledání terapeutických možností zůstává stále v popředí experimentálního zájmu.

V souvislosti s perinatální hypoxií se setkáváme s termínem **hypoxicko-ischemická encefalopatie (HIE)**. Jedná se o klinicko-patologickou jednotku, která vzniká v důsledku difúzního HI postižení centrální nervové soustavy vznikající z různých příčin. Řadí se mezi neurologická postižení termínově donošených dětí. HIE lze klasifikovat jako lehkou, středně těžkou a těžkou. Těžký stupeň HIE vede k neonatálnímu úmrtí. Incidence HIE je odhadována 1:3000 novorozenců (Lebl, 2012). Mezi onemocněními, která se vyskytují u postiženého jedince později a přímo související s HIE patří: dětská mozková obrna (DMO), poruchy autistického spektra, epilepsie, slepota, hluchota, porucha pozornosti s hyperaktivitou (ADHD) nebo poruchy učení a chování (Rosenbaum et al., 2007, Graham et al., 2008, Glass et al., 2011, Lee et al., 2013).

Dále se setkáváme s **periventrikulární leukomalácií (PVL)**. Jde o postižení mozku předčasně narozených dětí, které probíhá pod jiným obrazem než u donošených novorozenců. Jde o výsledek postižení nedonošeného dítěte hypoxickou ischemií. Je charakteristická ložiskovou nekrózou bílé hmoty okolo postranních komor. Mezi patogenetické faktory se řadí primárně nevyzrálá perfuze bílé hmoty a vývojová zranitelnost prekursorů oligodendroglíí. Dochází zejména k poškození thalamu, mozečku a parietální kůry, neboť je pro ně charakteristická nejvyšší spotřeba O₂ (Zaghloul et al., 2017).

1.2.3 Diagnostická kritéria

Encefalopatie způsobená HI inzultem se klinicky manifestuje již v prvních hodinách života. Diagnostika HIE se zakládá na klinickém obraze, laboratorních nálezech a elektroencefalografickém (EEG) vyšetření (Hellström-Westas et al., 1995). Nedílnou roli sehrávají i zobrazovací metody, především ultrazvuk (UZ) a magnetická rezonance (MR) (Shroff et al., 2010).

1.2.3.1 Klinická symptomatologie

Klinická symptomatologie se hodnotí podle klasifikačních schémat, nejčastěji se užívá modifikované Sarnat skóre (Sarnat & Sarnat, 1976), které rozděluje stupně encefalopatie na mírný, střední a závažný (tab. 3).

Tabulka 3 Modifikované Sarnat skóre

I. mírná HIE	II. středně závažná HIE	III. těžká HIE
zvýšená iritabilita	letargie	kóma
zvýšená „bdělost“	křeče	protrahované křeče
mírná hypotonie	výrazné abnormality svalového napětí	těžká hypotonie
slabé sání	nutné sondování	neschopnost udržet spontánní ventilaci

Dalším rozšířeným klasifikačním schématem je Apgar skóre (tab. 4) (Apgar, 1953). Je užíváno již od roku 1953, kdy jej do klinické praxe uvedla Virginia Apgarová. Jedná se o metodu hodnocení vitality novorozence již na porodním sále. Novorozenec je hodnocen v čase 1, 5 a 10 minut po narození a je hodnoceno 5 kritérií, kde za každé je možno získat až 2 body. V dnešní době je skóre vnímáno jako orientační nástroj pro hodnocení efektivity resuscitace a vitality novorozence. Skóre od 5. minuty nad 8 je hodnoceno jako fyziologický stav novorozence, skóre pod 2 poukazuje na špatnou adaptaci novorozence, tedy suspektní asfyxii (Finster & Wood, 2005).

Tabulka 4 Apgar skóre

	0	1	2
akce srdeční	<60/min	<100/min	>100/min
respirace	apnoe	bradypnoe	eupnoe
tonus	snížený	mírná flexe	aktivní pohyby
reflexní iritabilita	bez reakce	obličejová mimika	brek
barva	modrá	akrocyanóza	růžová

1.2.3.2 Laboratorní vyšetření

Veliký význam má stanovení pH pupečnickové krve, kdy pH <7 a BE -12 mmol/l (base excess, přebytek bází) poukazují na metabolickou nebo smíšenou acidózu asociovanou s proběhlým hypoxickým inzultem.

Významnou součástí diagnostiky poranění mozku je vyšetření biomarkerů. Mezi hlavní zástupce této skupiny můžeme zařadit: Myelinový bazický protein (MBP), S100 β , IL-6 a Neuron-specifickou enolázu (NSE) (Douglas-Escobar & Weiss, 2012). MBP tvoří hlavní součást myelinové pochvy. Může procházet hematoencefalickou bariérou a jeho zvýšená koncentrace v krevním oběhu je charakteristická při poškození bílé hmoty mozku nebo demyelinizaci nervových vláken (Douglas-Escobar & Weiss, 2012). S-100 β je kalcium vázící protein, který se uvolňuje do krevního řečiště při porušení hematoencefalické bariéry. Je

obsažen v cytosolu nervových buněk, především buněk gliových. Zvýšení tohoto proteinu je charakteristické pro zánět a apoptózu (Douglas-Escobar & Weiss, 2012). IL-6 je zánětlivý cytokin, který je produkován T-buňkami a makrofágy. IL-6 je zvýšený u HIE, nicméně nikoliv u asfyxie bez rozvinuté HIE. Koncentrace tohoto proteinu úzce souvisí se závažností HIE a s následným neurologickým vývojem u dětí (Chiesa et al., 2003). Dalším zástupcem této skupiny je NSE, která se uvolňuje při zániku neuronu a disrupci hematoencefalické bariéry. Hladina NSE, stejně jako v případě IL-6, je u zvířecích modelů používána pro kvantifikaci kortikálního poškození (Douglas-Escobar & Weiss, 2012).

1.2.3.3 Zobrazovací metody

Prognostický význam má konvenční elektroencefalografický záznam (EEG), vyšetření evokovaných potenciálů nebo amplitudou integrovaný EEG záznam (vzniká úpravou signálu z jednoho nebo několika svodů, aEEG) (Toet et al., 1999). Vyšetření evokovaných potenciálů umožňuje kontinuální a dlouhodobé hodnocení elektrické aktivity mozku a kvantifikaci funkčního stavu mozku. Velmi praktické a dobře použitelné je právě hodnocení aEEG. aEEG záznam slouží jako jedno z indikačních kritérií pro zahájení terapeutické hypotermie (Hallberg et al., 2010). Velmi dobře také koreluje s dlouhodobou prognózou dětí po HIE. Dobrou prognózu mají děti s normálním nebo jen středně abnormálním nálezem v časném stadiu po inzultu, prognóza naopak zůstává nejistá u dětí s výrazně abnormálním nálezem. Při použití léčebné hypotermie se současnou kontinuální aEEG monitorací se jako prognosticky příznivá jeví také normalizace záznamu do 24 hodin po inzultu (Murray et al., 2009).

Dalším významným zástupcem je transkraniální ultrasonografie. Díky své dostupnosti a rychlosti se používá jako jedna z prvních metod volby při podezření na HIE. Pozorování změn parenchymu, velikosti postranních komor a hemodynamických parametrů mozkových tepen pomáhají časně diagnostikovat HIE a včas zahájit adekvátní terapii (Guan et al., 2017).

Nejvyšší senzitivity a specifity při hodnocení intenzity poškození CNS dosahuje magnetická rezonance (MR) (Shroff et al., 2010). Nález z MR nicméně nelze použít jako jedno z indikačních kritérií – časné změny jsou patrné jen při použití speciálních metod zobrazení, navíc transport nestabilního novorozence k vyšetření je spojen s časovou prodlevou před případným započítím terapie. Morfologické změny jsou nejvíce vyjádřeny v 1. a 2. týdnu života. V této době je zdravotní stav novorozenců většinou stabilizován a řízená hypotermie je již ukončená. Závažné jsou zejména změny v oblasti thalamu, bazálních ganglií (BG) a dále v

oblasti mozkové kůry a bílé hmoty. Změny v oblasti BG a thalamu se klasifikují jako lehké, střední a těžké. U lehkých změn je prognóza příznivá, u těžších stupňů je výskyt dlouhodobých obtíží pravděpodobný. Mírné izolované změny v oblasti kůry mozkové a změny v bílé hmotě mají nejasný význam. Kombinace významných změn v hlubokých strukturách se změnami v kůře a bílé hmotě je nejzávažnější (Twomey et al., 2010, Perlman & Shah, 2011).

1.2.4 Současné terapeutické možnosti

Řízená hypotermie zůstává i nadále zlatým standardem v terapii perinatálního HI poškození u člověka. Existují dva typy hypotermie, které dokážou poskytnout efektivní ochlazení tkáně. Jedná se o izolované chlazení hlavy nebo celotělové chlazení. V ČR se primárně užívá celotělové chlazení. Výhodou celotělového chlazení je rovnoměrné rozdělení teploty v organismu. Při splnění přesně stanovených indikačních kritérií se přistupuje k postupnému ochlazování jedince až na 33,5 °C. Tato teplota je nadále udržována po dobu 72 hodin. Po uplynutí této doby nastává oteplování organismu, které nesmí přesáhnout 0,5 °C za hodinu (Hálek, 2011). Terapie je nejúčinnější, pokud je započata v latentní fázi a před nástupem druhé fáze hypoxického postižení (viz výše). Chlazení by mělo být poskytnuto rychle, ideálně do tří hodin po narození. Novorozenci, kteří podstoupili hypotermii do 180 minut po narození, mají méně závažné důsledky (Leben et al., 2018). Tyto údaje vyplývají ze studií, které byly prováděny na zvířecích modelech, kde byla hypotermie poskytována 48-72 hodin. Nepanuje však dosud shoda o délce aplikace hypotermie (Wassink et al., 2019). I přes postupné modifikace léčebného protokolu, v případě těžkého HI poškození řízená hypotermie nepřináší dosud uspokojivé výsledky. Z tohoto důvodu jsou stále hledány další terapeutické možnosti, které by samy nebo v kombinaci s hypotermií vedly k lepším terapeutickým výsledkům. Mezi slibné kandidáty patří mimo jiné exogenně podávaný erythropoetin a jeho analogy, melatonin, xenon, alopurinol a magnezium sulfát (Frajewicki et al., 2020). Kombinovaná terapie erythropoetinem a řízenou hypotermií je při současném stavu znalostí na úrovni klinických randomizovaných studií a přináší pozitivní výsledky (Fan et al., 2013). Jiné potenciální terapeutické možnosti, jako např. azithromycin a endokanabinoidy zůstávají dosud ve fázi preklinických studií. Péče pediatra, dětského neurologa a časná rehabilitace tvoří základ následné péče pro minimalizaci funkčních důsledků HI poškození mozku (Wassink et al., 2019, Frajewicki et al., 2020).

1.3 Zvířecí modely perinatální hypoxie

Modelování HI poškození mozku na zvířatech zaznamenalo od poloviny 20. století značný rozvoj. Zvířecí modely v průběhu let úspěšně reprodukovaly hypoxické podmínky, prohloubily znalosti mechanismů poškození bílé a šedé hmoty a v neposlední řadě přinesly možnost testování nových terapeutických možností.

Hlodavčí modely se staly standardem při studiu HI poškození mozku. Jinými slibnými modely HIE jsou modely ovčí, které se staly významným zdrojem poznání při studiu hemodynamiky mozku, zejména autoregulace perfuze mozku za normálního stavu a v průběhu hypoxického inzultu (Papile et al., 1985, Helou et al., 1994). Velikou výhodou ovčího modelu je vysoká podobnost morfologie mozku. Také samotná velikost dává možnost přímo intrauterinního sledování a případných intervencí (Bernhard et al., 1967, Cook et al., 1987). Nevýhodou je obtížné studium jemné motoriky u tohoto modelu, která je u hlodavčího modelu naopak hodnotitelná snadněji (úchop) (Back et al., 2012). Mezi další významné zástupce řadíme prasečí modely, které zaznamenaly značný pokrok při studiu EEG mozku po hypoxickém inzultu. Díky podobnosti poškození bílé hmoty mozkové u primátů se dostalo do popředí studium paviánů, u kterých se zkoumá efektivita umělé ventilace po HI inzultu (Verney et al., 2010).

Hlavní předností hlodavčích modelů je široké využití ve vědeckém výzkumu a relativně malá finanční zátěž. Limity těchto modelů jsou ovšem zřejmé – rozdílná morfologie a ontogeneze hlodavce a člověka (Mátéffyová et al., 2006, Northington, 2006, Kozler et al., 2014, Schwarz et al., 2014). Nelze opomenout ani zásadní rozdíl ve vývoji a komplexnosti lidského a hlodavčího mozku. V současné době jsou poměrně přesně zmapována identická vývojová období maturace neuronů, jejich citlivost na hypoxii ve srovnatelných vývojových obdobích a strukturální odlišnosti, především v některých oblastech mozku (Millar et al., 2017). Velikou pozornost zasluhují neurony podkorové zóny (z angl. subplate zone), jedná se o oblast mezi kortikální ploténkou a intermediální zónou (Hoerder-Suabedissen & Molnár, 2015). U člověka neurony podkorové zóny tvoří komplexní a dynamickou strukturu, tvořící základ budoucího kortexu (Smart et al., 2002). U hlodavců dosáhne svého maxima mezi 14. a 18. embryonálním dnem vývoje (Bayer & Altman, 1990), u člověka až mezi 24. a 32. týdnem vývoje (Kostovic & Rakic, 1990). Tento výrazný časový posun a komplexita stavby nervové tkáně u člověka vedou k vzájemně složitě porovnatelné vulnerabilitě k hypoxii mezi člověkem a hlodavcem (Wang et al., 2010). Toto časové období je z pohledu hlodavčích modelů velmi důležité, protože právě 2.

a 3. postnatální den probíhají simulace HI inzultu, představující právě 24-32. týden vývoje člověka (Follett et al., 2000, Back et al., 2002). U hlodavce již podkorová zóna ztrácí tloušťku (Kostovic & Rakic, 1990), oproti tomu u člověka dosahuje svého maxima a aktivně participuje na kortikogenezi (Wang et al., 2010). Hodnocení důsledků HI poškození mozku u hlodavce a člověka musí být vždy komplexní a mělo by citlivě zohledňovat výše uvedené.

1.3.1 Ontogeneze laboratorní myši ve srovnání s člověkem

1.3.1.1 Obecné poznatky

Hlodavci jsou nejvíce užívanými zvířaty na poli vědeckého výzkumu a není tomu jinak ani v případě studia perinatální hypoxie (Hamdy et al., 2020). Z hlediska fyziologie, anatomie a farmakodynamiky se jedná o jedny z nejlépe prostudovaných zvířat. K hlavním výhodám oproti jiným zvířecím modelům patří zejména vhodnost k laboratornímu chovu, krátká doba gestace a ekonomická výhodnost (technické zázemí, výživa, manipulace, rychlá reprodukce) (Perlman, 2016).

Vývoj myši trvá celkem 6 týdnů, z toho 3 týdny intrauterinně a 3 týdny postnatálně. Je tedy patrné, že je pro myši typická neonatální nezralost v porovnání s člověkem. Zkoumání motorického vývoje hlodavce může být přínosné pro prohloubení znalostí fyziologie a patofyziologie motoriky člověka (Vinay et al., 2005). Stupeň zralosti CNS při narození je u myši výrazně menší než u člověka a lze tak tvořit zvířecí modely, které reprezentují stupeň zralosti CNS v prenatálním období člověka (Stadlin et al., 2003).

1.3.1.2 Embryonální a postnatální vývoj myši

Při narození je myš slepá, hluchá a není schopna efektivně regulovat svou tělesnou teplotu. Hlavním orientačním smyslem je čich (Jamon, 2006). První 2 týdny života je aktivita mláďat omezena na přijímání potravy a spánek a z důvodu limitované lokomoční schopnosti se mláďata nacházejí převážně v hnízdu pod matkou (Calamandrei, 2004, Clarac et al., 2004). Po 2 týdnech začínají účinně využívat sluch, zrak a zkoumat své blízké okolí. Třetí týden je spojen s vyšší rozmanitostí chování a hyperaktivitou (Calamandrei, 2004). Následuje sexuální maturace a jejich chování se přibližuje dospělým myším (McCutcheon & Marinelli, 2009). Zároveň dále v tomto období probíhá myelinizace vláken šedé hmoty a primárních motorických a senzorických oblastí mozku (Counotte et al., 2011). Začátek adolescence nastává kolem 25. postnatálního dne a trvá přibližně do 50. postnatálního dne. Pohlavní zralost je u samic přibližně

datována na 33. postnatální den, ale u samců přibližně o dva týdny později, tedy 45. den po narození. Dospělost nastává od 8. postnatálního týdne (McCutcheon & Marinelli, 2009).

1.3.1.3 Senzorické systémy

Čich je významně vyvinut již prenatálně a jedná se o primární smysl. Mláďata nicméně neumí rozlišit charakter čichového vjemu z důvodů nedostatečného počtu synaptických spojů mezi granulárními a mitrálními buňkami, toto může být příčinou nepoznání cizí matky v hnízdě (Calamandrei, 2004, Clarac et al., 2004). Vestibulární aparát je při narození rovněž nevyvinutý, i tak společně s čichem tvoří základní dva sensorické smysly u nezralé myši v prvních 2 týdnech života. Zajišťuje držení polohy pomocí posturálního svalstva trupu a končetin (Muir, 2000). Vestibulospinální dráhy dosahují lumbální části míchy prenatálně a jejich maturace pokračuje v průběhu dvou týdnů postnatálně. Zrak a sluch se plně zapojí až při otevření očí okolo 13. postnatálního dne, kdy nastává spojení vestibulárních a vizuálních vstupů s propioceptivními informacemi pro pohyb v prostoru (Clarac et al., 2004).

1.3.1.4 Motorické systémy

Základní vzory lokomoce jsou pozorovatelné již krátce po narození, i když nejsou ještě plně rozvinuty ve spontánní motorice mláďat (Vinay et al., 2005). Struktury podílející se na řízení motoriky nejsou zralé a vyvíjejí se i poté, co myši dosáhnou dospělého vzoru chůze (Jamon, 2006).

Vývoj lokomoce můžeme obecně rozdělit na 3 stádia (Clarac et al., 2004):

1. Fetální stádium, které nastupuje okolo 14. dne gestace a je pro něj charakteristická neorganizovaná aktivita svalů.
2. Nezralé stádium, počínající v době narození hlodavce, typické střídavou rytmickou aktivitou svalů. Ke konci tohoto stádia zaznamenává postura největší rozvoj.
3. Přechnodné stádium, od 10. do 15. postnatálního dne, typické otevíráním očí a motorikou přibližující se dospělci.

1.3.1.4.1 Vývoj descendentních drah

Descendentní dráhy mezi kortexem a míchou jsou rozpoznatelné týden před narozením. Sestup serotoninergních, noradrenergických a GABAergních retikulospinálních drah do lumbální oblasti nastává přibližně okolo 16. embryonálního dne. Souběžně s tím dorůstá i vestibulospinální dráha. V průběhu prvního postnatálního týdne dozrávají dráhy oblasti ventrálního funikulu, jež se účastní na lokomoci a posturální kontrole (Clarac et al., 2004). Kortikospinální dráha sestupuje do krční míchy třetí postnatální den a do lumbální míchy šestý postnatální den. Pozvolný sestup descendentních struktur naznačuje, že supraspinální řízení se bezprostředně po narození uplatňuje nejprve na proximálních svalech, zatímco kontrola distálních částí svalů se plně rozvíjí až během prvních dnů po narození. Je zde patrný tzv. proximo-distální a anteroposteriorní gradient (Clarac et al., 2004, Jamon, 2006).

Ačkoliv postnatální zrání neumožňuje plný rozsah lokomočních projevů již po narození, maturace neuromuskulárních spojů je nezastupitelná pro rozvoj jemných lokomočních pohybů v dospělosti. Nervosvalové ploténky jsou do druhého postnatálního týdne nezralé - převážně polyneurální (Clarac et al., 2004), což zapříčiňuje nestabilitu trupu během pohybu (Jamon, 2006). V průběhu třetího týdne dochází k rapidní změně v podobě unimodální inervace a separace svalových vláken do vyzrálých, funkčně odlišných typů (pomalá červená, rychlá bílá, rychlá červená). Separace a změna v inervaci svalových vláken postupuje od flexorových k extenzorovým skupinám svalů (Clarac et al., 2004).

