

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

**Bc. Lukáš Krejčí**

**Účinky allopregnanolonu na motoriku  
mláďat laboratorního potkana**

**Diplomová práce**

Praha 2022

Autor práce: **Bc. Lukáš Krejčí**

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

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

Datum obhajoby: **2022**

## **Bibliografický záznam**

KREJČÍ, Lukáš. Účinky allopregnanolonu na motoriku mláďat laboratorního potkana. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství, 2022. 62 s. Vedoucí diplomové práce prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

## **Abstrakt**

Allopregnanolon je typický zástupce neurosteroidů. Může vznikat syntézou de novo přímo v CNS nebo jako metabolit progesteronu. Jedná se o alosterický modulátor GABA<sub>A</sub> receptorů, díky čemuž má anxiolytické, sedativní a antikonvulzivní účinky. Tato práce zkoumá vliv allopregnanolonu (ALLO) na motoriku mláďat laboratorního potkana. Výsledky budou sloužit jako referenční studie k práci Terezy Košťálové (2020), která zkoumala nově objevený neuroaktivní steroid pregnanolonpyroglutamát (PPG). Tento exogenní steroid, syntetizovaný v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky (ÚOCHB AV ČR), nabízí potenciální využití v léčbě epilepsií. Naším cílem bylo po aplikaci allopregnanolonu provést stejnou baterii motorických testů jako srovnání, v jaké míře a jakým způsobem tyto dvě látky akutně ovlivní motorický projev mláďete potkana. V teoretické části diplomové práce jsou popsány fyziologické mechanismy neurosteroidů v lidském těle a jejich potenciál v léčbě závažných onemocnění, zvláště epilepsií. Dále je popsán ontogenetický vývoj motoriky potkana a porovnání s člověkem. Metodika popisuje výběr a způsob provedení motorických testů. Ve speciální části jsou uvedeny výsledky testování, které prokázaly výraznější vedlejší účinky ALLO na motoriku mláďat potkana v porovnání s PPG, který se tak jeví jako více vhodná účinná látka v léčbě dětských epilepsií.

## **Klíčová slova**

allopregnanolon, neurosteroidy, neuroaktivní steroidy, motorické testy, laboratorní potkan, epilepsie

## **Bibliographic record**

KREJČÍ, Lukáš. Effects of allopregnanolone on motor functions of laboratory rat pups. Prague: Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Department of Rehabilitation and Sports medicine, 2022. 62 p. Supervisor of the work prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

## **Abstract**

Allopregnanolone is a typical representative of neurosteroids. It can be formed by de novo synthesis directly in the CNS or as a metabolite of progesterone. It is an allosteric modulator of GABA<sub>A</sub> receptors, due to which it has anxiolytic, sedative and anticonvulsant effects. This work investigates the effect of allopregnanolone (ALLO) on the locomotor skills of laboratory rat pups. The results will serve as a reference study for the work of Tereza Košťálová (2020), who investigated the newly discovered neuroactive steroid pregnanolone pyroglutamate (PPG). This exogenous steroid, synthesized at the Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic (IOCB PRAGUE), offers potential use in the treatment of epilepsy. Our goal was to perform the same battery of motor tests after the application of allopregnanolone as a comparison, to what extent and in what way these two substances acutely affect the motor performance of the rat pup. The theoretical part of the thesis describes the physiological mechanisms of neurosteroids in the human body and their potential in the treatment of serious diseases, especially epilepsy. Next, the ontogenetic development of the rat's motor skills is described and compared to humans. The methodology describes the selection and method of performing motor tests. In a special section, the results of testing are presented, which demonstrated more pronounced side effects of ALLO on the motor skills of young rats compared to PPG, which thus appears to be a more suitable active substance in the treatment of childhood epilepsy.

## **Keywords**

allopregnanolone, neurosteroids, neuroactive steroids, motor tests, laboratory rat, epilepsy

## **Prohlášení**

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

V Praze 12. 8. 2022

Bc. Lukáš Krejčí

## **Poděkování**

Chtěl bych mockrát poděkovat panu profesoru Pavlu Marešovi za trpělivost, cenné rady a vstřícný přístup při vedení této diplomové práce. Dále děkuji všem jeho kolegům z Fyziologického ústavu Akademie věd za cenné rady a velmi přátelské jednání.

