

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

STUDIUM MECHANIZMŮ VZNIKU A ROZVOJE PERINATÁLNÍ HYPOXIE

PERINATAL HYPOXIA: MECHANISMS AND ETIOLOGY

MUDr. Zdeněk Laštůvka

30.5.2022

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

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

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1 ÚVOD	6
2 HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	7
2.1 HYPOTÉZY	7
2.2 CÍLE PRÁCE	7
3 METODIKA	8
3.1 POKUSNÁ ZVÍŘATA	8
3.2 EXPOZICE HYPOXICKO-ISCHEMICKÉMU POŠKOZENÍ MOZKU.....	8
3.3 ANALÝZA CHOVÁNÍ – TEST V OTEVŘENÉM POLI	9
3.4 PERFUZE A HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ TKÁNĚ	10
3.5 STATISTICKÁ ANALÝZA.....	10
4 VÝSLEDKY	11
4.1 ANALÝZA CHOVÁNÍ	11
4.1.1 <i>Doba strávená pohybem (locomotion)</i>	11
4.1.2 <i>Panáčkování (rearing)</i>	11
4.1.3 <i>Vzdálenost (distance)</i>	12
4.1.4 <i>Šplhání (climbing)</i>	12
4.2 MORFOLOGICKÁ ANALÝZA	13
5 DISKUZE A ZÁVĚR	22
6 LITERATURA	26
7 SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA	29
7.1 PUBLIKACE V ČASOPISECH S IF SE VZTAHEM K TÉMATU DISERTACE	29
7.2 PUBLIKACE V ČASOPISECH BEZ IF SE VZTAHEM K TÉMATU DISERTACE	29
7.3 PUBLIKACE V ČASOPISECH BEZ IF BEZ VZTAHU K TÉMATU DISERTACE.....	29

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.

1 ÚVOD

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). Hypoxický infarkt, 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). Incidence hypoxického infarktu v perinatálním období je 3 ‰ u donošených dětí, nicméně u předčasně narozených je mnohonásobně vyšší (Takada et al., 2011).

Hlodavčí modely v průběhu let úspěšně reprodukovaly hypoxické podmínky, prohloubily znalosti mechanismů poškození mozku a přinesly možnost testování nových terapeutických možností. Významným reprezentantem je Rice-Vannucciho model, skládající se z unilaterálního podvazu společné krkavice a expozice hypoxickému prostředí (Rice et al., 1981). Hlavní předností je široké využití ve vědeckém výzkumu a relativně malá finanční zátěž.

Test otevřeného pole můžeme chápat jako obecně přijímané paradigma pro měření explorativního chování. Hlodavec se umístí do nového prostředí neboli *arény*, kde se monitorují změny jeho chování. Předním zástupcem je systém LABORAS (Metris, Hoofddorp, Holandsko). Jedná se o sofistikované zařízení, které detekuje, kvantifikuje a klasifikuje různé domény chování laboratorních myší a potkanů (Quinn et al., 2003, Quinn et al., 2006).

Tato práce se zaměřila na zodpovězení následujících otázek:

- Aplikovatelnost a další využitelnost Rice-Vannucciho zvířecího modelu u sedmidenních mláďat myšího kmene C57BL/6NTac.
- Jaká je míra a kvalita strukturálního poškození mozku způsobeného normobarickou hypoxií a jednostranný 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.

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 d n.

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 výko .

Sedmý postnatální den (PND7) podstoupily myši chirurgický výko 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 byly šetrně odsunuty pomocí chirurgické pinzety. V následující vrstvě podél střední čáry byla zřejmena 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 výimkou podvazu pravé společné krkavice. Chirurgický výkon trval v průměru 6 minut.

Po zotavení z chirurgického výkonu hodinový 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 myší a zhodnocení schopnosti vyrovnat se novým i podnětům jsme využili automatizovaný systém 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 podmínek v klidném prostředí. Po dokončeném testování byla navracena do svých plastikových 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

Z každé pracovní skupiny byli 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 sklíčka.

Každý připravený preparát byl obarven kresolovou violetí (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Tkáňové vzorky byly následně 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 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)

Samci ve všech třech 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. 1: 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. 1: 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. 1: 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. 1: D). U samic skupiny [-/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 1: 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. 2: A), ve skupině [CA/-] ve faktoru času ($p < 0.001$) (Obr. 2: B), ve skupině [-/H] ve faktoru času ($p < 0.001$) a faktoru pohlaví ($p < 0.01$) (Obr. 2: C), Bonferroniho post-hoc test prokázal v této skupině vyšší lokomoční aktivitu mezi 1. a 5. minutou testu ($p < 0.05$) (Obr. 2: C), a v kontrolní skupině [-/-] ve faktoru času ($p < 0.001$) (Obr. 2: D).