1.3.1.4.2 Lokomoční aktivita

První projevy motoriky můžeme pozorovat již intrauterinně, kdy plod vykazuje pohybovou aktivitu trupu a končetin. Znamky koordinovaného pohybu můžeme pozorovat již dvacátý den gestace (Clarac et al., 2004). Motorické projevy po narození jsou charakterizovány rytmickými střídavými pohyby trupu a končetin, které jsou limitovány zralostí spinálních okruhů (Muir, 2000). Tyto nižší centrální okruhy, nazývané též jako generátory vzorců pohybů (CPG - central pattern generators), tvoří signály mezi svalovými antagonisty (Clarac et al., 2004). CPG lokalizované v krční míše řídí přední končetiny a CPG lokalizované v lumbální míše řídí zadní končetiny. CPG jsou tvořeny dvěma laterálními neuronálními sítěmi, které rytmicky stimulují

motoneurony prostřednictvím glutamátergních synapsí a inhibují motoneurony ipsilaterálních antagonistických svalů přes glycinergní komisurální interneurony (Jamon, 2006). CPG jsou aktivovány stimuly vyšších nervových center nebo vnějšími senzory vstupujícími. Jedná se o kontinuální koordinaci centrálních a periferních zpětnovazebných okruhů, která je nezbytná pro adaptaci organismu na vnější prostředí. Tuto lokomoční aktivitu můžeme sledovat například při krokovém automatismu při zavěšení ve vzduchu (tzv. air stepping). Tento lokomoční mechanismus se uplatňuje, přestože posturální kontrola ještě není vyvrážděná. To je důkazem, že míšní okruhy jsou již při narození schopné generovat střídavé pohyby a je již časné přítomno supraspinální řízení (Muir, 2000). Účinný pohyb se však nemůže dosud uskutečnit z důvodu absence posturálních mechanismů. Lokomoční pohyb blízký primitivním rytmickým pohybům lze také vyvolat při vystavení silné čichové stimulaci, například vůni matky (Clarac et al., 2004). Čichová stimulace může u mláďat vyvolat „air stepping“ a dokonce chůzi po zemi. Mláďata projevují silné tendence se pohybovat ve směru vůně matky již třetí postnatální den. Tato motorická reakce podobná chůzi je charakterizovaná zvednutím břicha a silným koordinovaným posouváním končetin (Jamon, 2006).

První spontánní pohyby předních končetin se objevují pátý den po narození. Zadní končetiny s pávní se pohybu neúčastní a jsou pasivní. Plazení se začíná objevovat počátkem druhého postnatálního týdne. Dvanáctý postnatální den můžeme pozorovat vzpřímenou polohu na čtyřech a počínající chůzi (Lelard et al., 2006). Pohyby jsou zpočátku pomalé a nepřesné. Zralý typ chůze můžeme pozorovat po otevření očí a běhání okolo šestnáctého postnatálního dne. Koncem druhého postnatálního týdne pozorujeme začátek vertikálních pohybů, tzv. rearing, kdy myš sedí na zadních končetinách a exploruje okolí (Clarac et al., 2004).

S vývojem lokomoce také souvisí rozvoj spontánní aktivity v „open field“ testu. První postnatální týden myši nejsou schopny pohybu. Druhý týden se jejich hybnost při možnosti plazení zvyšuje a počátkem třetího týdne lze u zvířat sledovat větší potřebu prozkoumávat okolí. Aktivita narůstá až do 21. dne života, kdy dochází k ustálení (Jamon, 2006).

1.3.1.4.3 Vývoj postury

Po narození jsou mláďata v pronační poloze s nataženými končetinami. Při otočení na záda jsou díky laterálním pohybům schopna se přesunout zpět do pronační pozice, nicméně nejsou schopna se napřímit a pohybovat po okolí. Posturální kontrola je výrazně nevyvinutá u novorozenečích myší a vyžívá v průběhu prvních dvou týdnů po narození (Vinay et al., 2005). Vzprímovací mechanismy se vyvíjí v rostrokaudálním a proximodistálním směru. Časnější vývoj předních končetin souvisí s udržení sací pozice při kojení. Od druhého dne života je už myš schopna krátce zvedat hlavu. Schopnost trvalé elevace pozorujeme od osmého dne po narození a je k ní zapotřebí stabilní opora o přední končetiny. Změna způsobu držení a pohybu hlavy nastává také v bezprostřední souvislosti s rozvojem orientace pomocí zraku (Clarac et al., 2004, Vinay et al., 2005).

Opora o distální části předních končetin se objevuje koncem prvního postnatálního týdne. Od devátého dne života se elevuje přední část trupu za podpory předních končetin a hlava se může zvednout do tzv. větrící polohy (sniffing). Dvanáctý den po narození jsou mláďata schopna zvednout jednu přední končetinu bez ztráty rovnováhy. Vzprímování za užití zadních končetin začíná ve druhém postnatálním týdnu. Třináctý den se na opoře trupu plně podílí zadní končetiny a elevuje se pánev. Dokončený vývoj posturální kontroly se objevuje koncem třetího postnatálního týdne (Clarac et al., 2004, Vinay et al., 2005).

Lokomoce je komplexní děj, který je závislý na koordinaci mnoha oblastí CNS. Pyramidové a extrapyramidové systémy (a především jejich vzájemná souhra) jsou hlavními systémy ovládajícími lokomoční aktivitu savců. Retikulospinální dráha je zodpovědná za základní motorickou aktivitu a kontrolu posturálních svalů. Vestibulospinální dráha se podílí na rovnováze, rubrospinální dráha na přesnosti a automatizaci pohybů a pyramidová dráha na jemné motorice a přesné úpravě volního pohybu (Jamon, 2006).

Reorganizace primárních nervových spojů (nezvládajících posturální požadavky) je omezujícím faktorem, který způsobuje pozdější nástup motorických dovedností u myší. Je zajímavé, že určité motorické schopnosti lze pozorovat dříve (např. v návaznosti na

čichový stimul). Na základě toho lze usuzovat, že některé neuronální okruhy jsou zralé dříve, než je možno pozorovat v samovolní motorice (Jamon, 2006).

1.3.1.5 Porovnání motorického vývoje s člověkem

Člověk se v děloze vyvíjí průměrně čtyřicet týdnů a dosáhne plné dospělosti završením adolescence. Vývoj myši do adolescence trvá šest týdnů, ze kterých tři týdny probíhají intrauterinně a tři týdny postnatálně. Člověk dospívá okolo dvacátého roku života, oproti tomu u myši se nejvíce vývojových změn odehraje v následujících třech týdnech postnatálního života. Motorický vývoj člověka a myši vykazuje značnou podobnost. Jeden postnatální den vývoje hlodavce zhruba odpovídá jednomu měsíci v motorickém vývoji člověka (Stadlin et al., 2003). Na druhou stranu je nutno brát v úvahu, že jednotlivé vývojové fáze mohou probíhat v různých úsecích ontogeneze a výše zmíněné porovnání poslouží především jako orientační. Vrchol neurogeneze u myši probíhá ve 13. a u člověka ve 43. embryonálním dni (Vinay et al., 2005). První den po narození myš dosahuje stupně zralosti CNS, která odpovídá přibližně 20. týdnu gestace člověka. V tomto týdnu prenatalního vývoje je však člověk pod hranicí viability.

Třetí den po narození myši odpovídá období, kdy se vytváří bílá hmota s axonálním pučením. U člověka tuto úroveň zralosti CNS můžeme sledovat mezi 24. a 28. týdnem gestace. Sedmý postnatální den myši u člověka odpovídá přibližně 30. – 34. týdnu gestace (Clarac et al., 2004, Vinay et al., 2005). Do úrovně zralosti CNS, která je srovnatelná s termínově narozeným novorozencem, tedy mezi 37. a 42. gestačním týdnem, se myš dostává přibližně v 10. postnatálním dnu (Yager & Thornhill, 1997).

Proliferace a migrace neuronů v mozku člověka probíhá v období mezi 4. a 24. týdnem gestace. Neurogeneze začíná v míše a mozkovém kmeni, postupuje rostrálně a rozšiřuje se na mozkovou kůru a limbický systém. Stejný proces u myši odpovídá období od 11. do 16. dne gestace, avšak rostrální progresse nastává až do 15. postnatálního dne. Tvorba synapsí u člověka začíná postupně během prvních gestačních měsíců, svého vrcholu dosahuje během 1-2 roku života a je ukončena až v adolescenci. Tento děj je u myši završen do tří týdnů postnatálního života. Myelinizace u lidí počíná 20. týdnem gestace a progreduje do časně adolescence. U myši je proces myelinizace započat během prvních dvou dnů života a pokračuje do dospělosti myši, dokonce i po opuštění hnízda po dokončeném 3. týdnu života (Vinay et al., 2005).

Neurotransmitery vedle synaptického přenosu hrají ve fázi vývoje mozku fundamentální roli při růstu a diferenciaci neuronů. Exprese NMDA receptorů začíná v oblasti hipokampu ve 20. gestačním týdnu, vrcholí ve 24. gestačním týdnu na své maximum a následně se dostává na konstantní úroveň v dospělosti. U hlodavců exprese počíná až po narození a vrcholí přibližně 10. postnatální den. Exprese non-NMDA receptorů začíná u člověka ve 24. gestačním týdnu, vrcholí v období porodu a následně se také dostává na konstantní úroveň v dospělosti. Exprese inhibičních i excitačních GABA receptorů u člověka začíná v 17. týdnu gestace a postupně narůstá, v období termínu porodu se dostává na 60 % exprese v dospělosti. U hlodavců je působení GABA převážně excitační až do prvního týdne života, kdy následně dominuje inhibiční účinek (Vinay et al., 2005).

Při srovnání vzájemných podobností je potřeba zdůraznit, že člověk i myš se z motorického hlediska rodí nezralí a motorický vývoj v obou případech progreduje rostrokaudálně. Myš je druhý den po narození schopna krátkodobě zvedat hlavu (Vinay et al., 2005). Tato schopnost je u kojence pozorovatelná ve 2. měsíci života (Kolář, 2009). Z hlediska motorického vývoje myši má první postnatální týden klíčovou roli, neboť dochází k sestupu descendentních drah do lumbální míchy. Tato vývojová fáze odpovídá 4. měsíci ontogenetického postnatálního vývoje u člověka (Vinay et al., 2005). Rotaci kolem vlastní osy pomocí horních končetin (tzv. pivotování) lze u myši sledovat na konci 1. postnatálního týdne a u člověka toto sledujeme začátkem 7. měsíce (Cíbochová, 2004). Chůze po čtyřech u myši počíná 12. postnatální den (Vinay et al., 2005). U člověka lze bipedální chůzi zaznamenat ve 12.-14. měsíci života (Kolář, 2009). U obou druhů není chůze v této fázi vývoje podobná chůzi dospělého a nastává další tříbení posturálního řízení (Vinay et al., 2005).

1.3.2 Historický vývoj zvířecích modelů

První pokusy popisující funkčně-morfologické důsledky hypoxie s využitím animálních modelů byly publikovány téměř před sto lety (Ferraro, 1933). Hurst si všiml, že injekce kyanidu draselného vede k „epizodám anoxie“ a to pak k poškození bílé hmoty (Hurst, 1940). V roce 1981 John E. Rice, Robert C. Vannucci a James B. Brierley poprvé popsali ve své publikaci model HI poškození u laboratorního potkana, též známý jako Rice-Vannucciho model (Rice et al., 1981). Rice-Vannucciho model a jeho adaptace je využíván již skoro čtyřicet let a doposud přináší významné poznatky v pochopení mechanismů HIE a také potenciálních terapeutických možností.

Rice-Vannucciho model je jedním z nejlépe prostudovaných a nejrozšířenějších zvířecích modelů HI poškození. Samotný model vznikl jako adaptace Levinova modelu HI poškození mozku u dospělého potkana ze šedesátých let (Levine, 1960).

Původní Rice-Vannucciho model využívá potkana kmene Sprague-Dawley, kdy se sedmý den po narození provede jednostranný podvaz společné krkavice (a. carotis communis) s následnou expozicí hypoxickému prostředí (8% kyslík) po dobu 3,5 hodin při teplotě 37°C. V původním modelu bylo poškození mozku nalezeno typicky v ipsilaterální hemisféře už 50 hodin po HI inzultu. Poškození postihuje kortex, šedou hmotu v oblasti striata a thalamu, dále periventrikulární bílou hmotu a hipokampus (90 % zvířat) (Rice et al., 1981).

V průběhu let došlo k mnoha adaptacím Rice-Vannucciho modelu. Hlavním důvodem byla snaha upravit hlodavčí model tak, aby co nejlépe simuloval patofyziologické procesy u člověka. První adaptace v roce 1996 pracovala s jednodenními potkaními mláďaty a umožnila popis patofyziologických změn v reakci na HI inzult v období, které odpovídá 3. trimestru intrauterinního vývoje člověka, kde byly prokázány podobné charakteristiky poškození mozku jako v případě PVL u předčasně narozených dětí (Dobbing & Sands, 1979, Sheldon et al., 1996, Volpe, 2009). Následně se do popředí zájmu dostalo studium myších kmenů – v roce 1998 se staly myši kmene CD1[®] IGS (Anti-cancer Centre, Lausanne, Švýcarsko, 1920) vhodným kandidátem pro modifikaci Rice-Vannucciho modelu z důvodu vysoké vulnerability vůči HI inzultu a zároveň velice nízké mortality (Sheldon et al., 1998).

V roce 1999 byl představen nový model s názvem BCAO (zkráceno z anglického „bilateral common carotid artery occlusion“), který využíval oboustranný podvaz společné krkavice u pětidenního potkana kmene Wistar bez následné expozice hypoxickému prostředí (Uehara et al., 1999). Autoři modelu se snažili reprodukovat HI inzult u člověka vedoucí k izolovanému snížení průtoku krve s postižením dominantně bílé hmoty. BCAO model sníží průtok krve mozkiem o 25 % a vede k mírnému difuznímu poškození bílé hmoty u přibližně 2/3 potkanů a k závažným nekrotizujícím změnám a cystickým lézím u 1/3 potkanů, v obou případech s intaktní šedou hmotou. Oproti tomu Rice-Vannucciho model sníží průtok v podkorové bílé hmotě o 60 % a vede k vážnému poškození bílé a šedé hmoty (Vannucci et al., 1988). Bohužel nebylo možné od uvedení tento model reprodukovat a nedošlo k jeho rozšíření. V průběhu let došlo k jeho modifikacím, nicméně také bez širšího dopadu (Rumajogee et al., 2016).

V roce 2000 Follet a kolektiv (Follett et al., 2000) upravili Rice-Vannucciho model pro simulaci ještě mírnějšího poškození mozku (6% kyslík po dobu 1 hodiny při teplotě okolí 33-34 °C) a popsali, že zánik oligodendrocytů úzce souvisí s aktivací glutamátových AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina) receptorů. Největší míra poškození byla popsána u potkanů, u kterých došlo k HI inzultu 7. postnatální den, kde prokázali největší expresi AMPA receptorů na oligodendrocytech oproti testovanému HI inzultu 4. a 11. postnatální den. Vysvětluje se to konkrétním zastoupením nezralých forem oligodendrocytů a jejich prekurzorů, konkrétně v této časové periodě vývoje mozku. Při užití antagonisty AMPA receptorů (NBQX, vysoce selektivní kompetitivní antagonist AMPA a kainátových receptorů) došlo u skupiny s indukovanou hypoxií sedmý postnatální den ke snížení intenzity poškození mozku. Nikoliv ovšem u zbylých dvou skupin. U člověka toto období, tedy přítomnost nezralých oligodendrocytů a jejich prekurzorů se zvýšenou densitou receptorů, nalezneme mezi 24. a 32. gestačním týdnem těhotenství (Shen et al., 2012). Pro studium možné interakce mezi hypoxií a infekcí Eklind a kolektiv autorů (Eklind et al., 2001) aplikoval sedmidenním potkanům před indukovanou hypoxií lipopolysacharidový komplex (LPS). Kombinace LPS a hypoxie vedla k závažnějšímu poškození mozku.

Navzdory výše uvedeným úvahám zůstává Rice-Vannucciho myší model pro danou oblast nepostradatelný. Nejprve však musí být stanoven jasně definovaný rozsah načasování, stupně a trvání hypoxie, standardních chirurgických postupů a zvážení použitého druhu a věku zásahu. Dokud tomu tak nebude, je třeba postupovat opatrně při porovnávání dat napříč studii využívajícími tento model. V současné době variabilita pozorovaná v literatuře ve vztahu k výše uvedeným parametrům modelu ztěžuje porovnání dosažených výsledků.

1.3.3 Morfologické ukazatele poškození mozku

Kombinace unilaterálního podvazu společné krkavice a hypoxie vede k poškození ipsilaterální hemisféry mozku. Intenzita poškození je závislá na mnoha faktorech, mezi které patří: doba strávená v hypoxickém prostředí, věk, kmen hlodavce nebo pohlaví (Rice et al., 1981).

Intenzitu poškození můžeme rozdělit na mírnou, střední a závažnou. Rozdělení do těchto tří základních skupin je odrazem snahy určité unifikace na vědecko-výzkumném poli. Hlavním kritériem je velikost zasažené oblasti. Pro účely této charakterizace se mozek rozděluje na tři hlavní struktury: mozková kůra, hipokampus a podkorová bílá hmota. Při mírném poškození je zasažen dominantně hipokampus, kde dochází ke ztrátě především v pyramidových buňkách

v CA1 a CA3 oblastech, v podkorové bílé hmotě se vyskytují lokalizovaná až difúzní ložiska poškození, nicméně kortex zůstává nedotčen. V případě selektivního poškození kortexu mluvíme již o středně závažném poškození. Vedle kortexu progreduje poškození hipokampu a podkorové bílé hmoty. V případě poškození všech 3 sledovaných oblastí řadíme poškození mezi závažná.

Přesnou metodu hodnocení tvoří kvalitativní histopatologické skórování. Užitečným je skórování dle Sheldona (Sheldon et al., 2018), kdy se histologicky zpracované preparáty definovaných anatomických oblastí (kortex, striatum, CA1, CA2 a CA3 oblasti hipokampu, gyrus dentatus) hodnotí od 0, bez poškození, do 3, které představuje difúzní infarktové léze. Celkové skóre se následně porovná s kontrolní skupinou. Velice perspektivní je kvantitativní hodnocení ztráty neuronální tkáně, v anglické literatuře často označováno jako „loss area analysis”. Po histologickém obarvení jsou preparáty naskenovány ve vysokém rozlišení a porovná se úbytek nervové tkáně, nejčastěji v porovnání s kontralaterální hemisférou (Regan et al., 2007, Dobrivojević et al., 2013).

Imunohistochemické zpracování za užití DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride, jaderné imunofluorescenční barvení) nebo NeuN (Neuronal nucleal antigen) významně doplňují konvenční metody histologického zpracování.

1.3.4 Behaviorální testování – test otevřeného pole

Studie zabývající se chováním zvířat (behaviorální testování) mají své zastoupení při studiu změn v chování a ovlivnění sledovanými faktory. Mezi tyto faktory patří například: hypoxie, farmaka nebo změny prostředí.

Významným zástupcem je tzv. test otevřeného pole. Test otevřeného pole můžeme chápat jako obecně přijímané paradigma pro měření explorativního (tj. své prostředí zkoumajícího) chování. Princip testování je velmi jednoduchý, hlodavec se umístí do nového prostředí neboli *arény*, kde se monitorují změny jeho chování. Sledovány mohou být jednotlivé domény chování, kam se řadí lokomoce (doba strávená pohybem), vzdálenost, kterou hlodavec urazí, panáčkování, péče o sebe sama nebo také lezení (Andersen et al., 2000, Gellért & Varga, 2016). Vedle explorativního chování je možné sledovat také anxietu (Seibenhener & Wooten, 2015). Pokud je zvíře umístěno do otevřeného pole opakovaně, lze testovat habituaci (tj. zvyknutí na nové prostředí), nebo rozpoznávání nových objektů. Test otevřeného pole má mnoho variant a

úprav. Pro pozorování anxiety se využívá např. vyvýšené křížové bludiště (Elevated Plus Maze – EPM), kde na základě celkového času stráveného v otevřených a uzavřených ramenech se vytvoří kontrolní hodnoty – tzv. indexy, které se porovnávají s experimentální skupinou (Walf & Frye, 2007). EPM se osvědčil například při testování benzodiazepinů (BZD), kde u testovaných jedinců s aplikací BZD došlo ke zvýšení doby strávené v otevřených ramenech (Rodgers et al., 1992). Morrisovo vodní bludiště bylo využito při studiu prostorové paměti, nebo radiální bludiště, které bylo využito při testování pracovní a referenční paměti a jejich vztahů k hipokampu (Nunez, 2008).

Vedle samotných variant testu otevřeného pole se vynakládá značné úsilí na digitalizaci procesu zaznamenávání získaných dat. Dříve vyhodnocování jednotlivých domén chování zaznamenával pozorovatel. Mezi hlavní nevýhody tohoto vyhodnocování patří veliká subjektivita, chybovost, časová náročnost, rušivý faktor pozorovatele nebo nutnost osvětlení (Martin & Bateson, 1986). Dalším významným faktorem je také odlišnost cirkadiálního rytmu, kdy aktivita hlodavců přetrvává v nočních hodinách a observační studie probíhaly převážně ve dne. Do popředí se díky technologickému rozvoji dostaly automatizované systémy s pohybovými senzory se schopností identifikovat a zaznamenat jednotlivé domény chování. Přesná identifikace pohybových vzorců automatizovanými systémy, aniž by experimentální zvíře bylo rušeno pozorovatelem, zásadním způsobem zpřesňuje a zlepšuje naměřená data.