**OBSAH**

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>1 VLV NEUROSTEROIDŮ NA CNS .....</b>	<b>9</b>
1.1 KLASIFIKACE .....	9
1.2 BIOSYNTÉZA NEUROSTEROIDŮ .....	10
1.3 MECHANIZMUS ÚČINKŮ .....	12
1.4 GABA-A RECEPTORY .....	12
1.5 NMDA RECEPTORY .....	15
1.6 OSTATNÍ RECEPTORY .....	17
1.7 MOŽNOSTI NEUROSTEROIDŮ V LÉČBĚ.....	18
1.7.1 Epilepsie .....	18
1.8 .....	20
<b>2 ONTOGENEZE LABORATORNÍHO POTKANA .....</b>	<b>22</b>
2.1 OBECNÉ INFORMACE.....	22
2.2 ONTOGENETICKÝ VÝVOJ POTKANA .....	22
2.3 VÝVOJ LOKOMOCE A POSTURY POTKANA .....	24
2.3.1 Shmutí .....	25
2.4 SENZORICKÉ FUNKCE .....	26
2.4.1 Význam aferentních vstupů pro vývoj .....	26
2.4.2 Somatosenzorický systém .....	27
2.4.3 Vestibulární systém .....	28
2.4.4 Sluchový orgán .....	29
2.4.5 Zrak .....	30
2.4.6 Čich .....	30
<b>3 CÍLE A HYPOTÉZY.....</b>	<b>31</b>
<b>4 METODIKA .....</b>	<b>32</b>
4.1 POKUSNÁ ZVÍŘATA .....	32
4.2 TESTOVÁNÍ .....	32
4.3 MOTORICKÉ TESTY .....	33
4.3.1 Openfield test .....	33
4.3.2 Surface righting test .....	34
4.3.3 Negative geotaxis test .....	34
4.3.4 Bar holding test .....	35
4.3.5 Wire mesh ascending test.....	35
4.3.6 Pravidelný a nepravidelný horizontální žebříky .....	36
<b>5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT .....</b>	<b>37</b>
<b>6 VÝSLEDKY .....</b>	<b>38</b>
6.1 AKUTNÍ ÚČINKY .....	38
6.1.1 Surface righting test .....	38
6.1.2 Bar holding test .....	38
6.1.3 Negative geotaxis test .....	39
6.1.4 Wire mesh ascending test.....	40
6.1.5 Chůze po pravidelném žebříku .....	41
6.1.6 Chůze po nepravidelném žebříku .....	42
6.1.7 Open field test .....	44
6.2 VÝSLEDKY HYPOTÉZ .....	47
<b>7 DISKUZE .....</b>	<b>48</b>
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>50</b>
<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>52</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH .....</b>	<b>61</b>

## SEZNAM ZKRATEK

3 $\alpha$ -HSOR - 3 $\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreduktáza

ALLO – allopregnanolon

ALS – amyotrofická laterální skleróza

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

CDX – cyklodextrin

CNS – centrální nervový systém

CPG – central pattern generators

CYP450sc - Cholesterol side-chain cleavage enzyme

DHEA - dehydroepiandrosteron

DHEA-S – dehydroepiandrosteron sulfát

DNS – dynamická neuromuskulární stabilizace

DOC – deoxykortikosteron

FGÚ AV ČR – Fyziologický ústav akademie věd České republiky

GABA – gama-aminomáselná kyselina

HEB – hematoencefalická bariéra

HSD - 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza

IOCB PRAGUE - The Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences

NMDA – N-metyl-D-aspartát

NS - neurosteroidy

PAS – pregnanolon sulfát

PS – pregnenolon sulfát

THDOC – tetrahydrodeoxykortikosteron

ÚOCHB AV ČR - Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky



## ÚVOD

Téma své diplomové práce jsem si vybral díky možnosti zapojit se do praktických pokusů a vyzkoušet si během magisterského programu fyzioterapie účast ve vědecké činnosti v oblasti neurofyziologie.