4.1.2 Panáčkování (rearing)

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. 3: A). U samců skupin [CA/-] a [-/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 3: C a E). U samic všech třech skupin [CA/H, CA/-, -/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 3: 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. 4: B). Pohlavně vázané rozdíly v době panáčkování nebyly prokázány ve zbývajících skupinách [CA/H, -/H, -/-] (Obr. 4: A, C a D).

4.1.3 Vzdálenost (distance)

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. 5: 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. 5: E). U samic skupiny [-/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru četnosti ($p < 0.05$) (Obr. 5: F). Ve zbývajících skupinách [CA/H, CA/-] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 5: 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. 6: A). U skupiny [CA/-] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.001$) (Obr. 6: 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. 6: C). U kontrolní skupiny byly prokázány signifikantní rozdíly ve faktoru času ($p < 0.05$) (Obr. 6: D).

4.1.4 Šplhání (climbing)

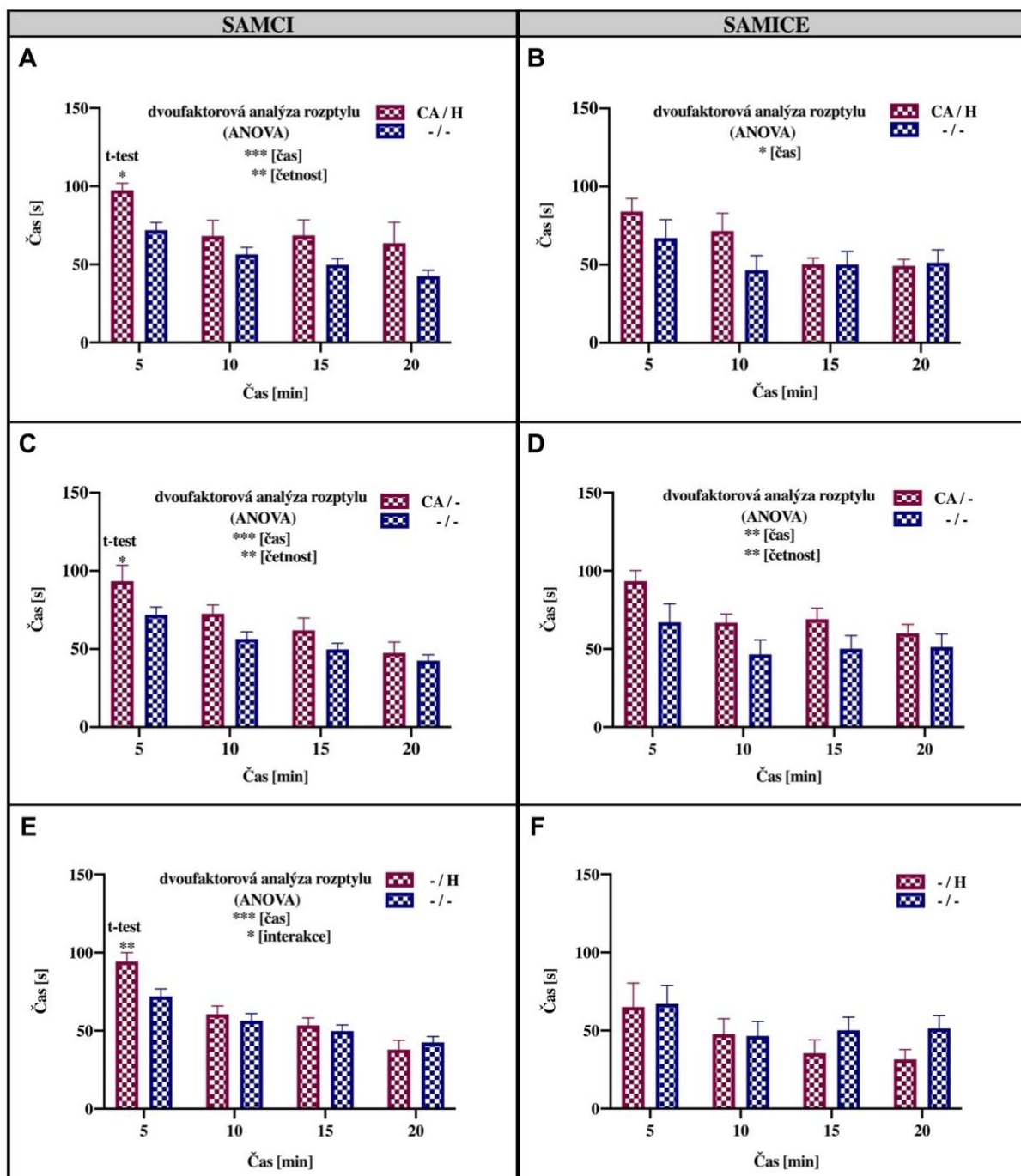
U samců ve skupině [CA/H] dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) prokázala signifikantní rozdíly ve faktoru četnosti ($p < 0.05$) (Obr. 7: A). U zbylých skupin [CA/-, -/H] nebyly u samců prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolní skupinou [-/-] (Obr. 7: C a E). U samic všech třech skupin [CA/H, CA/-, -/H] nebyly prokázány signifikantní rozdíly v porovnání s kontrolami (Obr. 7: 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