Předním zástupcem je systém LABORAS (z angl. *Laboratory Animal Behaviour Observation, TM Registration, and Analysis System*, LABORASTM, Metris, Hoofddorp, Holandsko). Jedná se o sofistikované zařízení, které detekuje, kvantifikuje a klasifikuje různé domény chování laboratorních myší a potkanů. Mezi pozorované domény chování patří doba strávená pohybem – lokomoce (z angl. *locomotion*), celková vzdálenost, kterou zvíře projde ve sledovaném časovém intervalu (z angl. *distance*), příjem potravy, příjem tekutin, panáčkování (z angl. *rearing*), lezení po mřížce stropu klece (z angl. *climbing*), péče o sebe sama (z angl. *grooming*) a mnohé další. Jednou z podstatných výhod tohoto přístroje je jeho neinvazivnost. Zvíře se pohybuje v definované areně (tvořené plastovou schránkou/klecí 37x21x24 cm). Tato schránka je položena na trojúhelníkovité podložce (z karbonových vláken 70x70x100x3 cm). Podložka je pak položena na silové převodníky (detektory). Pohyb zvířete vyvolává vibrace, které jsou podložkou snímány, zesilovány, převáděny na elektrické signály a digitalizovány. Získaná data jsou pak softwarovým vybavením LABORASu roztríděna do jednotlivých kategorií. Systém ve zvoleném časovém úseku detekuje rychlost pohybu zvířete (maximální a průměrnou),

vzdálenost, kterou zvíře urazilo, případně vyhodnotí distribuci pohybu po areně. Pokročilejší nastavení systému pak umožňuje stanovit i počty „wed dog shakes“ specifického otřásání zvířete typického například u aplikace kainátu. Získaná data lze hodnotit v různých časových intervalech (např. sumárně za celou dobu experimentu anebo v jednominutových úsecích) a zvíře sledovat teoreticky neomezenou dobu. Open field test lze provádět i opakovaně v různých časových odstupech (24 hodin, týden apod.). Systém LABORAS se stal od roku 1996 standardem na poli zvířecího výzkumu chování. Je používán ve více než 60 vyspělých zemích po celém světě (Quinn et al., 2003, Quinn et al., 2006).

2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

2.1 Hypotézy

- I. Hypoxie kombinovaná s ischemií povede k behaviorálním změnám v testu otevřeného pole u sedmidenní myši kmene C57BL/6NTac a tyto změny budou pozorovatelné v dospělosti.
- II. Izolovaná ischemie nepovede k behaviorálním změnám v testu otevřeného pole u sedmidenní myši kmene C57BL/6NTac a tyto změny nebudou pozorovatelné v dospělosti.
- III. Izolovaná hypoxie nepovede k behaviorálním změnám v testu otevřeného pole u sedmidenní myši kmene C57BL/6NTac a tyto změny nebudou pozorovatelné v dospělosti.

2.2 Cíle práce

- I. Ověřit u experimentálních skupin vliv hypoxie kombinované s ischemií (modifikovaný Rice-Vannucciho model) na změny pozorovaných domén chování v testu otevřeného pole u myši kmene C57BL/6NTac obou pohlaví.
- II. Ověřit u experimentálních skupin vliv izolovaného podvazu jedné společné karotidy nebo izolované expozice hypoxii na změny pozorovaných domén chování v testu otevřeného pole u myši kmene C57BL/6NTac obou pohlaví.
- III. Porovnat vztah mezi morfologickými změnami a změnami jednotlivých domén chování v testu otevřeného pole u myši kmene C57BL/6NTac.
- IV. Ověřit u experimentálních skupin vliv pohlavně vázaných rozdílů na změny jednotlivých domén chování v testu otevřeného pole u myši kmene C57BL/6NTac.

3 METODIKA

3.1 Pokusná zvířata

Ke všem zvířatům zařazeným do experimentu bylo přistupováno v souladu s legislativou ČR a Evropské Unie [European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Council of Europe No. 123, Strasbourg 1985)], projekt pokusu této studie byl schválen Komisí pro práci s pokusnými zvířaty 1. LF UK a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy pod číslem jednacím MSMT- 11196/2020-2.

Všechny pokusy byly prováděny ve Fyziologickém ústavu 1. LF UK na myších kmene C57BL/6NTac (celkem počet: 69, samci počet: 42, samice počet: 27). Použitý myší kmen byl získán z Centra pro experimentální biomodely 1. LF UK.

Myši byly chovány ve zvířetníku za standardních podmínek. Prostředí chovu bylo regulováno ve více parametrech (teplota 22 ± 2 °C, vlhkost 55 ± 10 %, periody tmy a světla se střídaly po 12 hodinách). Myši byly chovány v plastických akváriích s pilinovou podestýlkou (30 x 30 x 40 cm) a s volným přístupem k vodě a potravě. Veškerá pozorování a zásahy byly prováděny mezi 08:00 a 12:00 hodinou dopoledne. Mláďata byla kojena matkou a odstavena na konci třetího týdne. Používali jsme myši ve věku 7 a 60 dní. Den narození (PND) byl počítán jako nultý den.

3.2 Expozice hypoxicko-ischemickému poškození mozku

Pro účely práce jsme využili model podle Rice-Vannucciho, přizpůsobený a upravený pro práci s myši (Ditelberg et al., 1996, Zhu et al., 2009). Sedmidenní myší mláďata podstoupila jednostranný podvaz pravé společné krkavice a byla vystavena hypoxickému inzultu pobytém v komoře s 8% obsahem kyslíku (kalibrovaný plyn Linde Gas). Myši byly pro účely této práce rozděleny do 4 experimentálních skupin: první skupina podstoupila podvaz společné krkavice společně s expozicí hypoxickému prostředí [CA/H] (kopíruje Rice-Vannucciho model); druhá skupina podstoupila pouze podvaz společné krkavice [CA/-]; třetí byla pouze exponována hypoxickému prostředí [-/H]; a poslední skupina sloužila jako kontrolní, tedy nebyl u ní proveden podvaz ani nebyla exponována hypoxickému prostředí [-/-], absolvovala však pobyt v hypoxické komoře a podstoupila operační výkon.

3.2.1 Podvaz společné krkavice

Sedmý postnatální den (PND7) podstoupily myši chirurgický výkon spočívající v podvazu pravé společné krkavice (a. carotis communis dextra). V průběhu výkonu byla tělesná teplota zvířat udržována na 36,5 °C za použití vyhřívané podložky. Jako anestetikum byl aplikován isofluran (5 % koncentrace pro úvod do anestezie, 2 % koncentrace pro udržení anestezie) za pomoci nosní masky (inhalační systém EZ-SA800, AnLab, Praha, Česká republika), maska byla šetrně fixována ke hřbetu fixační páskou Micropore. Kůže v oblasti řezu byla dezinfikována Betadine (10% roztok jódovaného povidonu), s použitím chirurgického skalpelu byl následně proveden řez na krku podél střední čáry vpravo. Podkožní tuk a svalstvo v místě výkonu byly šetrně odsunuty z operačního pole pomocí chirurgické pinzety. V následující vrstvě podél střední čáry byla ozřejmena pravá společná krkavice a následně odpreparována od žíly, bloudivého nervu a okolních měkkých struktur opět za použití chirurgické pinzety. Následně byla tepna šetrně přerušena pomocí elektrokoagulace (Electrosurgical unit 1E, KENTAMED Ltd., Plovdiv, Bulharsko). V závěru výkonu byla rána uzavřena vstřebatelným stehem o síle 6-0. Po dokončeném výkonu byla mláďata ponechána do probuzení na vyhřívané podložce a následně byla vrácena na 1 hodinu k matce ke zotavení. Mláďata ze skupiny [-/H] a [-/-] absolvovala výkon také s výjimkou podvazu pravé společné krkavice. Chirurgický výkon trval v průměru 6 minut.

3.2.2 Expozice hypoxickému prostředí

Po zotavení z chirurgického výkonu hodinovým pobytem u matky byla mláďata umístěna do hypoxické komory. Po dobu úvodních 10 minut byl v komoře zachován normální přívod vzduchu. Koncentrace kyslíku byla následně snížena na 8 % smísením vzduchu s dusíkem na kalibrovanou směs (Linde Gas, Praha, ČR) po dobu 70 minut. Po indukci hypoxie byla koncentrace z 8 % opětovně navýšena na koncentraci kyslíku v normálním vzduchu na dobu 10 minut. V průběhu celého procesu byla v komoře udržována stabilní teplota 36 °C. Mláďata byla posléze přemístěna z hypoxické komory zpět k matkám, kde setrvala až do odstavení (PND21). Mláďata ze skupin [CA/-] a [-/-] rovněž absolvovala pobyt v hypoxické komoře ve stejné době trvání bez expozice 8% koncentraci kyslíku.

3.3 Analýza chování – test v otevřeném poli

Pro pozorování domén chování myši a zhodnocení schopnosti vyrovnat se novými podněty jsme využili automatizovaný systém pro dlouhodobou observaci chování drobných hlodavců v laboratorních podmínkách s názvem LABORAS (z angl. *Laboratory Animal Behaviour Observation, TM Registration, and Analysis System*, LABORAS™, Metris, Hoofddorp, Holandsko). Změny chování byly sledovány 60. postnatální den (PND60). Celková doba pozorování byla 20 minut. V průběhu tohoto 20minutového intervalu byla zvířata ponechána bez rušivých podmětů v klidném prostředí. Po dokončeném testování byla navrácena do svých plastických akvárií. Byly pozorovány tyto domény chování: doba strávená pohybem, celková vzdálenost, panáčkování a lezení. Jednotlivé domény chování byly rozděleny do čtyř po sobě následujících pětiminutových intervalů (0-5 min, 5-10 min, 10-15 min a 15-20 min) a hodnoceny samostatně.

3.4 Perfuze a histologické zpracování tkáně

Pro účely histologické analýzy byly z každé pracovní skupiny vybráni čtyři samci a čtyři samice. Následující den po analýze chování v systému LABORAS (PND61) byly myši uspány intraperitoneální injekcí thiopentalu v dávce 40mg/kg tělesné hmotnosti. Bezprostředně poté byla provedena transkardiální perfuze ledovým fyziologickým roztokem (0,9% roztok NaCl) následovaná fixací pomocí chlazeného 4% paraformaldehydu rozpuštěného v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,4. Mozky byly vyjmuty z kalvy a fixovány v 4% paraformaldehydu přes noc. Fixované vzorky byly prosyceny v 20% roztoku sacharózy po dobu 24 hodin. Koronární řezy o síle třiceti mikrometrů byly pořízeny na kryostatu (Leica CM 3050S, Leica Biosystems, Nussloch, Německo) a přeneseny na podložní sklička.

3.4.1 Nisslovo barvení

Každý připravený preparát mozkové tkáně byl obarven kresolovou violetí (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Tkáňové vzorky umístěné na podložních sklíčkách byly dehydratovány ve vzestupné řadě etanolů (70 %, 80 % a 96 %) vždy 2 minuty v každé koncentraci a obarveny Nisslovým barvením (1% kresolová violet, 0,2 mol/l kyselina octová, a 0,2 mol/l octan sodný, 4:1, pH=3) po dobu 20 minut. Po dosažení požadované intenzity barvení byly vzorky dvakrát promyty destilovanou vodou a sestupnou řadou etanolů (96 %, 80 % a 70 %) vždy 2 minuty v

každé koncentraci. Následně byla sklíčka ponořena na 5 minut do xylenu (Penta s.r.o., Praha, ČR), poté byla inkubována v jiné nádobě s xylenem dalších 45 minut. Za použití fixačního média Roti-Histokitt II (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo) byly vzorky překryty krycím sklíčkem.

V rámci histologické analýzy byly zkoumány následující oblasti mozku: kortex, oblasti CA1 a CA3 hipokampu, hilus gyrus dentatus, ventrální list gyrus dentatus a dorsální list gyrus dentatus.

3.5 Statistická analýza

Statistické zpracování dat bylo provedeno s využitím softwaru GraphPad Prism verze 8 (GraphPad Software, Inc., CA, USA). Pro analýzu spontánního chování myši a k detekci pohlavně vázaných rozdílů byla využita dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post-hoc test. Hodnoty p nižší než 0.05 byly považovány za statisticky signifikantní. Data byla prezentována jako průměry \pm standardní odchylka (SEM).

4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza chování

4.1.1 Doba strávená pohybem (locomotion)

Výsledky jednotlivých skupin jsou znázorněny v **Obr. 4, Obr. 5, Tab. 5 a Tab. 6.**

Samci ve všech stanovených skupinách [CA/H, CA/-, -/H] strávili delší dobu pohybem (lokomoce) v porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. U samců skupin [CA/H] a [CA/-] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.001$) a faktoru četnosti ($p < 0.01$), Bonferroniho post-hoc test prokázal vyšší lokomoční aktivitu mezi 1. a 5. minutou v porovnání s kontrolami ($p < 0.05$) (Obr. 4: A a C). U samců skupiny [-/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.001$) a v interakci mezi faktory ($p < 0.05$), Bonferroniho post-hoc test prokázal vyšší lokomoční aktivitu mezi 1. a 5. minutou testu v porovnání s kontrolami ($p < 0.01$) (Obr. 4: E).

Samice ve skupinách [CA/H] a [CA/-] strávily delší dobu pohybem (lokomoce) v porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. U samic skupiny [CA/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.05$) (Obr. 4: B). U samic skupiny [CA/-] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.01$) a faktoru četnosti ($p < 0.01$) (Obr. 4: D). U samic skupiny [-/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 4: F).

Samci ve všech stanovených skupinách [CA/H, CA/-, -/H, -/-] strávili delší dobu pohybem (lokomoce) v porovnání se samicemi. Dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly: ve skupině [CA/H] ve faktoru času ($p < 0.01$) (Obr. 5: A), ve skupině [CA/-] ve faktoru času ($p < 0.001$) (Obr. 5: B), ve skupině [-/H] ve faktoru času ($p < 0.001$) a faktoru pohlaví ($p < 0.01$) (Obr. 5: C), Bonferroniho post-hoc test prokázal v této skupině vyšší lokomoční aktivitu mezi 1. a 5. minutou testu ($p < 0.05$) (Obr. 5: C), a v kontrolní skupině [-/-] ve faktoru času ($p < 0.001$) (Obr. 5: D).

4.1.2 Panáčkování (rearing)

Výsledky jednotlivých skupin jsou znázorněny v **Obr. 6, Obr. 7, Tab. 5 a Tab. 6.**

Samci ve skupině [CA/H] strávili kratší dobu panáčkováním v porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. Dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru četnosti ($p < 0.05$) (Obr. 6: A). U samců skupin [CA/-] a [-/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 6: C a E). U samic všech třech skupin [CA/H, CA/-, -/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 6: B, D a F).

Samci ve skupině [CA/-] strávili kratší dobu panáčkováním v porovnání se samicemi, dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíl ve faktoru času ($p < 0.05$) (Obr. 7: B). Pohlavně vázané rozdíly v době panáčkování nebyly prokázány ve zbývajících skupinách [CA/H, -/H, -/-] (Obr. 7: A, C a D).

4.1.3 Vzdálenost (distance)

Výsledky jednotlivých skupin jsou znázorněny v **Obr. 8, Obr. 9, Tab. 5 a Tab. 6.**

Samci ve všech třech stanovených skupinách [CA/H, CA/-, -/H] urazili delší vzdálenost v porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. U samců skupin [CA/H] a [CA/-] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.001$) a faktoru četnosti ($p < 0.01$). Bonferroniho post-hoc test prokázal delší uraženou vzdálenost u samců skupiny [CA/-] mezi 1. a 5. minutou v porovnání s kontrolami ($p < 0.05$) (Obr. 8: A a C). U samců skupiny [-/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.001$), Bonferroniho post-hoc test prokázal delší uraženou vzdálenost mezi 1. a 5. minutou testu v porovnání s kontrolami ($p < 0.05$) (Obr. 8: E).

U samic skupiny [-/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru četnosti ($p < 0.05$) (Obr. 8: F). Ve zbývajících skupinách [CA/H, CA/-] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 8: B a D).

Samci ve skupinách [CA/H, CA/-, -/H] urazili delší vzdálenost v porovnání se samicemi. U skupiny [CA/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.05$) (Obr. 9: A). U skupiny [CA/-] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)

prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.001$) (Obr. 9: B). U skupiny [-/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.001$) a pohlaví ($p < 0.001$), Bonferroniho post-hoc test prokázal delší uraženou vzdálenost u samců mezi 1. a 5. minutou testu ($p < 0.01$). (Obr. 9: C). U kontrolní skupiny byly prokázány signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.05$) (Obr. 9: D).

4.1.4 Šplhání (climbing)

Výsledky jednotlivých skupin jsou znázorněny v **Obr. 10, Obr. 11, Tab. 5 a Tab. 6**.

U samců ve skupině [CA/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru četnosti ($p < 0.05$) (Obr. 10: A). U zbylých skupin [CA/-, -/H] nebyly u samců prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou [-/-] (Obr. 10: C a E). U samic všech třech skupin [CA/H, CA/-, -/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 10: B, D a F).

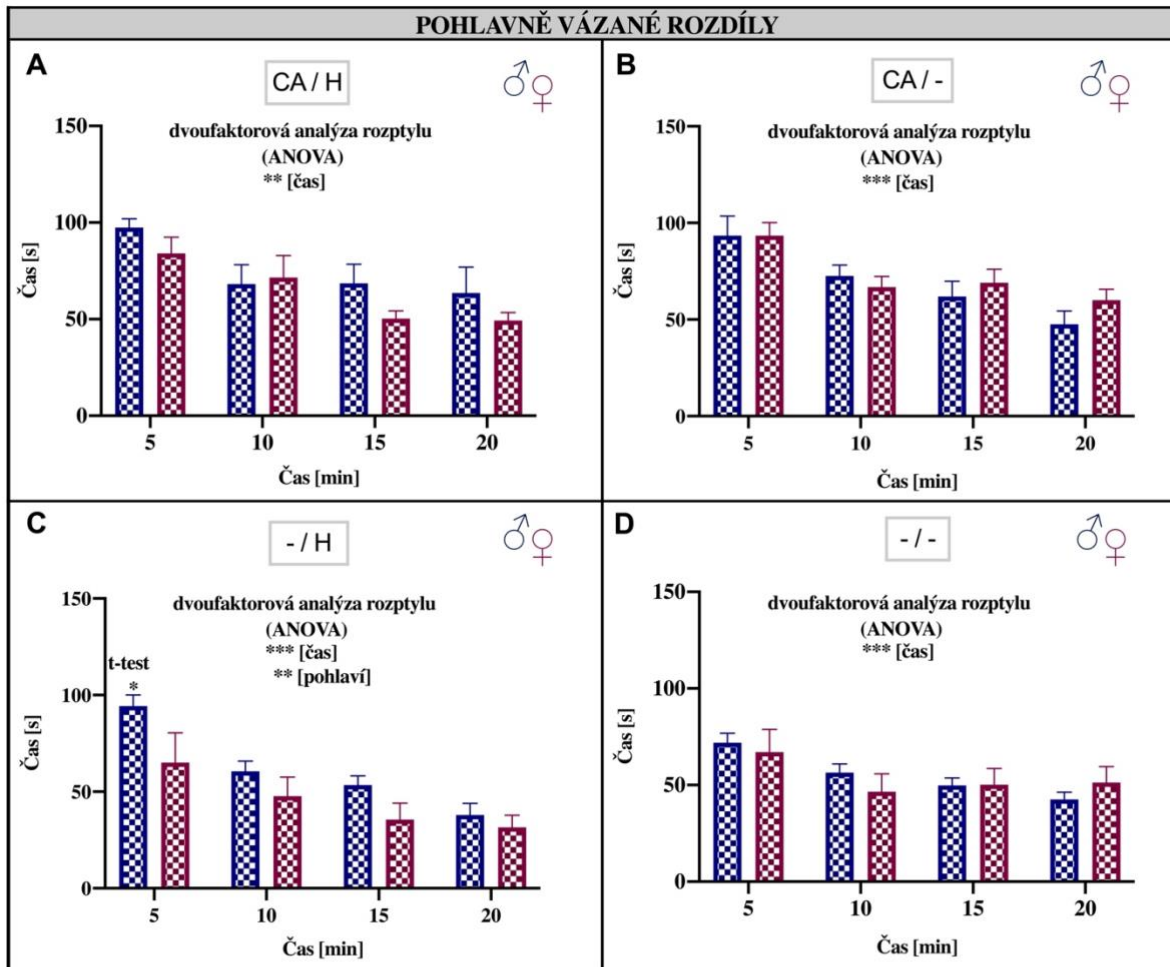
Samice ve skupinách [CA/H, CA/-, -/H] vykazaly vyšší intenzitu šplhání v porovnání se samci, dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru pohlaví ($p < 0.05$) (Obr. 11: A, B a C). Mezi kontrolními skupinami nebyly prokázány žádné signifikantní rozdíly (Obr. 11: D).