Ačkoliv je analytické posilování jednotlivých svalů, ošetření konkrétního kloubu nebo povolení fascie velmi důležitým elementem celostního přístupu k terapii pohybového aparátu, moderní léčebné metody fyzioterapie se začínají přesouvat výše, do našeho mozku. Odtud pramení nejen motivace k pohybu, ale také způsoby, jakým dané pohybové vzorce provádíme. Jako příklad můžeme uvést Vojtovu metodu nebo koncept DNS, který se začíná vyučovat napříč celým světem. I přes významné pokroky nestačí v mnoha případech pouze postupy manuální medicíny a je potřeba přistoupovat k problematice komplexně, včetně možného využití farmakoterapie.

Neurosteroidy jsou v posledních letech hojně studovány pro své možné použití v léčbě některých onemocnění (postnatální deprese, neuroendokrinní onemocnění, epilepsie). Právě různé druhy epilepsií jsou v mnoha případech problematické pro svoji rezistenci k používaným antiepileptickým léčivům. Z toho důvodu se zkoumají stále nové látky, které by se mohly použít v terapii a neměly by výrazné nežádoucí vedlejší účinky, například na motoriku.

Tato práce zkoumá vliv typického neurosteroidu na motoriku mláďat laboratorního potkana a byla vypracována jako referenční studie k diplomové práci Terezy Košťálové (2020), která zkoumala nově objevený neuroaktivní steroid se slibnými výsledky.

V teoretické části budou představeny neurosteroidy, neuroaktivní steroidy a jejich využití v medicíně a ontogeneze potkana pro srovnání s motorickým vývojem člověka. V metodice jsou popsány provedené motorické testy.

Ve speciální části jsou popsány výsledky testů, diskuze a srovnání s výsledky jiných studií. Práce je zakončena závěrem se shrnutím dosažených výsledků.

# 1 VLIV NEUROSTEROIDŮ NA CNS

V první řadě je důležité upozornit, že neurosteroidy (NS) jsou podskupinou neuroaktivních steroidů, které se přirozeně vyskytují v centrální nervové soustavě (Bičíková a Hampl, 2007). Jsou tedy steroidy endogenními, kdežto neuroaktivní steroidy by patřily mezi ty steroidy exogenní.

Efekt steroidů na excitabilitu CNS poprvé objevil Selye v roce 1941 při zkoumání anestetických účinků. Mechanismus byl popsán až v roce 1984 (Harrison a Simmonds, 1984). Termín neurosteroidy (NS) poprvé použil Baulieu (1981) k popisu steroidů akumulovaných v CNS syntézou de novo nebo ze sterolových prekurzorů z periferních endogenních žláz (Baulieu, 1997). „Neuroaktivní steroidy“ jsou dnes používány pro synteticky vytvořené neurosteroidy (Dorda et al., 2001).

NS se vyznačují rychlými účinky, což je dáno jejich negenomovým mechanismem působení. Svými interakcemi na několika typech receptorů ovlivňují propustnost iontových kanálů a tím alterují neurální excitabilitu (Bičíková a Hampl, 2007).

## 1.1 Klasifikace

Kromě působení v CNS, se zde mohou i tvořit. Buď se syntetizují de novo z cholesterolu, nebo z prekurzorů, které pochází z klasických steroidogenních tkání (gonády, nadledviny, placenta) a překonali hematoencefalickou bariéru (Bičíková a Hampl, 2007).

NS můžeme na základě struktury rozdělit do tří skupin: deriváty pregnanu (allopregnanolon, alloterahydroxycorticosteron), androstanu (androstenediol, etiocolanon) a sulfatované neurosteroidy (pregnenolon sulfát, dehydroepiandrosteron sulfát). Dále se mohou dělit podle funkce na excitační nebo inhibiční (Tolety, 2019).