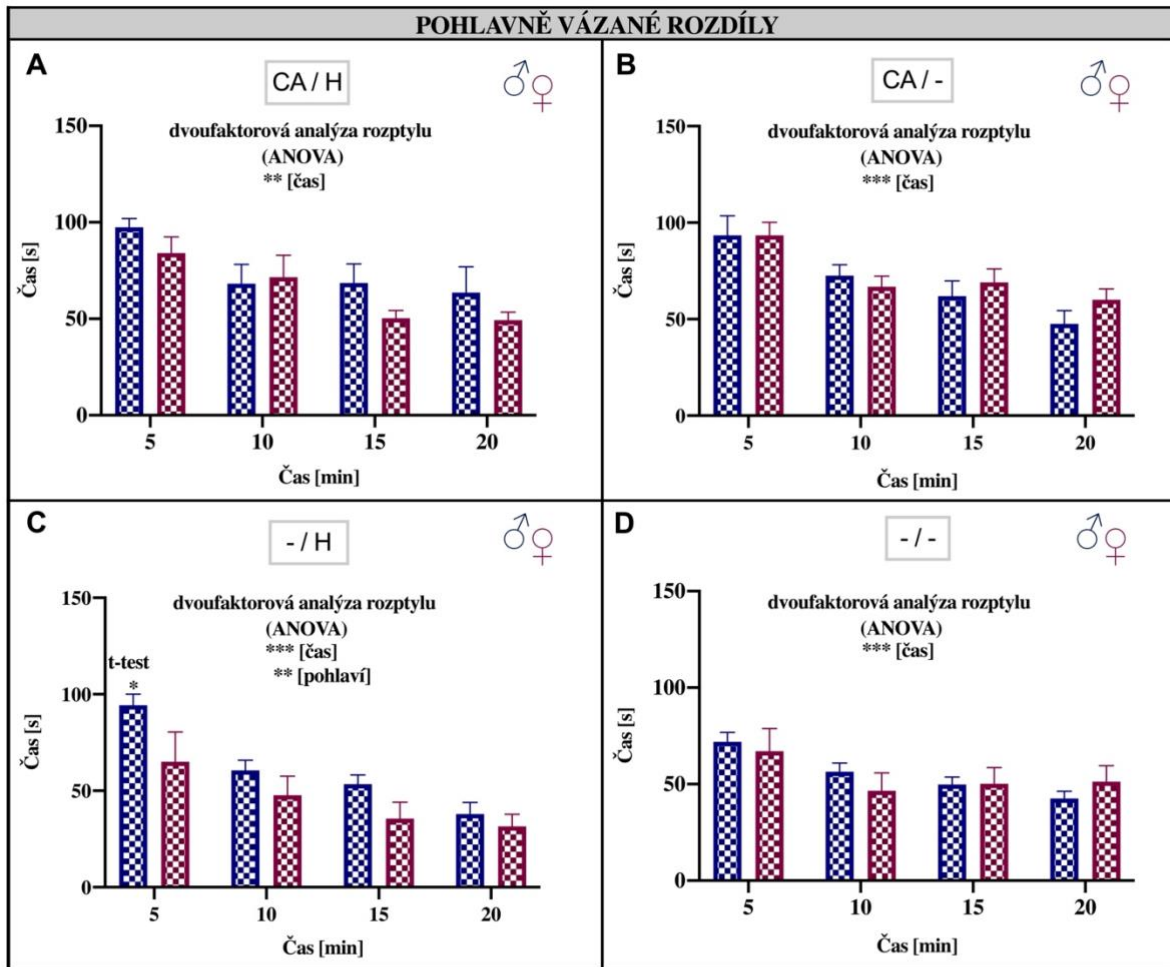
($p < 0.05$) (Obr. 8: A, B a C). Mezi kontrolními skupinami nebyly prokázány žádné signifikantní rozdíly (Obr. 8: D).