4.2 Morfologická analýza

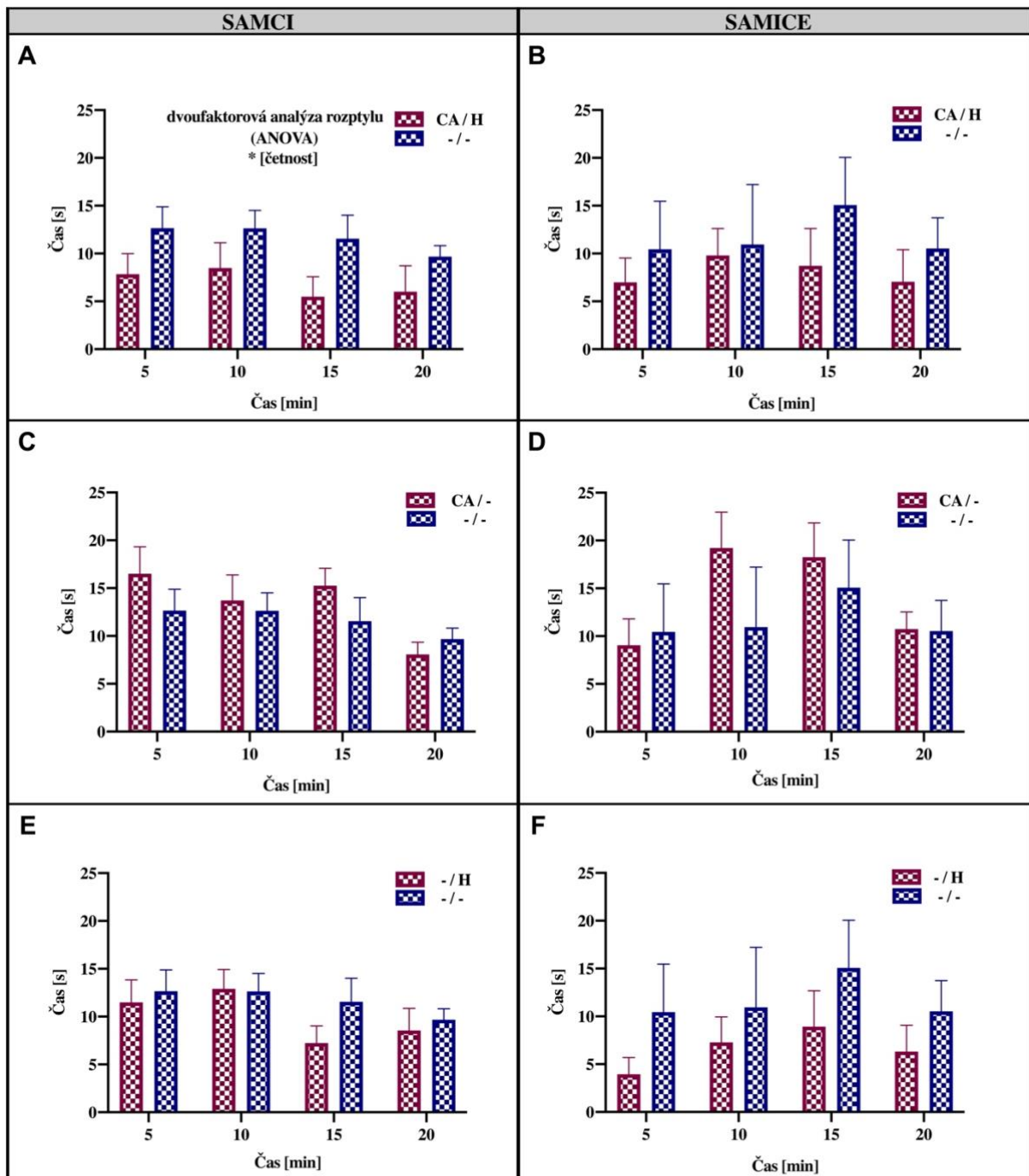
Mezi hodnocené oblasti byly zařazeny kortex, oblasti CA1 a CA3 hipokampu, hilus a dorsální a ventrální listy gyrus dentatus. Strukturální poškození bylo omezeno pouze na hemisféru ipsilaterální k místu ligace společné krkavice ve skupině [CA/H]. Patologické změny se projevíly jako četné pyknózy a fragmentace buněčných jader. Nisslova substance byla degradována vakuolizacemi a porušením buněčné sítě. Morfologické charakteristiky zahrnovaly také chaotické uspořádání buněk, vymizení jader a významnou ztrátu celkového objemu buněk. Byl pozorován jasný úbytek počtu buněčných elementů a zchovalé pyramidové buňky byly překryty buněčným detritem.

Naproti tomu ve skupinách [CA/-], [-/H] a [-/-] nebyly pozorovány žádné známky neuronálního poškození ani apoptózy ve zkoumaných oblastech mozku. Buňky hipokampu si zachovaly charakteristické uspořádání i tvar. Nisslova substance se optimálně sytila při barvení a byla

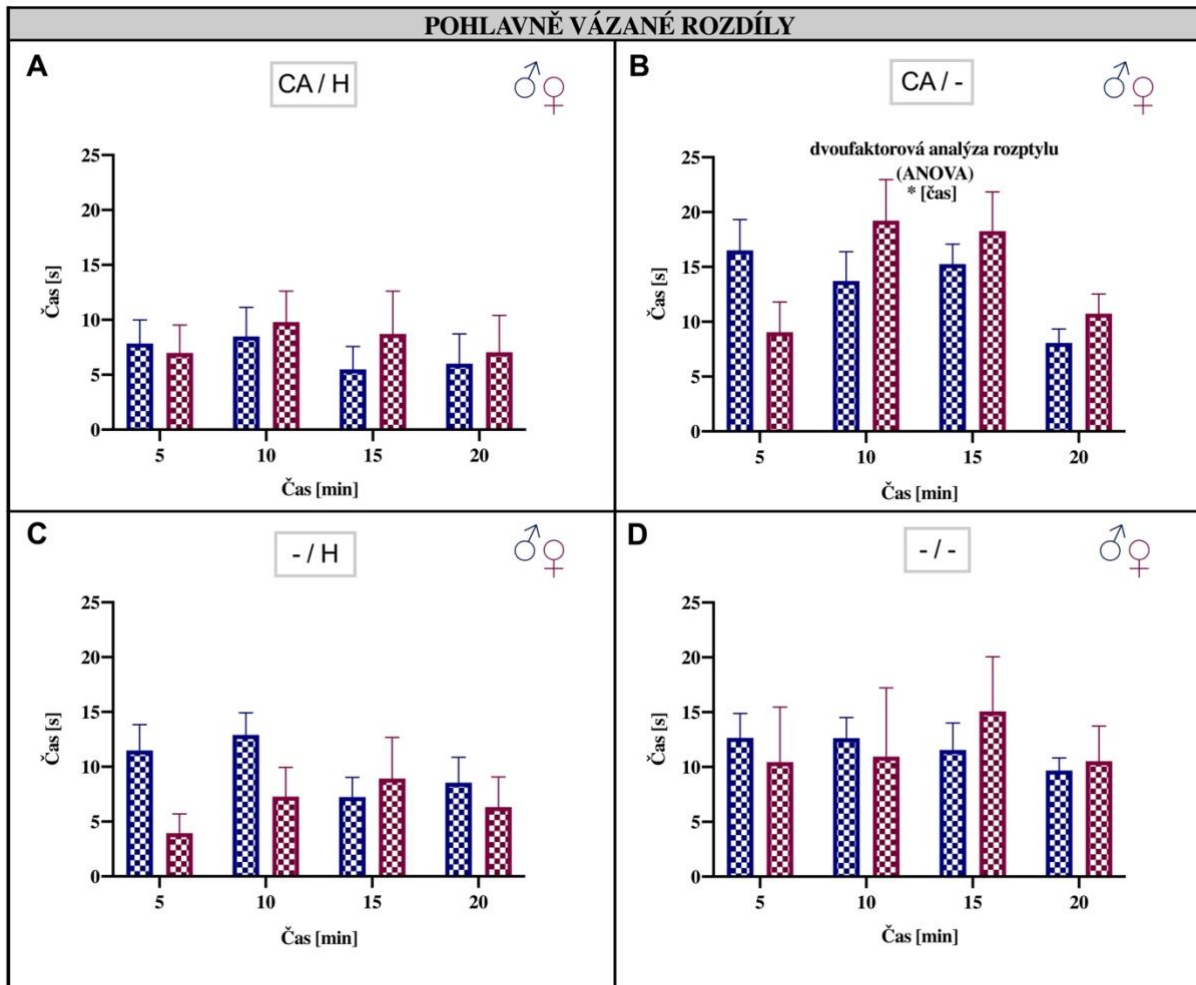
rovnoměrně rozprostřena okolo jader bez pozorovatelných výpadků. Struktura buněk odpovídala normě včetně jejího uspořádání, jádra byla jasně zřetelná (Obr.12 a Obr. 13).



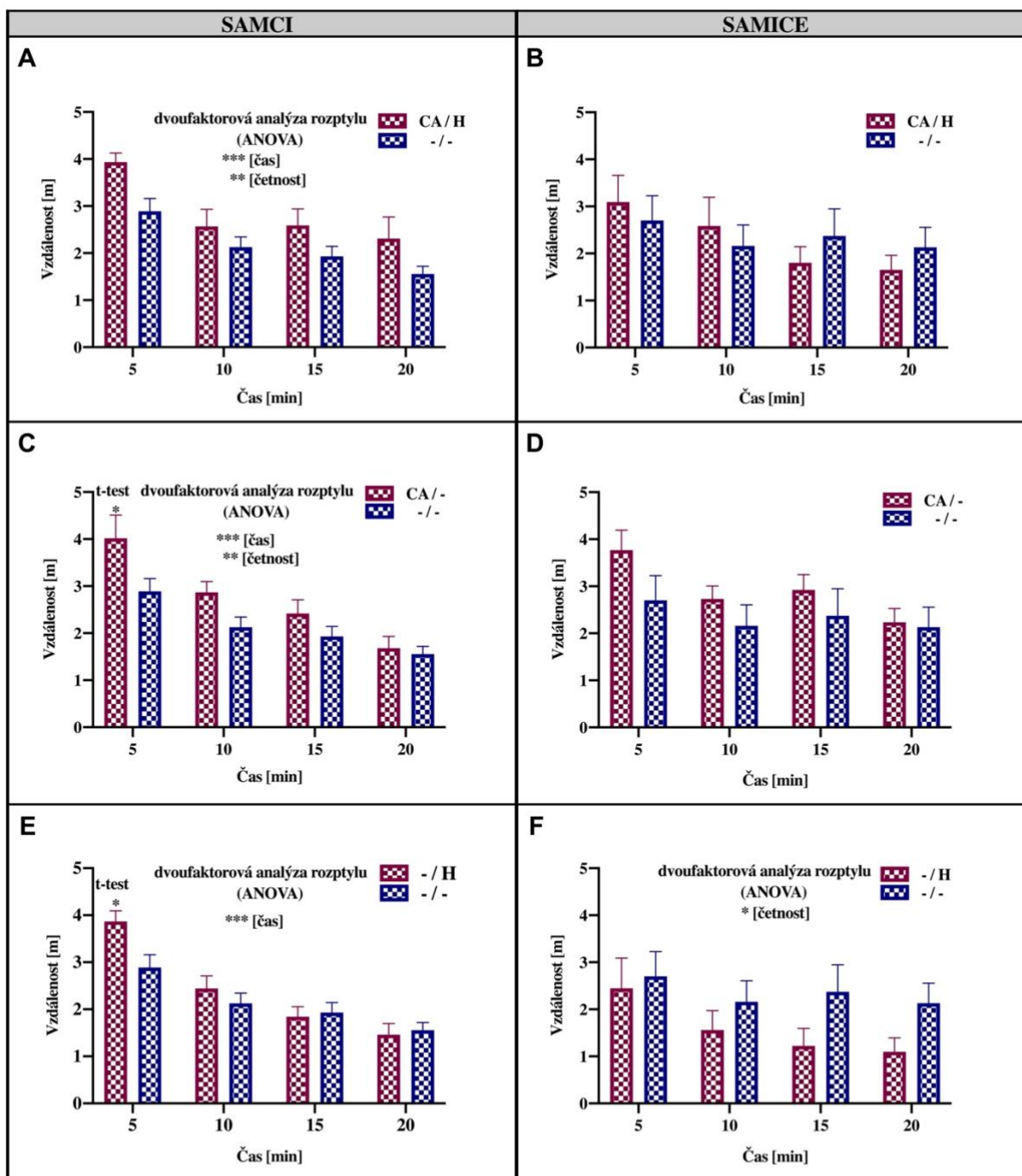
Obrázek 5: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na lokomoci myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Pohlavně vázané rozdíly skupin [CA/H], [CA/-], [-/H], [-/-] jsou zobrazeny na grafech A, B, C a D. Signifikantní rozdíly dvoufaktorialné analýzy rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post hoc testu zobrazeny jako * (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.001$). Data prezentována jako průměr \pm SEM. [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.**



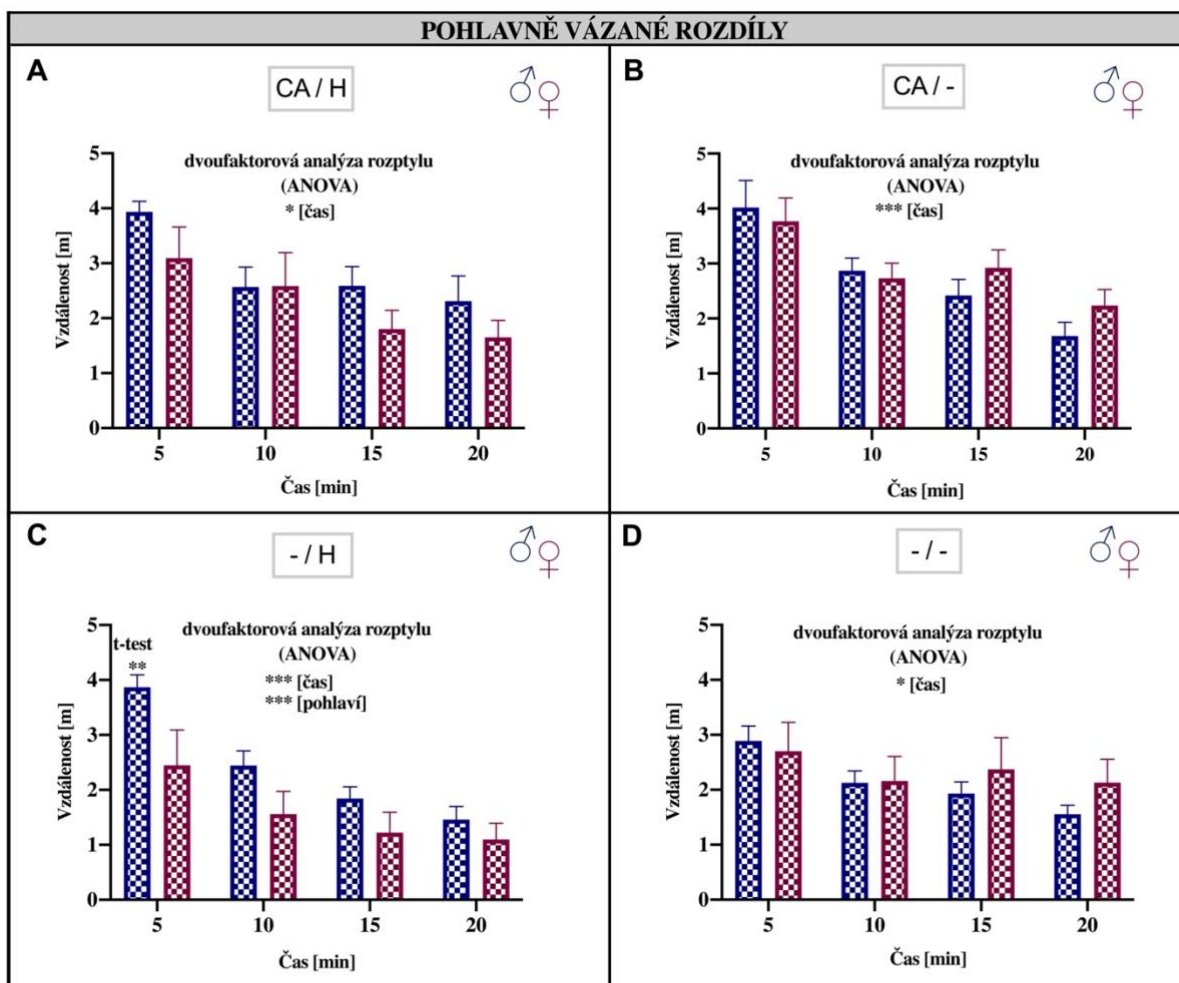
Obrázek 6: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na panáčkování myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Grafy A, B, C, D, E, F zobrazují dobu lokomoce ve dvaceti minutovém sledování rozděleném do čtyř pětiminutových intervalů. [CA/H] samci (A, počet: 4) a samice (B, počet: 7) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. [CA/-] samci (C, počet: 8) a samice (D, počet: 7) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. [-/H] samci (E, počet: 14) a samice (F, počet: 8) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. Kontrolní skupina [-/-] (samci počet: 16, samice počet: 5). Signifikantní rozdíly dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post hoc testu zobrazeny jako * (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.001$). Data prezentována jako průměr \pm SEM. [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.**



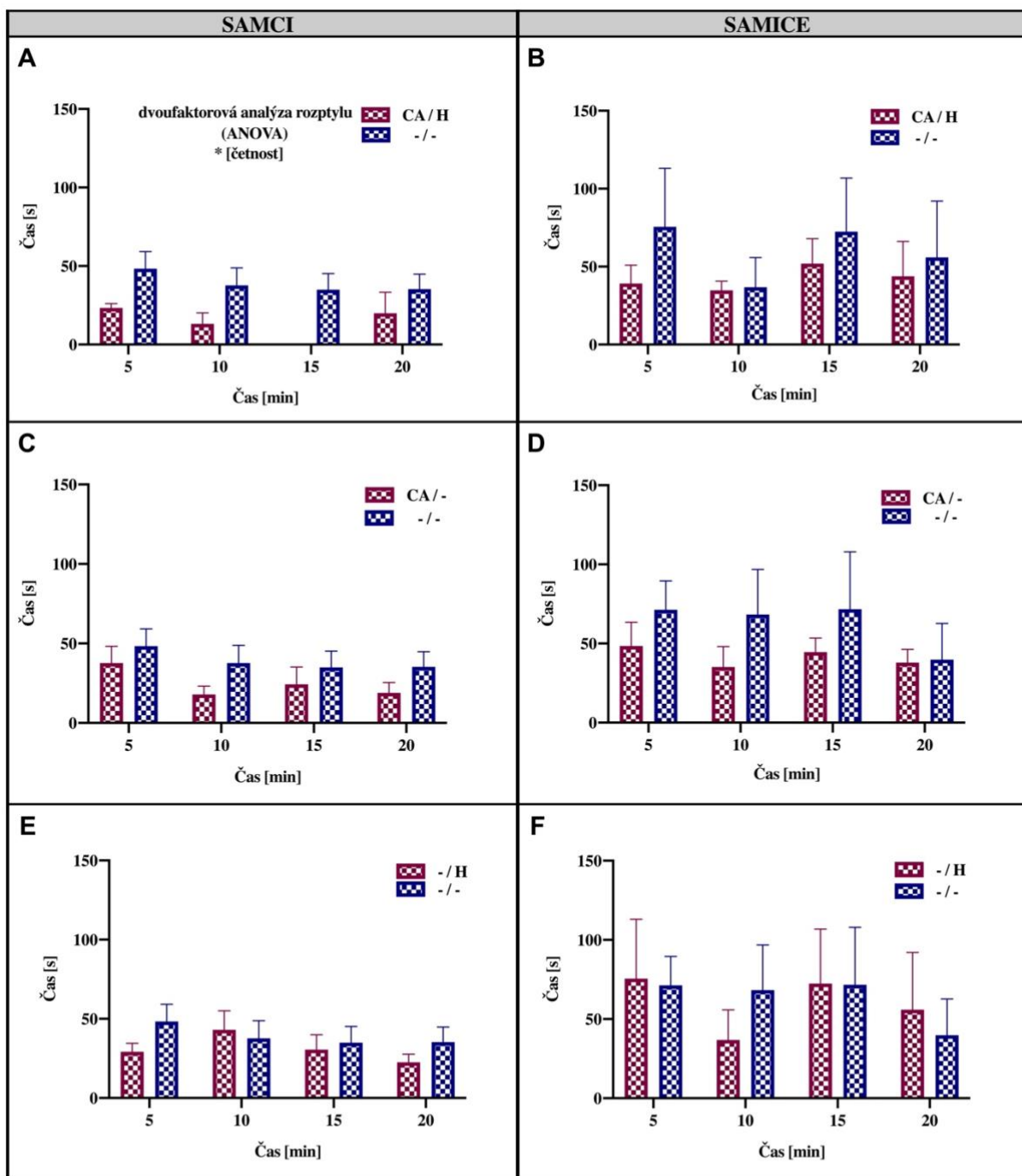
Obrázek 7: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na panáčkování myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Pohlavně vázané rozdíly skupin [CA/H], [CA/-], [-/H], [-/-] jsou zobrazeny na grafech A, B, C a D. Signifikantní rozdíly dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post hoc testu zobrazeny jako * (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Data prezentována jako průměr \pm SEM. [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.