Inhibiční steroidy působí inhibičně na neurotransmisi jako pozitivní alosterické modulátory GABA-A receptorů (hlavně na izoformy obsahující podjednotku  $\delta$ ), čímž vyvolávají řadu účinků (antidepresivní, anxiolytické, antiagresivní, prosexuální a sedativní účinky). Dále podporují spánek, kognitivní a paměťové poruchy (Frye, 2009). V neposlední řadě je potřeba uvést anestetické, antikonvulzivní, neuroprotektivní a neurogenní účinky (Patte-Mensah, 2014). Můžeme mezi ně zařadit allopregnanolon,

eltanolon, tetrahydrodeoxykortikosteron (THDOC), androstan  $3\alpha$ -androstanediol a další (Hénin, 2014).

Excitační NS mají logicky opačný (excitační) vliv na neurotransmisi. Působí jako negativní alosterické modulátory GABA-A receptorů. Dále mají vliv na NMDA receptory (N-metyl-D-aspartát receptor) nebo  $\sigma_1$ -receptory. Většinou mají antidepresivní, anxiogenní, kognitivní a paměť zlepšující, konvulzivní, neuriprotektivní a neurogenní účinky (Reddy, 2010). Mezi hlavní excitační NS řadíme pregnenolon sulfát (PS), epipregnanolon, isopregnanolon. Dále androstany dehydroepiandrosteron (DHEA) a jeho sulfatovanou formu dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S).

Dále se do funkčního dělení řadí feromony. Jedná se o neurosteroidy, které prostřednictvím aktivace vomeronazálních receptorových buněk ovlivňují mozkovou aktivitu, zejména funkci hypotalamu (Hawkes, 2009). Patří sem androstany (androstadienol, androstadienon, androstenol,...).

Mezi „ostatní neurosteroidy“ bychom mohli zařadit pregnenolon, progesteron, estradiol a kortikosteron. Na rozdíl od výše zmíněných však nemodulují receptory GABA-A nebo NMDA, ale jiné receptorové struktury na buněčném povrchu. Další zástupci z endogenních steroidů (DHEA, testosteron) se též podílejí přes metabolické dráhy na finální množství NS v mozku, jedná se tak o tzv. „proneurosteroidy“ (Thomas, 2012).

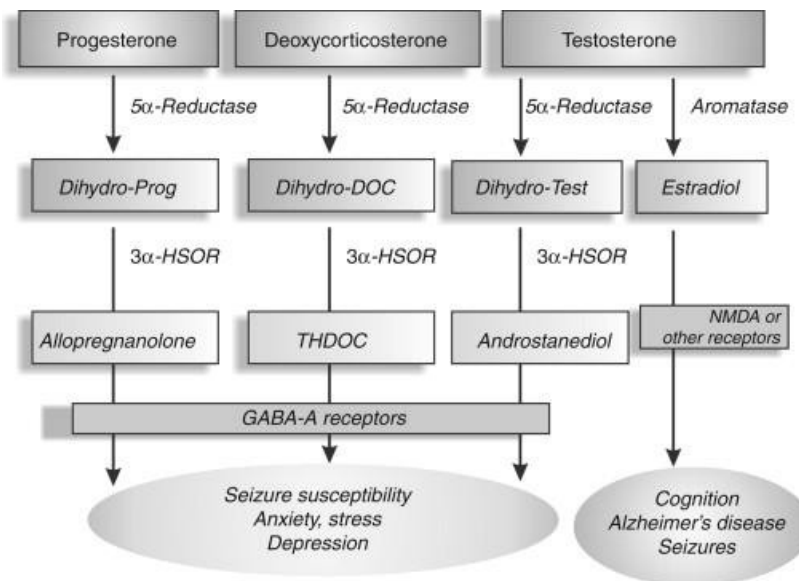
## 1.2 Biosyntéza neurosteroidů

NS jsou metabolity steroidních hormonů progesteronu, deoxykortikosteronu (DOC) a testosteronu. Steroidní prekurzory jsou vyráběny v gonádách, nadledvinách a placentě. Allopregnanolon, THDOC a androstanediol vznikají sekvenční redukcí původního steroidu klíčovými enzymy  $5\alpha$ -reduktázou a  $3\alpha$ -hydroxysteroid oxidoreduktázou ( $3\alpha$ -HSOR). Konverzní kroky probíhají v periferních tkáních (reprodukční endokrinní tkáň, játra, kůže), které disponují dvěma redukčními aktivitami (Do Rego, 2009).