4.2 Morfologická analýza

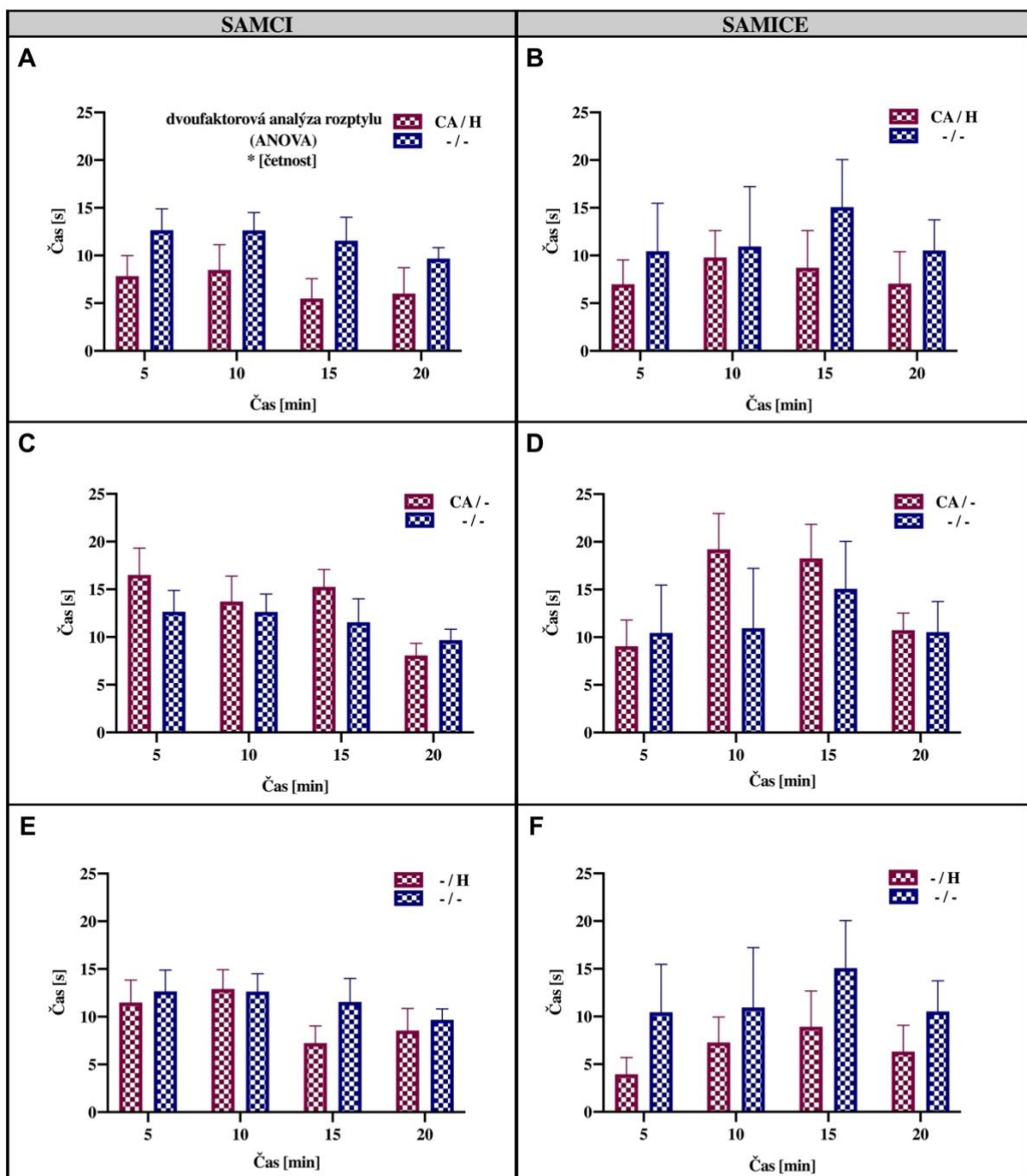
Mezi hodnocené oblasti byly zařazeny kortex, oblasti CA1 a CA3 hipokampu, hilus a dorsální a ventrální listy gyrus dentatus. Strukturální poškození bylo omezeno pouze na hemisféru ipsilaterální k místu ligace společné krkavice ve skupině [CA/H]. Patologické změny se projevíly jako četné pyknózy a fragmentace 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 odchylek. Struktura buněk odpovídala normě včetně jejího uspořádání, jádra byla jasně zřetelná.