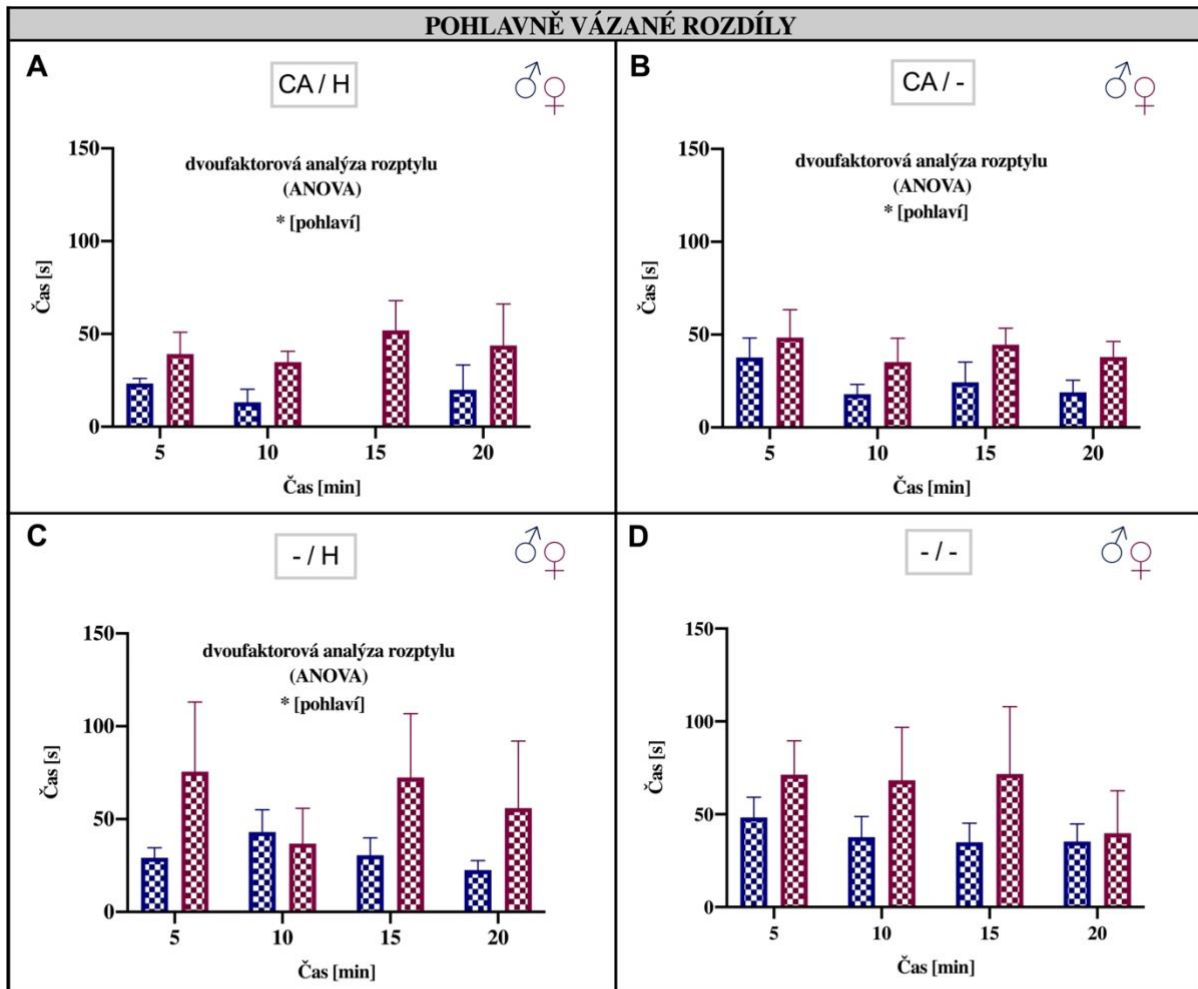
Obrázek 8: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na vzdálenosti myší kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Grafy A, B, C, D, E, F zobrazují dobu lokomoce ve dvaceti minutovém sledování rozděleném do čtyř pětiminutových intervalů. [CA/H] samci (A, počet: 4) a samice (B, počet: 7) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. [CA/-] samci (C, počet: 8) a samice (D, počet: 7) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. [-/H] samci (E, počet: 14) a samice (F, počet: 8) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. Kontrolní skupina [-/-] (samci počet: 16, samice počet: 5). Signifikantní rozdíly dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post hoc testu zobrazeny jako * (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Data prezentována jako průměr \pm SEM. [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.



Obrázek 9: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na vzdálenosti myší kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Pohlavně vázané rozdíly skupin [CA/H], [CA/-], [-/H], [-/-] jsou zobrazeny na grafech A, B, C a D. Signifikantní rozdíly dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post hoc testu zobrazeny jako * (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Data prezentována jako průměr \pm SEM. [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.



Obrázek 10: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na šplhání myší kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Grafy A, B, C, D, E, F zobrazují dobu lokomoce ve dvaceti minutovém sledování rozděleném do čtyř pětiminutových intervalů. [CA/H] samci (A, počet: 4) a samice (B, počet: 7) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. [CA/-] samci (C, počet: 8) a samice (D, počet: 7) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. [-/H] samci (E, počet: 14) a samice (F, počet: 8) porovnání s kontrolní skupinou [-/-]. Kontrolní skupina [-/-] (samci počet: 16, samice počet: 5). Signifikantní rozdíly dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post hoc testu zobrazeny jako * (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$). Data prezentována jako průměr \pm SEM. [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.



Obrázek 11: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na šplhání myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Pohlavně vázané rozdíly skupin [CA/H], [CA/-], [-/H], [-/-] jsou zobrazeny na grafech A, B, C a D. Signifikantní rozdíly dvoufaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) a Bonferroniho post hoc testu zobrazeny jako * (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.001$). Data prezentována jako průměr \pm SEM. [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.**

Tabulka 5 Souhrn statistického vyhodnocení

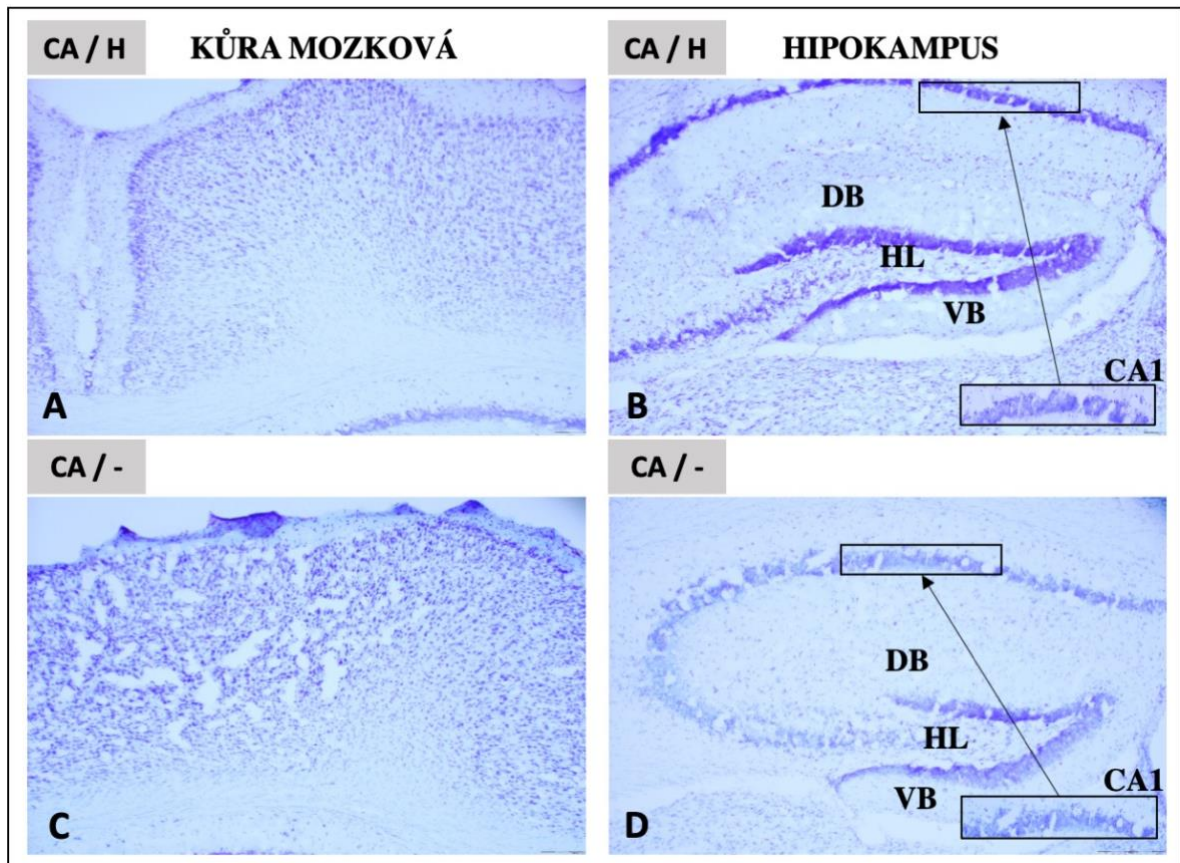
		LOKOMOCE (LOCOMOTION)	PANÁČKOVÁNÍ (REARING)	VZDÁLENOST (DISTANCE)	ŠPLHÁNÍ (CLIMBING)	
POROVNÁNÍ S - / -						
CA / H	σ	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
		interakce:	[F _(3,72) =0,3293 p=0.8041]	[F _(3,72) =0.06087 p=0.9802]	[F _(3,72) =0.278 p=0.8406]	[F _(3,72) =0.1379 p=0.9371]
		čas:	[F _(3,72) = 7.807 p=0.0001]	[F _(3,72) =0.3934 p=0.7581]	[F _(3,72) = 7.319 p=0.0002]	[F _(3,72) =0.4907 p=0.6898]
		četnost:	[F _(1,72) = 15.22 p=0.0002]	[F _(1,72) = 4.924 p=0.0296]	[F _(1,72) = 9.358 p=0.0031]	[F _(1,72) = 5.319 p=0.0240]
	Bonferroniho post-hoc test					
	čas:	5. minuta [t₍₇₂₎=2,575, p=0,0483]	n.s.	n.s.	n.s.	
	♀	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
		interakce:	[F _(3,40) =1.188, p=0.3263]	[F _(3,40) =0.1435 p=0.9332]	[F _(3,40) =0.5910 p=0.6245]	[F _(3,40) =0.3582 p=0.7834]
		čas:	[F _(3,40) = 3.923 p=0.0152]	[F _(3,40) =0.2864 p=0.8350]	[F _(3,40) =1.545 p=0.2178]	[F _(3,40) =0.3306 p=0.8033]
		četnost:	[F _(1,40) =2.750 p=0.1051]	[F _(1,40) =1.648 p=0.2067]	[F _(1,40) =0.02663 p=0.8712]	[F _(1,40) =1.947 p=0.1706]
Bonferroniho post-hoc test						
čas:		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
CA / -	σ	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
		interakce:	[F _(3,88) =0.7186 p=0.5435]	[F _(3,88) =0.6358 p=0.5939]	[F _(3,88) =1.192 p=0.3174]	[F _(3,88) =0.07868 p=0.9714]
		čas:	[F _(3,88) = 15.18 p<0.0001]	[F _(3,88) =2.386 p=0.0745]	[F _(3,88) = 15.79 p<0.0001]	[F _(3,88) =0.8688 p=0.4605]
		četnost:	[F _(1,88) = 11.25 p=0.0012]	[F _(1,88) =1.174 p=0.2816]	[F _(1,88) = 10.29 p=0.0019]	[F _(1,88) =3.185 p=0.0778]
	Bonferroniho post-hoc test					
	čas:	5. minuta [t₍₈₈₎=2.625 p=0.0408]	n.s.	5. minuta [t₍₈₈₎=2.917 p=0.0179]	n.s.	
	♀	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
		interakce:	[F _(3,40) =0.4569 p=0.7139]	[F _(3,40) =0.5900 p=0.6251]	[F _(3,40) =0.466 p=0.7071]	[F _(3,40) =0.2630 p=0.8516]
		čas:	[F _(3,40) = 4.585 p=0.0075]	[F _(3,40) =1.482 p=0.2341]	[F _(3,40) =2.417 p=0.0805]	[F _(3,40) =0.5109 p=0.6771]
		četnost:	[F _(1,40) = 11.75 p=0.0014]	[F _(1,40) =0.8590 p=0.3596]	[F _(1,40) =3.979 p=0.0529]	[F _(1,40) =2.546 p=0.1185]
Bonferroniho post-hoc test						
čas:		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
- / H	σ	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
		interakce:	[F _(3,112) = 2.716 p=0.0481]	[F _(3,112) =0.4427 p=0.7229]	[F _(3,112) =2.474 p=0.0653]	[F _(3,112) =0.6011 p=0.6156]
		čas:	[F _(3,112) = 27.88 p<0.0001]	[F _(3,112) =1.611 p=0.1908]	[F _(3,112) = 25.25 p<0.0001]	[F _(3,112) =0.6042 p=0.6136]
		četnost:	[F _(1,112) =3.484 p=0.0646]	[F _(1,112) =1.181 p=0.2795]	[F _(1,112) =3.001 p=0.0860]	[F _(1,112) =1.274 p=0.2614]
	Bonferroniho post-hoc test					
	čas:	5. minuta [t₍₁₁₂₎=3.243 p=0.0062]	n.s.	5. minuta [t₍₁₁₂₎=3.050 p=0.0114]	n.s.	
	♀	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
		interakce:	[F _(3,44) =0.4239 p=0.7368]	[F _(3,44) =0.07120 p=0.9751]	[F _(3,44) =0.3525 p=0.7875]	[F _(3,44) =0.1898 p=0.9028]
		čas:	[F _(3,44) =2.205 p=0.1009]	[F _(3,44) =0.5974 p=0.6201]	[F _(3,44) =1.480 p=0.2330]	[F _(3,44) =0.315 p=0.8141]
		četnost:	[F _(1,44) =1.314 p=0.2578]	[F _(1,44) =3.788 p=0.0580]	[F _(1,44) = 4.788 p=0.0340]	[F _(1,44) =0.01193 p=0.9135]
Bonferroniho post-hoc test						
čas:		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na pozorované domény chování myši kmene C57Bl/6NTac šedesátý den po narození (PND 60). [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina. N.s. = nesignifikantní, p = hladina významnosti, F = hodnota testového kritéria, t = t-hodnota. Faktory analýzy rozptylu: čas, četnost.

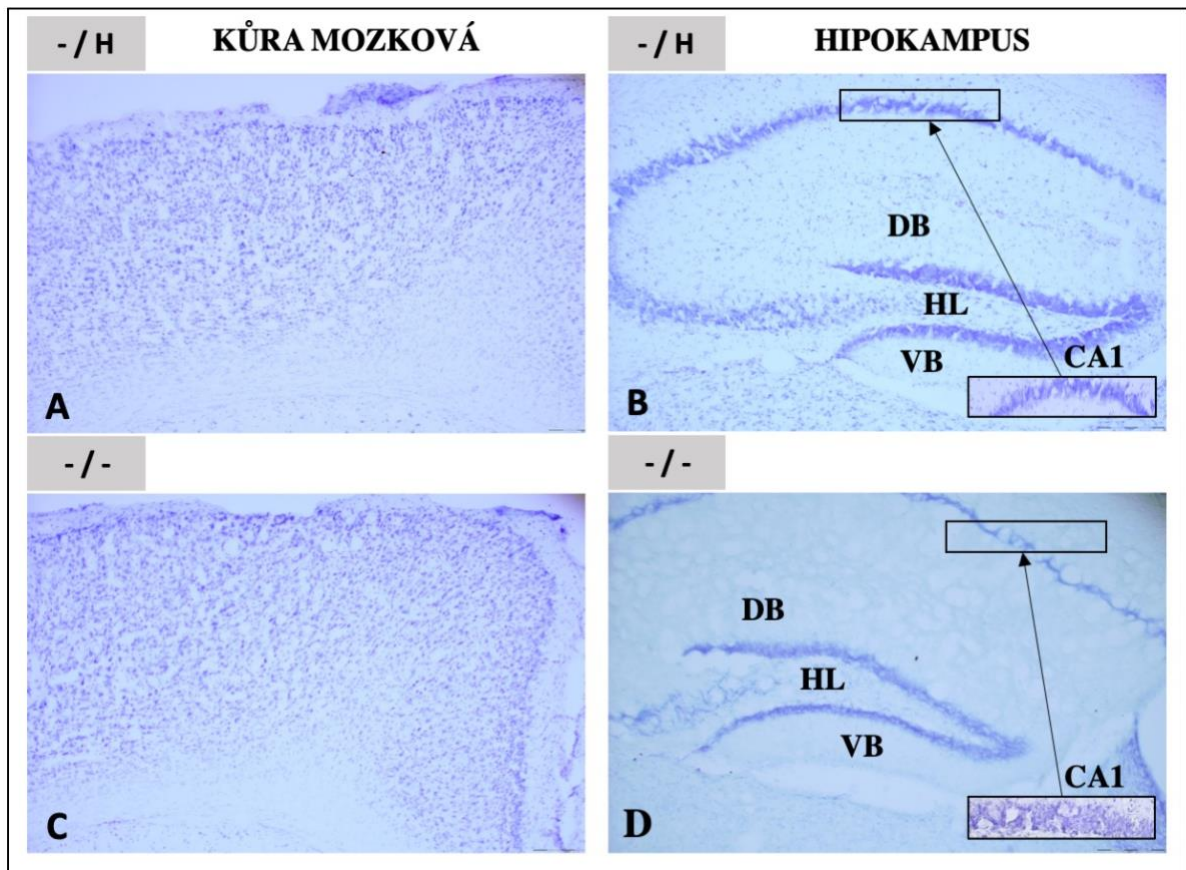
Tabulka 6 Souhrn statistického vyhodnocení, pohlavně vázané rozdíly

POHLAVNĚ VÁZANÉ ROZDÍLY					
CA / H	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
	interakce:	[F _(3,36) =0.5746 p=0.6354]	[F _(3,36) =0.1277 p=0.9431]	[F _(3,36) =0.3301 p=0.8036]	[F _(3,36) =0.5733 p=0.6363]
	čas:	[F_(3,36)=6.093 p=0.0018]	[F _(3,36) =0.2327 p=0.8730]	[F_(3,36)=3.828 p=0.0177]	[F _(3,36) =0.1343 p=0.9389]
	pohlaví:	[F _(1,36) =2.862 p=0.0993]	[F _(1,36) =0.2530 p=0.6180]	[F _(1,36) =2.693 p=0.1095]	[F_(1,36)=7.097 p=0.0115]
	Bonferroniho post-hoc test				
čas:	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
CA / -	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
	interakce:	[F _(3,52) =0.6156 p=0.6080]	[F _(3,52) =2.363 p=0.0818]	[F _(3,52) =0.7882 p=0.5059]	[F _(3,52) =0.0882 p=0.9662]
	čas:	[F_(3,52)=10.72 p<0.0001]	[F_(3,52)=3.469 p=0.0225]	[F_(3,52)=11.39 p<0.0001]	[F _(3,52) =1.081 p=0.3655]
	pohlaví:	[F _(1,52) =0.4727 p=0.4948]	[F _(1,52) =0.2475 p=0.6210]	[F _(1,52) =0.4963 p=0.4843]	[F_(1,52)=5.554 p=0.0222]
	Bonferroniho post-hoc test				
čas:	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	
- / H	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
	interakce:	[F _(3,80) =0.8148 p=0.4894]	[F _(3,80) =1.315 p=0.2753]	[F _(3,80) =0.9686 p=0.4118]	[F _(3,80) =0.8099 p=0.4921]
	čas:	[F_(3,80)=13.07 p<0.0001]	[F _(3,80) =0.4625 p=0.7092]	[F_(3,80)=13.12 p<0.0001]	[F _(3,80) =0.2878 p=0.8340]
	pohlaví:	[F_(1,80)=9.636 p=0.0026]	[F _(1,80) =3.750 p=0.0563]	[F_(1,80)=12.82 p=0.0006]	[F_(1,80)=4.692 p=0.0333]
	Bonferroniho post-hoc test				
čas:	5. minuta [t₍₈₈₎=2.731 p= 0.0311]	n.s.	5. minuta [t₍₈₈₎=3.094 p=0.0100]	n.s.	
- / -	dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA)				
	interakce:	[F _(3,52) =0.6156 p=0.6080]	[F _(3,76) =0.3461 p=0.7921]	[F _(3,76) =0.5557 p=0.6459]	[F _(3,76) =0.3445 p=0.7932]
	čas:	[F_(3,52)=10.72 p<0.0001]	[F _(3,76) =0.3462 p=0.7920]	[F_(3,76)=2.846 p=0.0431]	[F _(3,76) =0.6315 p=0.5969]
	pohlaví:	[F _(1,52) =0.4727 p=0.4948]	[F _(1,76) =0.002899 p=0.9572]	[F _(1,76) =0.8104 p=0.3709]	[F _(1,76) =3.954 p=0.0504]
	Bonferroniho post-hoc test				
čas:	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	

Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na pozorované domény chování myši kmene C57Bl/6NTac šedesátý den po narození (PND 60). [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice, [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina. N.s. = nesignifikantní, p = hladina významnosti, F = hodnota testového kritéria, t = t-hodnota. Faktory analýzy rozptylu: čas, četnost.