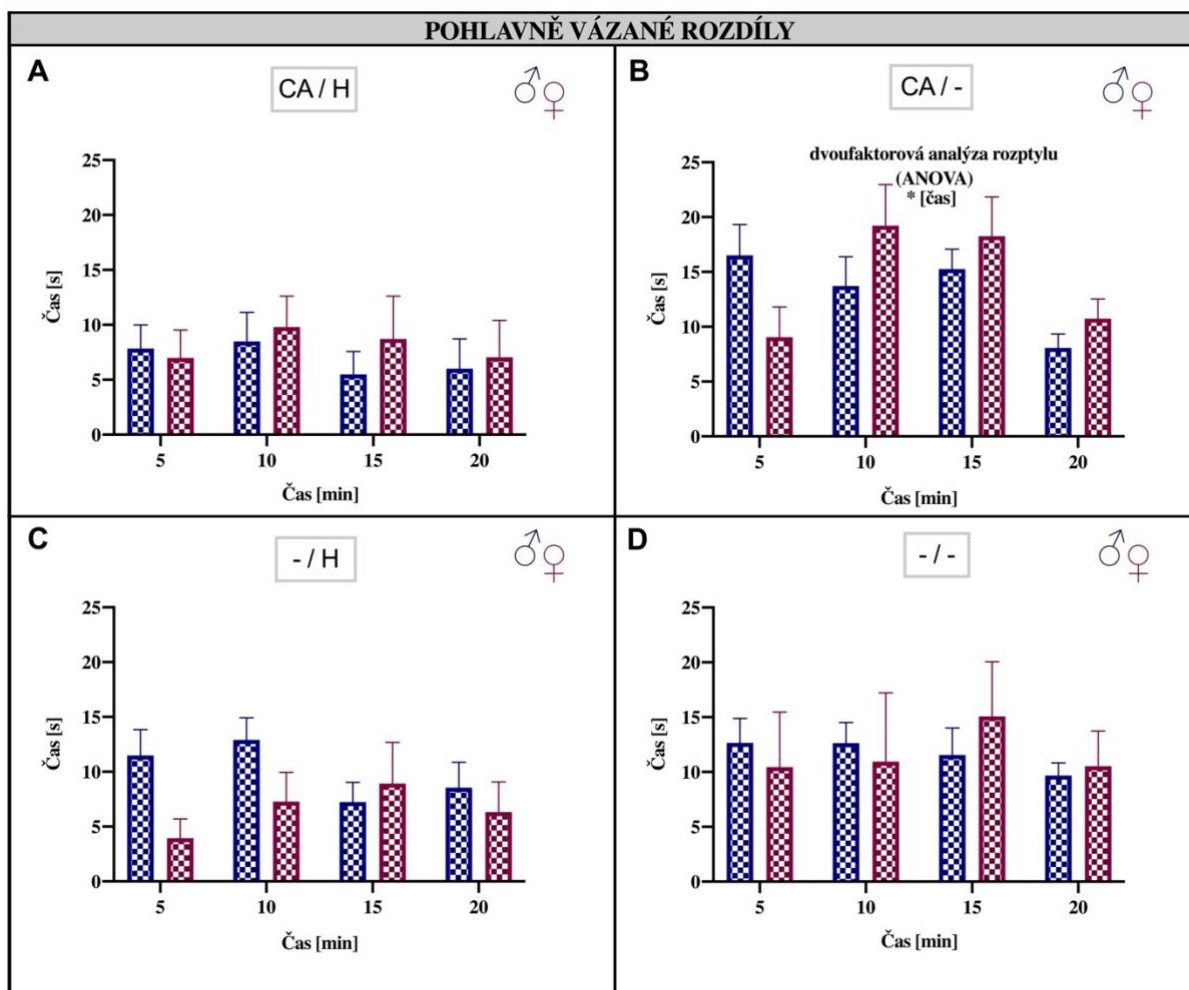
Obrázek 1: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na lokomoci myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Grafy A, B, C, D, E, F zobrazují dobu lokomoce ve dvaceti minutovém sledování rozděleném do čtyř pětiminutových intervalů. [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.



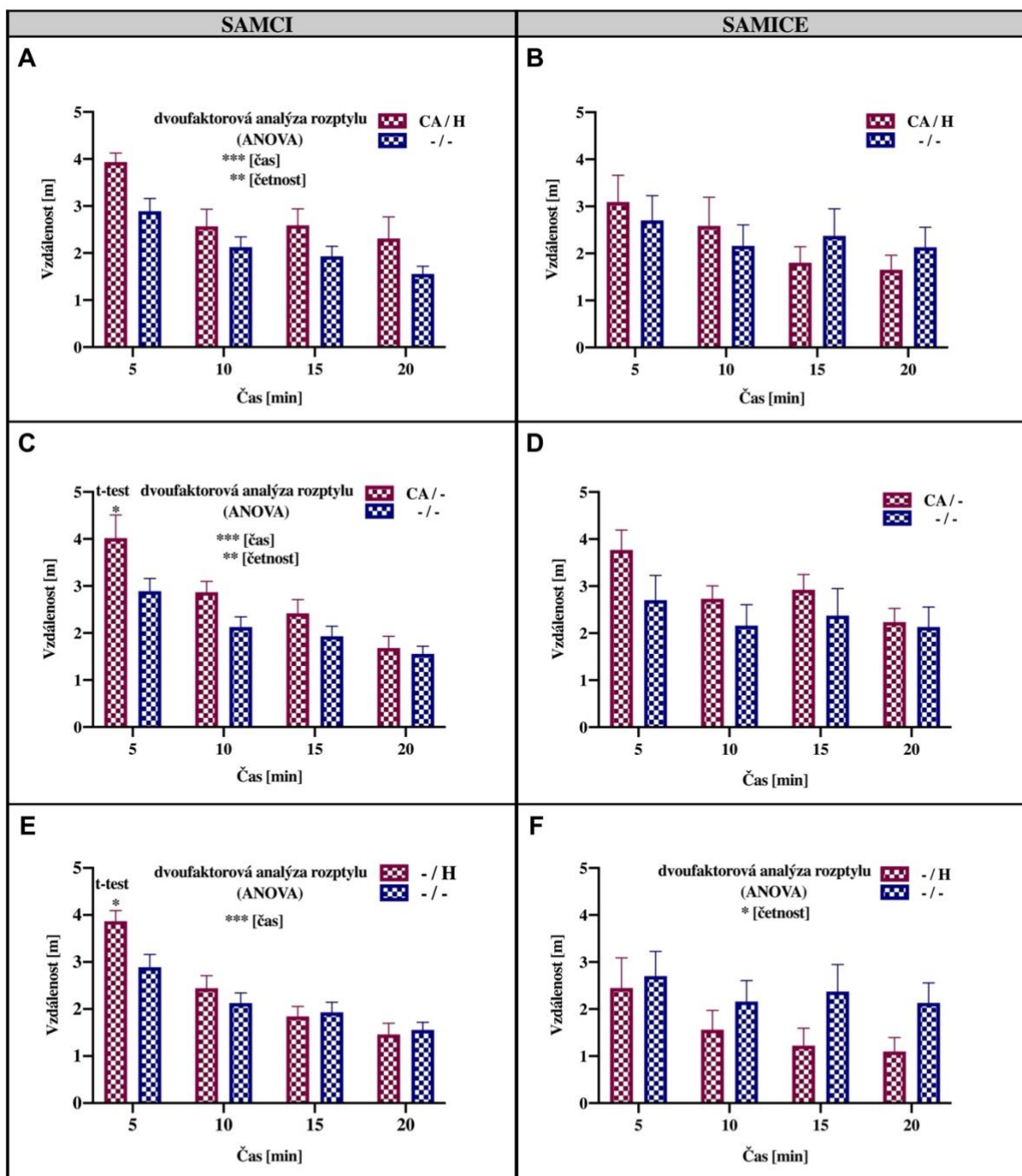
Obrázek 2: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na lokomoci myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Pohlavně vázané rozdíly skupin [CA/H], [CA/-], [-/H], [-/-] jsou zobrazeny na grafech A, B, C a D. Signifikantní rozdíly dvoufaktoremé 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.**