Obrázek 12: Přehled morfologické analýzy, barvení dle Nissla, šedesátý den po narození (PND 60). Reprezentativní mikroskopické obrázky samčích řezů mozku ze čtyř stanovených skupin. Barvení dle Nissla. Mozková kůra a hipokampus ipsilaterální hemisféry podvazu (**A, B, C a D**, Zvětšení: 40x), se zaměřením na CA1 zónu (Zvětšení: 200x). Ve skupině [CA/-], (**C a D**), nebylo prokázáno morfologické poškození tkáně na úrovni světelné mikroskopie. Ve skupině [CA/H] vizualizovány četné pyknózy a fragmentace buněčných jader, chaotické uspořádání buněk a významná ztráta celkového objemu buněk (**A a B**). [CA/H] = modifikovaný Rice-Vannucciho model, [CA/-] = izolovaný podvaz pravé společné krkavice.



Obrázek 13: Přehled morfologické analýzy, barvení dle Nissla, šedesátý den po narození (PND 60). Reprezentativní mikroskopické obrázky samčích řezů mozkiem ze čtyř stanovených skupin. Barvení dle Nissla. Mozková kůra a hipokampus ipsilaterální hemisféry podvazu (**A, B, C a D**, Zvětšení: 40x), se zaměřením na CA1 zónu (Zvětšení: 200x). Ve skupinách [-/-], [-/H], (**A, B, C a D**), nebylo prokázáno morfologické poškození tkáně na úrovni světelné mikroskopie. [-/H] = izolovaná expozice hypoxickému prostředí, [-/-] = kontrolní skupina.

5 DISKUZE

V této práci jsme zkoumali dlouhodobý dopad perinatálního HI poškození mozku u myši kmene C57BL/6NTac. Tato studie se zaměřila na zodpovězení následujících otázek:

- Aplikovatelnost a další využitelnost Rice-Vannucciho zvířecího modelu u sedmidenních mláďat myšního kmene C57BL/6NTac.
- Jaká je míra a kvalita strukturálního poškození v oblasti hipokampu způsobeného normobarickou hypoxií a jednostranným podvazem společné krkavice či jejich odděleného působení.
- Jak se projevují pozdější a dlouhodobé změny vyvolané v důsledku HI poškození mozku v různých doménách chování a jaká je jejich interpretovatelnost.
- Sledování vazby pohlaví a behaviorálních změn a případně i strukturálních změn.

Hypoxie je chápána jako nedostatek kyslíku ve tkáních, anebo přesněji jako stav, kdy nabídka kyslíku tkáním není dostatečná k pokrytí aktuálních potřeb buněčného metabolismu. Pokud hypoxie přesáhne svojí intenzitou nebo délkou kompenzační schopnost tkáně, vede k jejímu nenávratnému poškození. Významná citlivost k hypoxii je charakteristická pro mozek jako orgán s nejvyššími nároky a prioritou pro adekvátní oxygenaci. I přes značné kompenzační schopnosti nervové tkáně, její plasticitu a kapacitu adaptace, zůstávají důsledky (klinické) hypoxie velmi závažné. Fyziologický průběh intrauterinního vývoje, porodu a časného poporodního období, též souhrnně označovaného jako perinatální období, je nezbytný pro další adekvátní vývoj jedince. Je obvyklé, že k hypoxickému poškození dochází právě v tomto období. Hypoxický inzult prodělaný v perinatálním období souhrnně označujeme jako perinatální hypoxii a patří mezi hlavní příčiny morbidity a mortality.

Z výše uvedeného je patrné, že modelování HI poškození mozku u zvířat je prioritním úkolem a významnou cestou studia důsledků tohoto poškození nervové tkáně. Nalezení adekvátního, jednoduše aplikovatelného a především dobře interpretovatelného modelu HI by mohlo pomoci pochopit základní patofyziologické mechanismy rozvoje tohoto onemocnění, predikovat tíži jeho rozvoje a samozřejmě i pomoci nalézt účinnou terapii, anebo (v ideálním případě) hledat účinné nástroje prevence. Zvířecí modely HI zaznamenaly od poloviny 20. století značný rozvoj. Mezi významného zástupce řadíme Rice-Vannucciho model, který se stal standardem modelování hypoxie-ischemie. Zvířecí modely v průběhu let úspěšně reprodukovaly hypoxické

podmínky, prohloubily znalosti mechanismů poškození bílé a šedé hmoty a v neposlední řadě přinesly možnost testování nových terapeutických možností. Stran terapie byla díky modelování HI zavedena dosud jediná efektivní léčba – řízená hypotermie. V současné době dochází na úrovni preklinického výzkumu k testování nových kandidátů pro efektivní terapii, za všechny jmenujme například erythropoetin a jeho analoga, melatonin, xenon nebo alopurinol (Frajewicki et al., 2020).

Úskalím velkého množství zvířecích modelů nicméně zůstává nejednotnost a z ní plynoucí obtížná reprodukovatelnost zjištěných výsledků. Interpretaci výsledků komplikuje samotné užití animálního modelu navzdory podrobné znalosti ontogeneze. Hranice hypoxie-ischemie je stanovena arbitrárně na základě průkazu morfologického poškození mozku. Velikou pozornost ale zasluhuje také jemné poškození nervové tkáně, které vede k pozorovatelným behaviorálním změnám i bez průkazu abnormalit v konvenční morfologické analýze mozku. Odpověď na otázku, které změny chování nejcitlivěji tyto subtilní změny způsobují, je zásadní.

Rice-Vannucciho (RV) model je jedním z mnoha prezentovaných modelů perinatální hypoxie-ischemie (Rumajogee et al., 2016, Gennaro et al., 2019). Vývoj spolehlivého modelu HI poškození je vázán na schopnost odhalit a využít podobnosti ve fylogenetickém vývoji nervového systému u různých živočišných druhů (Clowry et al., 2014). Jednou z hlavních nevýhod zvířecích modelů je relativně vysoký rozptyl míry indukovaného HI postižení mezi jednotlivými zástupci zvířat (Gennaro et al., 2019). Tuto překážku, primárně zapříčiněnou intraindividuální variabilitou, je nicméně možno překonat zvětšením experimentálních skupin. Na poli perinatální hypoxie je nejslibnějším právě RV model, který se zaměřuje na poškození mozkové tkáně a motorický deficit, které jsou u hlodavce a člověka velmi podobné (Rumajogee et al., 2016). RV model jednostranného podvazu krkavice s indukcí hypoxie, tedy hypoxie s ischemií dohromady, byl upraven pro použití u sedmidenního mláděte myši kmene C57BL/6NTac (Rice et al., 1981, Ditelberg et al., 1996, Zhu et al., 2009). Očekávané strukturální postižení mozkové tkáně bylo zaznamenáno ve studovaných oblastech mozku myši, unilaterálně k místu provedené ligace. Použitými metodami bylo naopak potvrzeno, že u skupin s izolovaným podvazem krkavice a s izolovaně provedenou hypoxií, nedošlo k morfologickým změnám charakteru neuronálního poškození ve zkoumaných oblastech mozku (Ten et al., 2003, Vannucci & Hagberg, 2004). Tyto nálezy podporují hypotézu, že pro úspěšné pozorování morfologických projevů HI poškození mozku je nutná kombinace hypoxie a

jednostranného podvazu tepny, což mimo jiné odpovídá RV modelu (Rice et al., 1981, Vannucci & Hagberg, 2004, Riljak et al., 2020).

Naproti tomu izolované zásahy (tedy hypoxie oddělená od ischemie) byly i přes negativní morfologický nálezn schopny vyvolat změny v různých doménách chování. Jedním z výstupů této práce proto je, že přílišný důraz na pozorování morfologických změn a interpretace jejich nepřítomnosti jako současná nepřítomnost patologických změn, může být zavádějící. Pokud bychom se věnovali i behaviorálnímu popisu důsledků těchto změn (se stejnou mírou preciznosti), hodnocení důsledků bude daleko přesnější. Námi upravený model poukazuje na důležitost a nepostradatelnost behaviorálního testování. Hypoxické poškození, ačkoliv nebylo morfologicky prokazatelné, způsobilo významné behaviorální změny.

Samotná interpretace a reprodukovatelnost behaviorálních změn může být hlavním limitujícím faktorem. Subjektivní výklad a interpretace komplexních změn chování je totiž velice nepřesný. Tento limitující faktor lze nicméně minimalizovat právě standardizací při pozorování jednotlivých přesně definovaných domén chování automatizovanými systémy. Dále lze díky souběžnému hodnocení porovnávat jednotlivé domény chování navzájem ve stejném čase a hodnotit tak změny chování komplexně (míra anxiety zvířete, tendence opustit klec nebo pátrací chování).

Naše výsledky prokazují, že perinatální hypoxie vedoucí k morfologickým i behaviorálním změnám způsobila také pohlavně vázané rozdíly v různých doménách chování (lokomoce, lezení). Hypoxičtí samci projevovali ve větší míře explorativní chování než hypoxické samice (Obr. 5). Podobný vzorec byl pozorován i u celkové vzdálenosti v otevřeném testovacím poli (Obr. 9). HI samci panáčkovali a šplhali významně méně než kontroly (Obr. 10). Test v otevřeném poli prokázal, že všechny tři studované samčí skupiny (hypoxická, ischemická a HI) projevovaly více explorativní chování než kontroly v prvních 5 minutách (Obr. 4). Samci obecně projevovali vyšší citlivost k hypoxicko-ischemickým inzultům. Samice celkově více šplhaly a hypoxické samice panáčkovaly signifikantně méně než hypoxičtí samci (Obr. 10 a 7). Bylo možné pozorovat významně narušenou habituaci u samců, zároveň hypoxie sama o sobě snížila u samic tendence k explorativnímu chování. Samci vystavení postnatální hypoxii-ischemii projeví menší míru vertikální aktivity (panáčkování a šplhání) a vyšší míru horizontální aktivity (lokomoce obecně a celková vzdálenost).

Je známo, že vedle hormonálního vlivu jsou pohlavně vázané změny v reakci na hypoxii způsobeny odlišnou aktivací apoptotické kaskády (Haast et al., 2012, Hill & Fitch, 2012, Arambula et al., 2019). V reakci na stejný hypoxický inzult bylo u mužského pohlaví evidováno větší množství aktivovaných kaspáz, a tedy větší množství zaniklých buněk v porovnání s ženským pohlavím (Liu et al., 2009, Hill & Fitch, 2012, Netto et al., 2017). Avšak pohlavně vázané rozdíly z pohledu odlišností ve vertikální a horizontální aktivitě nebyly doposud popsány.

Behaviorální změny u myši vystavených zvláště hypoxii nebo ischemii jsou pozoruhodné hned z několika důvodů. V průběhu pozorování jsme zjistili, že myši samice měly přirozeně vyšší tendence ke šplhání než samci (Obr. 11). Šplh prováděný po stěnách klece je formou stereotypního repetitivního chování, které hovoří pro větší míru zvědavosti u samic s cílem lépe prozkoumat neznámé prostředí mimo klec (Dere et al., 2018). Citlivý a přesný úchop končetin, který je u myši nutný pro šplhání, lze přeneseně chápat jako reprezentaci jemné motoriky, která je za jiných okolností jen obtížně definovatelná v rámci studia biologických modelů. Dříve publikované studie se dosud nezabývaly pohlavními rozdíly s ohledem na šplhání (Nevison et al., 1999). Tento přirozený rozdíl mezi pohlavími tak může přispět k interpretaci některých pozorování ve změnách chování, která by se bez zohlednění tohoto faktoru mohla zdát nesignifikantní. Zjednodušeně řečeno, k dosažení signifikantního výsledku v rozdílu šplhání mezi sledovanou kohortou a kontrolami by u samic bylo potřeba většího rozdílu než u samců.

Pro naši práci byl vybrán myší kmen C57BL/6NTac. Jednotlivé myší kmeny se vzájemně odlišují svou náchylností k hypoxicko-ischemicky podmíněným poškozením mozku v rámci RV modelu (Sheldon et al., 1998, Wolf et al., 2016, Sheldon et al., 2018). Myší kmen C57BL/6 je tvořen více podskupinami, které se odlišují nejen genotypem, ale i fenotypem. Právě C57BL/6NTac kmen je jedním z nejvhodnějších a nejvíce využívaných myších kmenů pro studium hypoxie a je mimo jiné vhodným kandidátem i pro studium pohlavně vázaných rozdílů (Zhao et al., 2019). Pro tento kmen je charakteristické, že vykazuje projevy poškození mozkové tkáně již po relativně krátké expozici hypoxii, což umožňuje rychlou detekci rozdílů a urychlení postupu laboratorní práce.

Dále je třeba zohlednit limitující faktory této práce. Ačkoliv lze RV model považovat za dobře sestavený a ověřený přístup ke studiu hypoxie u nezralého mozku, narážíme zde na několik nezanedbatelných komplikací. Mezi dva hlavní problémy zařazujeme rozdíl v uspořádání nervové soustavy mezi člověkem a hlodavcem a odlišnosti v procesu dozrávání nervové tkáně

(Rumajogee et al., 2016). Hlodavci se vyznačují podstatně menším poměrem subkortikální bílé hmoty, výraznými odlišnostmi v cévním zásobování mozku, ale i v metabolismu tkáně, který predisponuje k větší citlivosti šedé kůry v návaznosti na postižení bílé hmoty (Vannucci & Vannucci, 2005).

Hodnocení morfologických změn mozku bylo v rámci RV modelu popisováno za pomoci základních histologických technik a běžného barvení. Pro získání přesnějších výsledků by bylo vhodné doplnit provedená pozorování o podrobnější histologické a imunohistologické analytické metody. Pro účely této studie morfologická analýza sloužila jako ukazatel kvality provedeného experimentu, tedy kontrola očekávaných morfologických korelátů popsaných v literatuře u RV modelu. Dále jsme nesledovali dopady perinatální hypoxie, ischemie a jejich kombinace na různé druhy spontánního chování myši v delším časovém horizontu či více opakovaných měřeních. Za limitující může být též považováno, že myši byly sledovány pouze v průběhu limitovaného časového úseku dvaceti minut. Delší čas pozorování by mohl být zdrojem cenných informací ohledně rozdílů ve spektru chování a dlouhodobějších následků experimentu. Tyto experimenty jsou naplánovány na nejbližší budoucnost a mohly by pomoci ucelit obraz našeho poznání. Větší množství dat na druhou stranu komplikuje statistické zpracování a pro množství informací nemusí být ve svém důsledku výhodou a může maskovat hlavní hypotézu.

Ačkoliv jsme se snažili maximálně respektovat cirkadiánní rytmus myši, pro podrobnou analýzu cirkadiánních změn a jejich vlivu na chování by bylo vhodné rozšířit dobu pozorování. Specifické domény chování se mohou v průběhu tmavé (aktivní) a světlé (klidové) části dne významně lišit (Valuskova et al., 2019). Mnohé externí faktory (např. fyzikální faktory, denní doba, přítomnost pozorovatele, rušivé zvuky apod.) mohou být zdrojem systémových chyb v průběhu laboratorní práce s hlodavci (Perals et al., 2017, Dere et al., 2018). Proto jsme se snažili tyto vlivy minimalizovat standardizací chovných podmínek a využitím automatizovaného systému LABORAS, který umožňuje hodnocení projevů myšího chování bez přítomnosti pozorovatele (Van de Weerd et al., 2001).

Další část studie využije modifikovaný RV model pro analýzu dlouhodobých změn chování u testování možných terapeutických zásahů u hypoxicko-ischemického inzultu (melatonin, erytropoetin, kanabinoidy, MgSO₄ a jejich kombinace).

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zhodnocení funkčnosti modifikovaného Rice-Vannucciho modelu u sedmidenní myši kmene C57BL/6NTac. Při dodržení podmínek modelu indukovaná hypoxie s ischemií vyvolaly podstatné behaviorální i morfologické změny, které vedly k výrazné poruše habituace a poruše schopnosti myši vyrovnávat se s novými podněty.

Zjištěné změny spontánního chování nebyly doprovázeny morfologickými změnami mozkové tkáně ve skupinách s odděleně indukovanou hypoxií nebo ischemií. Jednotlivé oddělené inzulty ale byly schopny ovlivnit spontánní chování v pozdějším vývoji myši. Z tohoto důvodu je při pozorování morfologických změn nutné věnovat se stejnou mírou pozornosti i hodnocení behaviorálních důsledků experimentu. Námí upravený model poukazuje na důležitost a nepostradatelnost behaviorálního testování, jelikož nižší míra hypoxického poškození nebyla morfologicky zjištělná, ačkoliv způsobila významné změny chování.

Zajímavým nálezem jsou změny v jednotlivých doménách chování z pohledu pohlavně vázaných rozdílů. Samci i samice vystavení postnatálně hypoxii a ischemii projevovali nižší míru vertikální aktivity a vyšší míru lokomoce. Toto pozorování dosáhlo statistické významnosti pouze u samců, pravděpodobně z důvodu přirozených pohlavních rozdílů popisovaných v diskusi. Samice obecně šplhaly více než samci. Výsledky této práce poukazují na to, že rozdíly v horizontální a vertikální aktivitě v reakci na hypoxii-ischemii zasluhují do budoucna více pozornosti a pozorování by měla být pro obě pohlaví sestavena zvlášť.

Závěrem lze konstatovat, že cíle práce zhodnocení funkčnosti modifikovaného Rice-Vannucciho modelu a průkazu behaviorálních změn u izolovaného podvazu jedné společné karotidy nebo pouze expozice hypoxii u myši kmene C57BL/6NTac byly splněny. Na základě dosažených cílů jsme zamítli druhou a třetí hypotézu. První hypotéza nebyla zamítnuta. Podstatné je poznání, že behaviorální změny u izolovaného podvazu jedné společné karotidy nebo pouze expozice hypoxii u myši kmene C57BL/6NTac nevedou k průkazu morfologických změn. Z tohoto důvodu si analýza behaviorálních změn zasluhuje větší pozornost při pozorování důsledků HI inzultu.

7 LITERATURA

Alberdi, E., M. V. Sánchez-Gómez, A. Marino & C. Matute (2002). Ca(2+) influx through AMPA or kainate receptors alone is sufficient to initiate excitotoxicity in cultured oligodendrocytes. *Neurobiol Dis* **9**(2): 234-243.

Andersen, I. L., K. E. Bøe, G. Foerevik, A. M. Janczak & M. Bakken (2000). Behavioural evaluation of methods for assessing fear responses in weaned pigs. *Appl Anim Behav Sci* **69**(3): 227-240.

Apgar, V. (1953). A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. *Curr Res Anesth Analg* **32**(4): 260-267.

Arambula, S. E., E. L. Reinl, N. El Demerdash, M. M. McCarthy & C. L. Robertson (2019). Sex differences in pediatric traumatic brain injury. *Exp Neurol* **317**: 168-179.

Askalan, R., C. Wang, H. Shi, E. Armstrong & J. Y. Yager (2011). The effect of postischemic hypothermia on apoptotic cell death in the neonatal rat brain. *Dev Neurosci* **33**(3-4): 320-329.

Back, S. A., B. H. Han, N. L. Luo, C. A. Chricton, S. Xanthoudakis, J. Tam, K. L. Arvin & D. M. Holtzman (2002). Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* **22**(2): 455-463.