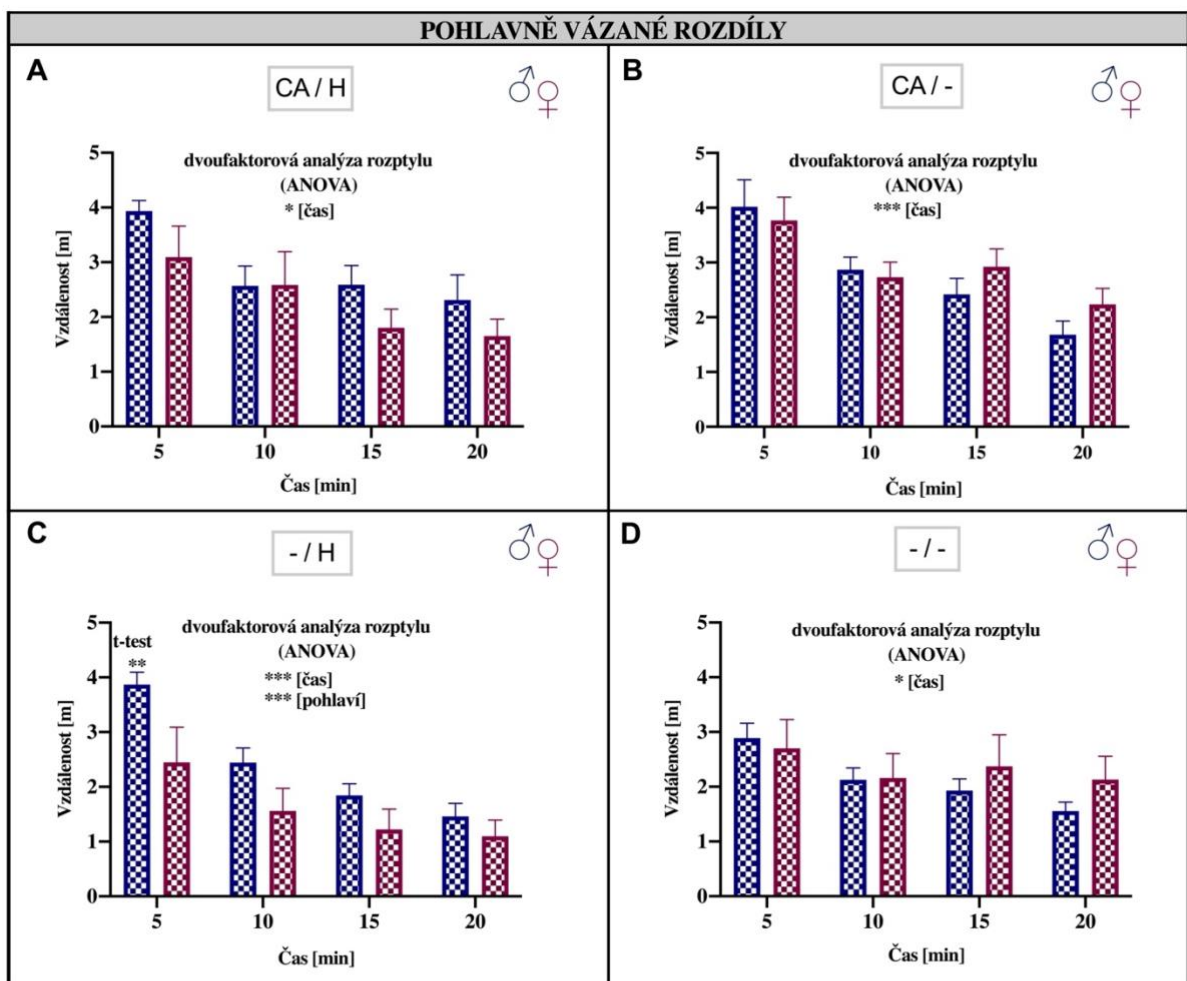
Obrázek 3: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na panáčkování myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Grafy A, B, C, D, E, F zobrazují dobu lokomoce ve dvaceti minutovém sledování rozděleném do čtyř pětiminutových 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.



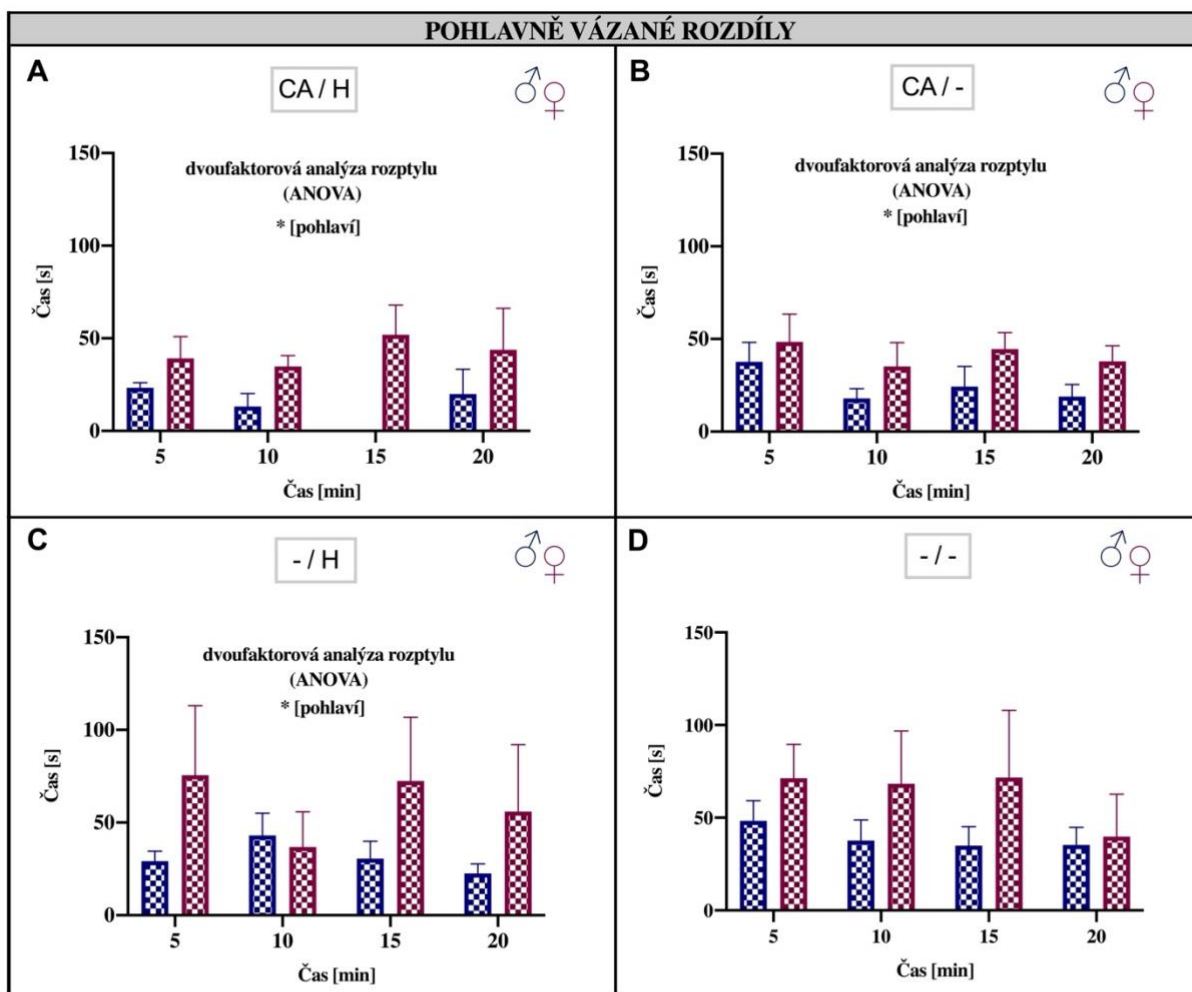
Obrázek 4: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na panáčkování myši kmene C57Bl/6NTac (PND 60). Pohlavně vázané rozdíly skupin [CA/H], [CA/-], [-/H], [-/-] jsou zobrazeny na grafech A, B, C a D. Signifikantní 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 5: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na vzdálenosti 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 6: Efekt modifikovaného Rice-Vannucciho modelu, izolovaného podvazu pravé společné krkavice a izolované expozice hypoxickému prostředí na vzdálenosti 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 šplhání 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.

5 DISKUZE A ZÁVĚR

Zvířecí modely HI zaznamenaly od poloviny 20. století značný rozvoj. Mezi významné 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. 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 indukci 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. Námí upravený model poukazuje na důležitost a nepostradatelnost behaviorálního testování. Hypoxické poškození, ačkoliv nebylo morfologicky prokazatelné, způsobilo významné behaviorální změny.

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. 2). Podobný vzorec byl pozorován i u celkové vzdálenosti v otevřeném testovacím poli (Obr. 6). HI samci panáčkovali a šplhali významně méně než kontroly (Obr. 3 a 7). 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. 1). Samci obecně projevovali vyšší citlivost k hypoxicko-ischemickým inzultům. Samice celkově více šplhaly a hypoxické samice panáčkovaly signifikantně méně než hypoxičtí samci (Obr. 8 a 4). 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 vystavený h 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. 8). 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 jiný h okolností jen obtížně definovatelná v rámci studia biologický h modelů. Dříve publikované studie se dosud nezabýv ly 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 vý ledku v rozdílu šplhání mezi sledovanou kohortou a kontrolami by u samic bylo potřeba většího rozdílu než u samců.

Pro naši práci byl vybrán myši kmen C57BL/6NTac. Jednotlivé myši kmeny se vzájemně odlišují svou náchylností k hypoxicko-ischemicky podmíněný poškozením mozku v rámci RV modelu (Sheldon et al., 1998, Wolf et al., 2016, Sheldon et al., 2018). Myši 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 využívaný h myších kmenů pro studium hypoxie a je mimo jiné vhodným kandidátem i pro studium pohlavně vázaný h 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 nezanedbatelný h 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, výr znými 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 histologický h technik a běžného barvení. Pro účely této studie morfologická analý a sloužila jako ukazatel kvality provedeného experimentu, tedy kontrola očekávaný h

morfologických korelátů popsány h 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 opakovaný h 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 cenný h 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 může maskovat hlavní hypotézu.

Zajímavým nálezem jsou změny v jednotlivých doménách chování z pohledu pohlavně vázaný h 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 popisovaný h v diskusi. Samice obecně šplhaly více než samci a hypoxické samice panáčkovaly signifikantně méně než hypoxičtí 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.

6 LITERATURA

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.

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

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.

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.

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.

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.

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

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

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.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

7 SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

7.1 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.

7.2 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.

7.3 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.