Back, S. A., A. Riddle, J. Dean & A. R. Hohimer (2012). The instrumented fetal sheep as a model of cerebral white matter injury in the premature infant. *Neurotherapeutics* **9**(2): 359-370.

Barrett, K. E. & W. F. Ganong (2010). *Ganong's review of medical physiology*. New York, McGraw-Hill Medical.

Bayer, S. A. & J. Altman (1990). Development of layer I and the subplate in the rat neocortex. *Exp Neurol* **107**(1): 48-62.

Berger, R. & Y. Garnier (1999). Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Brain Res Rev* **30**(2): 107-134.

Bernhard, C. G., G. M. Kolmodin & B. A. Meyerson (1967). On the prenatal development of function and structure in the somesthetic cortex of the sheep. *Prog Brain Res* **26**: 60-77.

Borbelyova, V., K. Janisova, J. Myslivecek & V. Riljak (2019). Sex-related differences in locomotion and climbing of C57Bl/6NTac mice in a novel environment. *Physiol Res* **68**(Suppl 3): S353-s359.

Bryce, J., C. Boschi-Pinto, K. Shibuya & R. E. Black (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* **365**(9465): 1147-1152.

Calamandrei, G. (2004). Ethological and methodological considerations in the use of newborn rodents in biomedical research. *Ann Ist Super Sanita* **40**(2): 195-200.

Cíbochová, R. (2004). Psychomotorický vývoj dítěte v prvním roce života. *Pediatric pro praxi*. **6**: 291-297.

Clarac, F., F. Brocard & L. Vinay (2004). The maturation of locomotor networks. *Prog Brain Res* **143**: 57-66.

Clowry, G. J., R. Basuodan & F. Chan (2014). What are the Best Animal Models for Testing Early Intervention in Cerebral Palsy? *Frontiers in neurology* **5**: 258-258.

Cook, C. J., C. Williams & P. D. Gluckman (1987). Brainstem auditory evoked potentials in the fetal sheep, in utero. *J Dev Physiol* **9**(5): 429-439.

Cotten, C. M. & S. Shankaran (2010). Hypothermia for hypoxic-ischemic encephalopathy. *Expert Rev Obstet Gynecol* **5**(2): 227-239.

Counotte, D. S., A. B. Smit, T. Pattij & S. Spijker (2011). Development of the motivational system during adolescence, and its sensitivity to disruption by nicotine. *Developmental Cognitive Neuroscience* **1**(4): 430-443.

Cremer, J. E. (1982). Substrate utilization and brain development. *J Cereb Blood Flow Metab* **2**(4): 394-407.

Currustin, S. M., A. Cao, W. B. Stewart, H. Zhang, J. A. Madri, J. S. Morrow & L. R. Ment (2002). Disrupted synaptic development in the hypoxic newborn brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15729-15734.

Curtis, D. J., A. Sood, T. J. Phillips, V. H. Leinster, A. Nishiguchi, C. Coyle, L. Lacharme-Lora, O. Beaumont, H. Kemp, R. Goodall, L. Cornes, M. Giugliano, R. A. Barone, M. Matsusaki, M. Akashi, H. Y. Tanaka, M. Kano, J. McGarvey, N. D. Halemani, K. Simon, R. Keehan, W. Ind, T. Masters, S. Grant, S. Athwal, G. Collett, D. Tannetta, I. L. Sargent, E. Scull-Brown, X. Liu, K. Aquilina, N. Cohen, J. D. Lane, M. Thoresen, J. Hanley, A. Randall & C. P. Case (2014). Secretions from placenta, after hypoxia/reoxygenation, can damage developing neurones of brain under experimental conditions. *Exp Neurol* **261**: 386-395.

Delivoria-Papadopoulos, M. & O. P. Mishra (2004). Nuclear mechanisms of hypoxic cerebral injury in the newborn. *Clin Perinatol* **31**(1): 91-105.

Dere, E., A. Ronnenberg, B. Tampe, S. Arinrad, M. Schmidt, E. Zeisberg & H. Ehrenreich (2018). Cognitive, emotional and social phenotyping of mice in an observer-independent setting. *Neurobiol Learn Mem* **150**: 136-150.

Deveraux, Q. L. & J. C. Reed (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**(3): 239-252.

Ditelberg, J. S., R. A. Sheldon, C. J. Epstein & D. M. Ferriero (1996). Brain injury after perinatal hypoxia-ischemia is exacerbated in copper/zinc superoxide dismutase transgenic mice. *Pediatr Res* **39**(2): 204-208.

Dobbing, J. & J. Sands (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* **3**(1): 79-83.

Doble, A. (1999). The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* **81**(3): 163-221.

Dobrivojević, M., I. Bohaček, I. Erjavec, D. Gorup & S. Gajović (2013). Computed microtomography visualization and quantification of mouse ischemic brain lesion by nonionic radio contrast agents. *Croat Med J* **54**(1): 3-11.

Donders, J. & N. M. Hoffman (2002). Gender differences in learning and memory after pediatric traumatic brain injury. *Neuropsychology* **16**(4): 491-499.

Douglas-Escobar, M. & M. D. Weiss (2012). Biomarkers of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns. *Front Neurol* **3**: 144.

Du, L., R. W. Hickey, H. Bayir, S. C. Watkins, V. A. Tyurin, F. Guo, P. M. Kochanek, L. W. Jenkins, J. Ren, G. Gibson, C. T. Chu, V. E. Kagan & R. S. Clark (2009). Starving neurons show sex difference in autophagy. *J Biol Chem* **284**(4): 2383-2396.

Eklind, S., C. Mallard, A. L. Leverin, E. Gilland, K. Blomgren, I. Mattsby-Baltzer & H. Hagberg (2001). Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury. *Eur J Neurosci* **13**(6): 1101-1106.

Eskild, A., E. M. Strøm-Roum & C. Haavaldsen (2016). Does the Biological Response to Fetal Hypoxia Involve Angiogenesis, Placental Enlargement and Preeclampsia? *Paediatr Perinat Epidemiol* **30**(3): 305-309.

Fan, X., F. van Bel, M. A. van der Kooij, C. J. Heijnen & F. Groenendaal (2013). Hypothermia and erythropoietin for neuroprotection after neonatal brain damage. *Pediatr Res* **73**(1): 18-23.

Ferraro, A. (1933). Experimental toxic encephalomyelopathy. *Psychiatric Quarterly* **7**(2): 267-283.

Finster, M. & M. Wood (2005). The Apgar score has survived the test of time. *Anesthesiology* **102**(4): 855-857.

Follett, P. L., P. A. Rosenberg, J. J. Volpe & F. E. Jensen (2000). NBQX attenuates excitotoxic injury in developing white matter. *J Neurosci* **20**(24): 9235-9241.

Foster, K. A., C. J. Beaver & D. A. Turner (2005). Interaction between tissue oxygen tension and NADH imaging during synaptic stimulation and hypoxia in rat hippocampal slices. *Neuroscience* **132**(3): 645-657.

Frajewicki, A., Z. Laštůvka, V. Borbélyová, S. Khan, K. Jandová, K. Janišová, J. Otáhal, J. Mysliveček & V. Riljak (2020). Perinatal hypoxic-ischemic damage: review of the current treatment possibilities. *Physiol Res* **69**(Suppl 3): 379-401.

Fukuda, K., H. Yao, S. Ibayashi, T. Nakahara, H. Uchimura, M. Fujishima & E. D. Hall (2000). Ovariectomy exacerbates and estrogen replacement attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in rats. *Stroke* **31**(1): 155-160.

Gellért, L. & D. Varga (2016). Locomotion Activity Measurement in an Open Field for Mice. *Bio-protocol* **6**(13): e1857.

Gennaro, M., A. Mattiello & T. Pizzorusso (2019). Rodent Models of Developmental Ischemic Stroke for Translational Research: Strengths and Weaknesses. *Neural plasticity* **2019**: 5089321-5089321.

Glass, H. C., K. J. Hong, E. E. Rogers, R. J. Jeremy, S. L. Bonifacio, J. E. Sullivan, A. J. Barkovich & D. M. Ferriero (2011). Risk factors for epilepsy in children with neonatal encephalopathy. *Pediatr Res* **70**(5): 535-540.

Golan, M. H., R. Mane, G. Molczadzki, M. Zuckerman, V. Kaplan-Louison, M. Huleihel & J. R. Perez-Polo (2009). Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. *Neuropharmacology* **57**(5-6): 511-522.

Gonzalez-Rodriguez, P. J., F. Xiong, Y. Li, J. Zhou & L. Zhang (2014). Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: role of glucocorticoid receptors. *Neurobiol Dis* **65**: 172-179.

Gorelik, N., R. Faingold, A. Daneman & M. Epelman (2016). Intraventricular hemorrhage in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a comparison study between neonates treated with and without hypothermia. *Quant Imaging Med Surg* **6**(5): 504-509.

Graham, E., O. P. Mishra & M. Delivoria-Papadopoulos (1993). Brain cell membrane Na⁺,K⁺-ATPase modification following hypoxia in the guinea pig fetus. *Neurosci Lett* **153**(1): 93-97.

Graham, E. M., K. A. Ruis, A. L. Hartman, F. J. Northington & H. E. Fox (2008). A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *Am J Obstet Gynecol* **199**(6): 587-595.

Grosenbaugh, D. K., B. M. Ross, P. Wagley & S. A. Zanelli (2018). The Role of Kainate Receptors in the Pathophysiology of Hypoxia-Induced Seizures in the Neonatal Mouse. *Sci Rep* **8**(1): 7035.

Guan, B., C. Dai, Y. Zhang, L. Zhu, X. He, N. Wang & H. Liu (2017). Early diagnosis and outcome prediction of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy with color Doppler ultrasound. *Diagnostic and Interventional Imaging* **98**(6): 469-475.

Guo, R., W. Hou, Y. Dong, Z. Yu, J. Stites & C. P. Weiner (2010). Brain injury caused by chronic fetal hypoxemia is mediated by inflammatory cascade activation. *Reprod Sci* **17**(6): 540-548.

Haast, R. A., D. R. Gustafson & A. J. Kiliaan (2012). Sex differences in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* **32**(12): 2100-2107.

Hagberg, H., O. Dammann, C. Mallard & A. Leviton (2004). Preconditioning and the developing brain. *Semin Perinatol* **28**(6): 389-395.

Hálek, J., Dubrava, L., Kantor, L. (2011). Léčebná hypotermie v léčbě hypoxicko-ischemické encefalopatie u novorozenců. *Pediatric pro praxi* **6**: 390-393s.

Hallberg, B., K. Grossmann, M. Bartocci & M. Blennow (2010). The prognostic value of early aEEG in asphyxiated infants undergoing systemic hypothermia treatment. *Acta Paediatr* **99**(4): 531-536.

Hamdy, N., S. Eide, H.-S. Sun & Z.-P. Feng (2020). Animal models for neonatal brain injury induced by hypoxic ischemic conditions in rodents. *Experimental Neurology* **334**: 113457.

Hazell, A. S. (2007). Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int* **50**(7-8): 941-953.

Hedrick, M. S., C. S. Fahlman & P. E. Bickler (2005). Intracellular calcium and survival of tadpole forebrain cells in anoxia. *J Exp Biol* **208**(Pt 4): 681-686.

Hellström-Westas, L., I. Rosén & N. W. Svenningsen (1995). Predictive value of early continuous amplitude integrated EEG recordings on outcome after severe birth asphyxia in full term infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **72**(1): F34-38.

Helou, S., R. C. Koehler, C. A. Gleason, M. D. Jones, Jr. & R. J. Traystman (1994). Cerebrovascular autoregulation during fetal development in sheep. *Am J Physiol* **266**(3 Pt 2): H1069-1074.

Heyer, A., M. Hasselblatt, N. von Ahsen, H. Häfner, A. L. Sirén & H. Ehrenreich (2005). In vitro gender differences in neuronal survival on hypoxia and in 17beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**(4): 427-430.

Hill, C. A., M. L. Alexander, L. D. McCullough & R. H. Fitch (2011). Inhibition of X-linked inhibitor of apoptosis with embelin differentially affects male versus female behavioral outcome following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Dev Neurosci* **33**(6): 494-504.

Hill, C. A. & R. H. Fitch (2012). Sex differences in mechanisms and outcome of neonatal hypoxia-ischemia in rodent models: implications for sex-specific neuroprotection in clinical neonatal practice. *Neurol Res Int* **2012**: 867531.

Hill, C. A., S. W. Threlkeld & R. H. Fitch (2011). Early testosterone modulated sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia in rats. *Int J Dev Neurosci* **29**(4): 381-388.

Hoerder-Suabedissen, A. & Z. Molnár (2015). Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons. *Nat Rev Neurosci* **16**(3): 133-146.

Hurst, E. W. (1940). EXPERIMENTAL DEMYELINATION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* **18**(3): 201-223.

Chance, B. & G. R. Williams (1955). RESPIRATORY ENZYMES IN OXIDATIVE PHOSPHORYLATION: III. THE STEADY STATE. *Journal of Biological Chemistry* **217**(1): 409-427.

Chiesa, C., G. Pellegrini, A. Panero, T. De Luca, M. Assumma, F. Signore & L. Pacifico (2003). Umbilical cord interleukin-6 levels are elevated in term neonates with perinatal asphyxia. *Eur J Clin Invest* **33**(4): 352-358.

Iwata, O., S. Iwata, J. S. Thornton, E. De Vita, A. Bainbridge, L. Herbert, F. Scaravilli, D. Peebles, J. S. Wyatt, E. B. Cady & N. J. Robertson (2007). "Therapeutic time window" duration decreases with increasing severity of cerebral hypoxia-ischaemia under normothermia and delayed hypothermia in newborn piglets. *Brain Res* **1154**: 173-180.

Jain, V., R. Chari, S. Maslovitz, D. Farine, E. Bujold, R. Gagnon, M. Basso, H. Bos, R. Brown, S. Cooper, K. Gouin, N. L. McLeod, S. Menticoglou, W. Mundle, C. Pylypjuk, A. Roggensack & F. Sanderson (2015). Guidelines for the Management of a Pregnant Trauma Patient. *J Obstet Gynaecol Can* **37**(6): 553-574.

Jamon, M. (2006). The early development of motor control in neonate rat. *Comptes Rendus Palevol* **5**(3): 657-666.

Jarvis, S., S. V. Glinianaia, C. Arnaud, J. Fauconnier, A. Johnson, V. McManus, M. Topp, P. Uvebrant, C. Cans & I. Krägeloh-Mann (2005). Case gender and severity in cerebral palsy varies with intrauterine growth. *Arch Dis Child* **90**(5): 474-479.

Jílek, L. (1970). The reaction and adaptation of the central nervous system to stagnant hypoxia and anoxia during ontogenesis. USA, Charles C Thomas Publisher.

Johnston, M. V. & H. Hagberg (2007). Sex and the pathogenesis of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* **49**(1): 74-78.

Kalous, M. & Z. Drahota (1996). The role of mitochondria in aging. *Physiol Res* **45**(5): 351-359.

Kiedrowski, L., J. T. Wroblewski & E. Costa (1994). Intracellular sodium concentration in cultured cerebellar granule cells challenged with glutamate. *Mol Pharmacol* **45**(5): 1050-1054.

Kimelberg, H. K. (1992). Astrocytic edema in CNS trauma. *J Neurotrauma* **9 Suppl 1**: S71-81.

Kittnar, O. (2011). *Lékařská fyziologie*. Praha, Grada.

Koch, R. A. & M. E. Barish (1994). Perturbation of intracellular calcium and hydrogen ion regulation in cultured mouse hippocampal neurons by reduction of the sodium ion concentration gradient. *J Neurosci* **14**(5 Pt 1): 2585-2593.

Kolář, P. (2009). *Rehabilitace v klinické praxi*. Praha, Galén.

Kostovic, I. & P. Rakic (1990). Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol* **297**(3): 441-470.

Kozler, P., J. Pokorný, M. Langmeier & S. Trojan (2002). [Pathophysiology and clinical aspects of brain edema]. *Cas Lek Cesk* **141**(18): 571-574.

Kozler, P., V. Riljak, K. Jandová & J. Pokorný (2014). CT imaging and spontaneous behavior analysis after osmotic blood-brain barrier opening in Wistar rat. *Physiol Res* **63**(Suppl 4): S529-534.

LaManna, J. C., A. I. Light, S. J. Peretsman & M. Rosenthal (1984). Oxygen insufficiency during hypoxic hypoxia in rat brain cortex. *Brain Res* **293**(2): 313-318.

Lang, J. T. & L. D. McCullough (2008). Pathways to ischemic neuronal cell death: are sex differences relevant? *J Transl Med* **6**: 33.

Laptook, A. R. (2009). Use of therapeutic hypothermia for term infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatr Clin North Am* **56**(3): 601-616, Table of Contents.

Lawn, J., K. Shibuya & C. Stein (2005). No cry at birth: global estimates of intrapartum stillbirths and intrapartum-related neonatal deaths. *Bull World Health Organ* **83**(6): 409-417.

Leben, M., M. Nolimál, I. Vidmar & Š. Grošek (2018). Passive therapeutic hypothermia during ambulance and helicopter secondary neonatal transport in neonates with hypoxic brain injury: a 10-year retrospective survey. *Childs Nerv Syst* **34**(12): 2463-2469.

Lebl, J. (2012). *Klinická pediatrie*, Praha:Galén.

Lee, A. C., N. Kozuki, H. Blencowe, T. Vos, A. Bahalim, G. L. Darmstadt, S. Niermeyer, M. Ellis, N. J. Robertson, S. Cousens & J. E. Lawn (2013). Intrapartum-related neonatal encephalopathy incidence and impairment at regional and global levels for 2010 with trends from 1990. *Pediatr Res* **74 Suppl 1**(Suppl 1): 50-72.

Lelard, T., M. Jamon, J. P. Gasc & P. P. Vidal (2006). Postural development in rats. *Exp Neurol* **202**(1): 112-124.

Levine, S. (1960). Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol* **36**(1): 1-17.

Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* **79**(4): 1431-1568.

Liu, F., Z. Li, J. Li, C. Siegel, R. Yuan & L. D. McCullough (2009). Sex differences in caspase activation after stroke. *Stroke* **40**(5): 1842-1848.

Liu, M., P. D. Hurn, C. E. Roselli & N. J. Alkayed (2007). Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**(1): 135-141.

Lukas, W. & K. A. Jones (1994). Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* **61**(2): 307-316.

Mabley, J. G., E. M. Horváth, K. G. Murthy, Z. Zsengellér, A. Vaslin, R. Benko, M. Kollai & C. Szabó (2005). Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Pharmacol Exp Ther* **315**(2): 812-820.

Mareš J., M., P., Trojan S. (1985). *EEG projevy rané chronické hypoxie*. Praha, Avicenum.

Marro, P. J., J. E. McGowan, B. Razdan, O. P. Mishra & M. Delivoria-Papadopoulos (1994). Effect of allopurinol on uric acid levels and brain cell membrane Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* **650**(1): 9-15.

Martin, P. & P. Bateson (1986). *Measuring Behaviour: An Introductory Guide*.

Martinez-Sanchez, M., F. Striggow, U. H. Schroder, S. Kahlert, K. G. Reymann & G. Reiser (2004). Na⁽⁺⁾ and Ca⁽²⁺⁾ homeostasis pathways, cell death and protection after oxygen-glucose-deprivation in organotypic hippocampal slice cultures. *Neuroscience* **128**(4): 729-740.

Mátéffyová, A., J. Otáhal, G. Tsenov, P. Mares & H. Kubová (2006). Intrahippocampal injection of endothelin-1 in immature rats results in neuronal death,

development of epilepsy and behavioral abnormalities later in life. *Eur J Neurosci* **24**(2): 351-360.

Mayoral, S. R., G. Omar & A. A. Penn (2009). Sex differences in a hypoxia model of preterm brain damage. *Pediatr Res* **66**(3): 248-253.

McCutcheon, J. E. & M. Marinelli (2009). Age matters. *Eur J Neurosci* **29**(5): 997-1014.

Ment, L. R., M. Schwartz, R. W. Makuch & W. B. Stewart (1998). Association of chronic sublethal hypoxia with ventriculomegaly in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **111**(2): 197-203.

Millar, L. J., L. Shi, A. Hoerder-Suabedissen & Z. Molnár (2017). Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci* **11**: 78.

Mody, I. & J. F. MacDonald (1995). NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release. *Trends in Pharmacological Sciences* **16**(10): 356-359.

Monje, M. L., J. Chatten-Brown, S. E. Hye & K. M. Raley-Susman (2000). Free radicals are involved in the damage to protein synthesis after anoxia/aglycemia and NMDA exposure. *Brain Res* **857**(1-2): 172-182.

Mourek, J. (1980). [Hypoxia, oxidative metabolism and homeostasis in newborn mammals]. *Cesk Pediatr* **35**(2): 68-71.

Muir, G. D. (2000). Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. *Brain Res Bull* **53**(5): 719-726.

Muramatsu, K., A. Fukuda, H. Togari, Y. Wada & H. Nishino (1997). Vulnerability to cerebral hypoxic-ischemic insult in neonatal but not in adult rats is in parallel with disruption of the blood-brain barrier. *Stroke* **28**(11): 2281-2288; discussion 2288-2289.

Murden, S., V. Borbelyova, Z. Lastuvka, J. Myslivecek, J. Otahal & V. Riljak (2019). Gender differences involved in the pathophysiology of the perinatal hypoxic-ischemic damage. *Physiol Res* **68**(Suppl 3): S207-S217.

Murray, D., G. Boylan, A. C. Ryan & S. Connolly (2009). Early EEG Findings in Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Predict Outcomes at 2 Years. *Pediatrics* **124**: e459-467.

Murray, J. F. (1976). *The normal lung : the basis for diagnosis and treatment of pulmonary disease*. Philadelphia, Saunders.

Mysliveček, J. (2009). *Základy Neurovědy*, Triton.

Mysliveček, J. R., V. (2020). *Fyziologie. Repetitorium*. Praha / Kroměříž, Triton.

Nalivaeva, N. N., A. J. Turner & I. A. Zhuravin (2018). Role of Prenatal Hypoxia in Brain Development, Cognitive Functions, and Neurodegeneration. *Frontiers in Neuroscience* **12**(825).

Nehlig, A. & A. Pereira de Vasconcelos (1993). Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog Neurobiol* **40**(2): 163-221.

Netto, C. A., E. Sanches, F. K. Odorcyk, L. E. Duran-Carabali & S. N. Weis (2017). Sex-dependent consequences of neonatal brain hypoxia-ischemia in the rat. *J Neurosci Res* **95**(1-2): 409-421.

Nevison, C. M., J. L. Hurst & C. J. Barnard (1999). Why do male ICR(CD-1) mice perform bar-related (stereotypic) behaviour? *Behav Processes* **47**(2): 95-111.

Northington, F. J. (2006). Brief update on animal models of hypoxic-ischemic encephalopathy and neonatal stroke. *Ilar j* **47**(1): 32-38.

Nunez, J. (2008). Morris Water Maze Experiment. *J Vis Exp*(19).

Nuñez, J., Z. Yang, Y. Jiang, T. Grandys, I. Mark & S. W. Levison (2007). 17beta-estradiol protects the neonatal brain from hypoxia-ischemia. *Exp Neurol* **208**(2): 269-276.

Nuñez, J. L. & M. M. McCarthy (2003). Sex differences and hormonal effects in a model of preterm infant brain injury. *Ann N Y Acad Sci* **1008**: 281-284.

Nuñez, J. L. & M. M. McCarthy (2008). Androgens predispose males to GABAA-mediated excitotoxicity in the developing hippocampus. *Exp Neurol* **210**(2): 699-708.

Papile, L. A., A. M. Rudolph & M. A. Heymann (1985). Autoregulation of cerebral blood flow in the preterm fetal lamb. *Pediatr Res* **19**(2): 159-161.

Patterson, A. J. & L. Zhang (2010). Hypoxia and fetal heart development. *Curr Mol Med* **10**(7): 653-666.

Perals, D., A. S. Griffin, I. Bartomeus & D. Sol (2017). Revisiting the open-field test: what does it really tell us about animal personality? *Animal Behaviour* **123**: 69-79.

Perlman, M. & P. S. Shah (2011). Hypoxic-ischemic encephalopathy: challenges in outcome and prediction. *J Pediatr* **158**(2 Suppl): e51-54.

Perlman, R. L. (2016). Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health* **2016**(1): 170-176.

Pokorný, J. (1996). [Mechanisms of neuroplasticity]. *Cesk Fysiol* **45**(1): 21-28.

Puyal, J., V. Ginet & P. G. Clarke (2013). Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol* **105**: 24-48.

Quinn, L. P., T. O. Stean, H. Chapman, M. Brown, M. Vidgeon-Hart, N. Upton, A. Billinton & D. J. Virley (2006). Further validation of LABORAS using various dopaminergic manipulations in mice including MPTP-induced nigro-striatal degeneration. *J Neurosci Methods* **156**(1-2): 218-227.

Quinn, L. P., T. O. Stean, B. Trail, M. S. Duxon, S. C. Stratton, A. Billinton & N. Upton (2003). LABORAS: Initial pharmacological validation of a system allowing continuous monitoring of laboratory rodent behaviour. *J Neurosci Methods* **130**(1): 83-92.

Regan, H. K., T. J. Detwiler, J. C. Huang, J. J. Lynch & C. P. Regan (2007). An improved automated method to quantitate infarct volume in triphenyltetrazolium stained rat brain sections. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **56**(3): 339-343.

Renolleau, S., S. Fau, C. Goyenvalle, L. M. Joly, D. Chauvier, E. Jacotot, J. Mariani & C. Charriaut-Marlangue (2007). Specific caspase inhibitor Q-VD-OPh prevents neonatal stroke in P7 rat: a role for gender. *J Neurochem* **100**(4): 1062-1071.

Renolleau, S., S. Fau & C. Charriaut-Marlangue (2008). Gender-related differences in apoptotic pathways after neonatal cerebral ischemia. *Neuroscientist* **14**(1): 46-52.

Rice, J. E., 3rd, R. C. Vannucci & J. B. Brierley (1981). The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* **9**(2): 131-141.

Riepe, M. W., N. Hori, A. C. Ludolph & D. O. Carpenter (1995). Failure of neuronal ion exchange, not potentiated excitation, causes excitotoxicity after inhibition of oxidative phosphorylation. *Neuroscience* **64**(1): 91-97.

Riljak, V., J. Kraf, A. Daryanani, P. Jiruska & J. Otahal (2016). Pathophysiology of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy - biomarkers, animal models and treatment perspectives. *Physiol Res* **65**(Suppl 5): S533-S545.

Riljak, V., Z. Lastuvka, J. Myslivecek, V. Borbelyova & J. Otahal (2020). Early postnatal hypoxia induces behavioral deficits but not morphological damage in the hippocampus in adolescent rats. *Physiol Res* **69**(1): 165-179.

Riljak V., M. D., Jandová K., Langmeier M., Pokorný J. (2009). Mechanizmy excitotoxicity. *Československá fyziologie* **58**: 3.

Rodgers, R. J., C. Lee & J. K. Shepherd (1992). Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology (Berl)* **106**(1): 102-110.

Rodrigo, J., A. P. Fernández, D. Alonso, J. Serrano, P. Fernández-Vizarra, R. Martínez-Murillo, M. L. Bentura & A. Martinez (2004). Nitric oxide in the rat cerebellum after hypoxia/ischemia. *Cerebellum* **3**(4): 194-203.

Rosenbaum, P., N. Paneth, A. Leviton, M. Goldstein, M. Bax, D. Damiano, B. Dan & B. Jacobsson (2007). A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* **109**: 8-14.

Rumajogee, P., T. Bregman, S. P. Miller, J. Y. Yager & M. G. Fehlings (2016). Rodent Hypoxia-Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review. *Front Neurol* **7**: 57.

Sarnat, H. B. & M. S. Sarnat (1976). Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Arch Neurol* **33**(10): 696-705.

Seibenhener, M. L. & M. C. Wooten (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*(96): e52434.

Sheldon, R. A., J. Chuai & D. M. Ferriero (1996). A rat model for hypoxic-ischemic brain damage in very premature infants. *Biol Neonate* **69**(5): 327-341.

Sheldon, R. A., C. Sedik & D. M. Ferriero (1998). Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain Res* **810**(1-2): 114-122.

Sheldon, R. A., C. Windsor & D. M. Ferriero (2018). Strain-Related Differences in Mouse Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Developmental neuroscience* **40**(5-6): 490-496.

Shen, Y., X. B. Liu, D. E. Pleasure & W. Deng (2012). Axon-glia synapses are highly vulnerable to white matter injury in the developing brain. *J Neurosci Res* **90**(1): 105-121.

Shroff, M. M., J. P. Soares-Fernandes, H. Whyte & C. Raybaud (2010). MR imaging for diagnostic evaluation of encephalopathy in the newborn. *Radiographics* **30**(3): 763-780.

Schwarz, M., K. Jandová, I. Struk, D. Marešová, J. Pokorný & V. Riljak (2014). Low dose domoic acid influences spontaneous behavior in adult rats. *Physiol Res* **63**(3): 369-376.

Smart, I. H., C. Dehay, P. Giroud, M. Berland & H. Kennedy (2002). Unique morphological features of the proliferative zones and postmitotic compartments of the neural epithelium giving rise to striate and extrastriate cortex in the monkey. *Cereb Cortex* **12**(1): 37-53.

Stadlin, A., A. James, R. Fiscus, Y. F. Wong, M. Rogers & C. Haines (2003). Development of a postnatal 3-day-old rat model of mild hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res* **993**(1-2): 101-110.

Surai, P. F., B. K. Speake, R. C. Noble & N. H. Sparks (1999). Tissue-specific antioxidant profiles and susceptibility to lipid peroxidation of the newly hatched chick. *Biol Trace Elem Res* **68**(1): 63-78.

Takada, S. H., C. A. Sampaio, W. Allemandi, P. H. Ito, L. F. Takase & M. I. Nogueira (2011). A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by

pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. *J Neurosci Methods* **198**(1): 62-69.

Takata, T., B. Yang, T. Sakurai, Y. Okada & K. Yokono (2004). Glycolysis regulates the induction of lactate utilization for synaptic potentials after hypoxia in the granule cell of guinea pig hippocampus. *Neurosci Res* **50**(4): 467-474.

Tan, S. & D. A. Parks (1999). Preserving brain function during neonatal asphyxia. *Clin Perinatol* **26**(3): 733-747, viii.

Ten, V. S., M. Bradley-Moore, J. A. Gingrich, R. I. Stark & D. J. Pinsky (2003). Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behav Brain Res* **145**(1-2): 209-219.

Toet, M. C., L. Hellström-Westas, F. Groenendaal, P. Eken & L. S. de Vries (1999). Amplitude integrated EEG 3 and 6 hours after birth in full term neonates with hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* **81**(1): F19-F23.

Trojan, S., M. Langmeier, D. Maresová, J. Mourek & J. Pokorný (2004). Plasticity of the brain in neuroontogenesis. *Prague Med Rep* **105**(2): 97-110.

Trojan, S., M. Langmeier, D. Maresová & J. Pokorný (2000). Dehydrogenase activity in the blood and brain after adaptation to intermittent hypoxia. *Sb Lek* **101**(1): 11-16.

Trojan, S. & J. Pokorný (1999). Theoretical aspects of neuroplasticity. *Physiol Res* **48**(2): 87-97.

Trojan, S., Šťastný, F (1989). Perinatal hypoxia and brain development., *Universitas Carolina Pragensis*.

Twomey, E., A. Twomey, S. Ryan, J. Murphy & V. B. Donoghue (2010). MR imaging of term infants with hypoxic-ischaemic encephalopathy as a predictor of neurodevelopmental outcome and late MRI appearances. *Pediatr Radiol* **40**(9): 1526-1535.

Uehara, H., H. Yoshioka, S. Kawase, H. Nagai, T. Ohmae, K. Hasegawa & T. Sawada (1999). A new model of white matter injury in neonatal rats with bilateral carotid artery occlusion. *Brain Res* **837**(1-2): 213-220.

Valuskova, P., V. Riljak, S. T. Forczek, V. Farar & J. Myslivecek (2019). Variability in the Drug Response of M4 Muscarinic Receptor Knockout Mice During Day and Night Time. *Front Pharmacol* **10**: 237.

Van de Weerd, H. A., R. J. Bulthuis, A. F. Bergman, F. Schlingmann, J. Tolboom, P. L. Van Loo, R. Remie, V. Baumans & L. F. Van Zutphen (2001). Validation of a new system for the automatic registration of behaviour in mice and rats. *Behav Processes* **53**(1-2): 11-20.

- Vannucci, R. C. (1990). Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* **27**(4 Pt 1): 317-326.
- Vannucci, R. C., D. T. Lyons & F. Vasta (1988). Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke* **19**(2): 245-250.
- Vannucci, R. C. & J. M. Perlman (1997). Interventions for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* **100**(6): 1004-1014.
- Vannucci, R. C. & S. J. Vannucci (2005). Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Dev Neurosci* **27**(2-4): 81-86.
- Vannucci, S. J. & H. Hagberg (2004). Hypoxia-ischemia in the immature brain. *J Exp Biol* **207**(Pt 18): 3149-3154.
- Vannucci, S. J. & P. D. Hurn (2009). Gender differences in pediatric stroke: is elevated testosterone a risk factor for boys? *Ann Neurol* **66**(6): 713-714.
- Verma, A. (2001). "Low-tech" neuroprotection for brain injury. *J Head Trauma Rehabil* **16**(2): 206-209.
- Verney, C., S. Rees, V. Biran, M. Thompson, T. Inder & P. Gressens (2010). Neuronal damage in the preterm baboon: impact of the mode of ventilatory support. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**(5): 473-482.
- Vinay, L., F. Ben-Mabrouk, F. Brocard, F. Clarac, C. Jean-Xavier, E. Pearlstein & J. F. Pflieger (2005). Perinatal development of the motor systems involved in postural control. *Neural Plast* **12**(2-3): 131-139; discussion 263-172.
- Vlassaks, E., A. W. Gavilanes, J. S. Vles, S. Deville, B. W. Kramer, E. Strackx & P. Martinez-Martinez (2013). The effects of fetal and perinatal asphyxia on neuronal cytokine levels and ceramide metabolism in adulthood. *J Neuroimmunol* **255**(1-2): 97-101.
- Volpe, J. J. (2009). The Encephalopathy of Prematurity—Brain Injury and Impaired Brain Development Inextricably Intertwined. *Seminars in Pediatric Neurology* **16**(4): 167-178.
- Wagner, C. K. (2008). Progesterone receptors and neural development: a gap between bench and bedside? *Endocrinology* **149**(6): 2743-2749.
- Walf, A. A. & C. A. Frye (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* **2**(2): 322-328.
- Wang, W.-T., P. Lee, Y. Dong, H.-W. Yeh, J. Kim, C. P. Weiner, W. M. Brooks & I.-Y. Choi (2016). In Vivo Neurochemical Characterization of Developing Guinea Pigs and the Effect of Chronic Fetal Hypoxia. *Neurochemical Research* **41**(7): 1831-1843.
- Wang, W. Z., A. Hoerder-Suabedissen, F. M. Oeschger, N. Bayatti, B. K. Ip, S. Lindsay, V. Supramaniam, L. Srinivasan, M. Rutherford, K. Møllgård, G. J. Clowry & Z.

Molnár (2010). Subplate in the developing cortex of mouse and human. *J Anat* **217**(4): 368-380.

Wang, X., C. Zhu, X. Wang, H. Hagberg, L. Korhonen, M. Sandberg, D. Lindholm & K. Blomgren (2004). X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol Dis* **16**(1): 179-189.

Wassink, G., J. O. Davidson, S. K. Dhillon, K. Zhou, L. Bennet, M. Thoresen & A. J. Gunn (2019). Therapeutic Hypothermia in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* **19**(2): 2.

White, B. C., J. M. Sullivan, D. J. DeGracia, B. J. O'Neil, R. W. Neumar, L. I. Grossman, J. A. Rafols & G. S. Krause (2000). Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* **179**(S 1-2): 1-33.

Wolf, S., N. Hainz, A. Beckmann, C. Maack, M. D. Menger, T. Tschernig & C. Meier (2016). Brain damage resulting from postnatal hypoxic-ischemic brain injury is reduced in C57BL/6J mice as compared to C57BL/6N mice. *Brain Res* **1650**: 224-231.

Yager, J. Y. & J. A. Thornhill (1997). The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* **21**(2): 167-174.

Yuan, M., C. Siegel, Z. Zeng, J. Li, F. Liu & L. D. McCullough (2009). Sex differences in the response to activation of the poly (ADP-ribose) polymerase pathway after experimental stroke. *Exp Neurol* **217**(1): 210-218.

Zaghloul, N., H. Patel & M. N. Ahmed (2017). A model of Periventricular Leukomalacia (PVL) in neonate mice with histopathological and neurodevelopmental outcomes mimicking human PVL in neonates. *PLoS One* **12**(4): e0175438.

Zeevalk, G. D. & W. J. Nicklas (1990). Chemically induced hypoglycemia and anoxia: relationship to glutamate receptor-mediated toxicity in retina. *J Pharmacol Exp Ther* **253**(3): 1285-1292.

Zhang, X., L. Li, W. Xie, L. Li, D. Yang, X. Heng, Y. Du, R. Doody & W. Le (2013). Prenatal hypoxia may aggravate the cognitive impairment and Alzheimer's disease neuropathology in APPSwe/PS1A246E transgenic mice. *Neurobiology of Aging* **34**: 663-678.

Zhao, L., M. K. Mulligan & T. S. Nowak, Jr. (2019). Substrain- and sex-dependent differences in stroke vulnerability in C57BL/6 mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **39**(3): 426-438.

Zhu, C., X. Wang & K. Blomgren (2009). Cerebral Hypoxia—Ischemia in Neonatal Rats or Mice: A Model of Perinatal Brain Injury. *Animal Models of Acute Neurological Injuries*. J. Chen, Z. C. Xu, X.-M. Xu and J. H. Zhang. Totowa, NJ, Humana Press: 221-230.

Zhu, C., F. Xu, X. Wang, M. Shibata, Y. Uchiyama, K. Blomgren & H. Hagberg (2006). Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *J Neurochem* **96**(4): 1016-1027.

8 PŘÍLOHY

8.1 Seznam publikovaných článků a abstrakt

8.1.1 Publikace v časopisech s IF se vztahem k tématu disertace

Lastuvka, Z., V. Borbelyova, K. Janisova, J. Otahal, J. Myslivecek & V. Riljak (2020). Neonatal hypoxic-ischemic brain injury leads to sex-specific deficits in rearing and climbing in adult mice. *Physiol Res* **69**(Suppl 3): 499-512.

Riljak, V., **Z. Lastuvka**, J. Myslivecek, V. Borbelyova & J. Otahal (2020). Early postnatal hypoxia induces behavioral deficits but not morphological damage in the hippocampus in adolescent rats. *Physiol Res* **69**(1): 165-179.

Murden, S., V. Borbelyova, **Z. Lastuvka**, J. Myslivecek, J. Otahal & V. Riljak (2019). Gender differences involved in the pathophysiology of the perinatal hypoxic-ischemic damage. *Physiol Res* **68**(Suppl 3): 207-217.

Frajewicki, A., **Z. Lastuvka**, V. Borbelyova, S. Khan, K. Jandova, K. Janisova, J. Otahal, J. Myslivecek & V. Riljak (2020). Perinatal hypoxic-ischemic damage: review of the current treatment possibilities. *Physiol Res* **69**(Suppl 3): 379-401.

8.1.2 Publikace v časopisech bez IF se vztahem k tématu disertace

Lastuvka, Z., V. Riljak, K. Jandova & J. Otahal. Hypoxie ve výuce fyziologie – Hypoxia in the lessons of physiology. *Československá fyziologie*, 2018. **67** (2): 54-59.

8.1.3 Abstrakta posterů/přednášek se vztahem k tématu disertace

Lastuvka, Z., K. Janisova, V. Borbelyova, J. Otahal & V. Riljak. 96. Fyziologické dni. Sekce: Nervový systém I. Přednáška, téma: Behaviorální a morfologické důsledky časné postnatální hypoxie-ischémie u myši C57BL/6NTac. 2020, Martin, Slovensko.

Lastuvka, Z., V. Riljak, J. Myslivecek, V. Borbelyova & J. Otahal. 95. Fyziologické dny. Sekce: Neurofyziologie. Přednáška, téma: Behaviorální a morfologické důsledky časné postnatální hypoxie u laboratorního potkana. 2019, Praha, Česká republika.

Lastuvka, Z., J. Otahal & V. Riljak. Celostátní konference SVOČ. Přednáška, téma: Behaviorální a morfologické důsledky perinatální hypoxie u laboratorního potkana, 2017, Olomouc, Česká republika.

Lastuvka, Z., J. Otahal & V. Riljak. 18. studentská vědecká konference 1. LF UK. Poster, téma: Behaviorální a morfologické důsledky perinatální hypoxie u laboratorního potkana, 2017, Praha, Česká republika.

8.1.4 Publikace v časopisech bez IF bez vztahu k tématu disertace

Lastuvka, Z., J. Suchopar, S. Maskova, M. Alblova & A. Parizek (2021). Endokanabinoidy a těhotenství – The role of endocannabinoids in pregnancy. Ceska Gynekol **86**(5): 349-354.

Suchopar, J., **Z. Lastuvka**, S. Maskova, M. Alblova & A. Parizek (2021). Endokanabinoidy – Endocannabinoids. Ceska Gynekol **86**(6): 414-420.