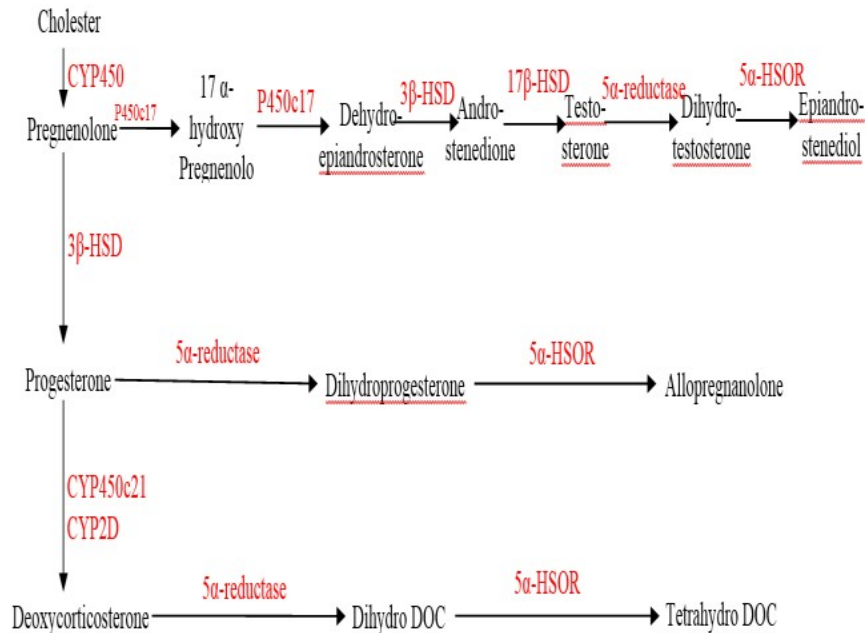
Tím, že jsou NS lipofilní, velmi snadno pronikají hematoencefalickou bariérou (HEB) a akumulací v mozku ovlivňují řadu funkcí (Schumacher, 2004).

Zajímavým zjištěním bylo, že enzymy potřebné pro syntézu NS, byly nalezeny jak v neuronech mozku, tak gliových buňkách (Do Rego, 2009, Mensah – Nyagan et al., 1999, Petratos et al., 2000, Stoffel-Wagner et al., 2000). U lidí byla  $5\alpha$ -reduktáza a  $3\alpha$ -HSOR nalezena v neokortexu a subkortikální bílé hmotě a také v tkáních hypokampu.

Potvrzuje se tím, že NS mohou být syntetizovány přímo v cílových oblastech CNS ze svých původních hormonálních prekurzorů. Aktivita  $3\alpha$ -HSOR je větší než aktivita  $5\alpha$ -reduktázy, čímž se stává rychlost redukce  $5\alpha$ -reduktázou limitujícím faktorem ve výsledném množství syntetizovaných NS (Do Rego, 2009).



Obrázek 1. Schéma syntézy NS v mozku a jejich dopad na mozkové funkce (Do Rego, 2009)



Obrázek 2. Schéma syntézy NS. U šipek jsou uvedeny klíčové enzymy (Tolety, 2003)

Počátečním krokem neurosteroidogeneze je přeměna cholesterolu na pregnenolon (viz obrázek 2) pomocí enzymu cytochromu P450, který štěpí boční řetězce cholesterolu (CYP450scc) a je exprimován v neuronálních buňkách a

astrocytech. 13 pregnenolon je dále konvertován na progesteron 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázou (HSD). Progesteron je potom přeměněn pomocí dvou již zmíněných reduktáz (5 $\alpha$ -reduktáza, 3 $\alpha$ -HSOR) na allopregnanolon. Progesteron se též přeměňuje na DOC enzymem CYP2D, dále je redukován na dihydroDOC pomocí 5 $\alpha$ -reduktázy a půdobením 3 $\alpha$ -HSOR vzniká THDOC (Tolety, 2003).

Na řízení neurosteroidogeneze má vliv translokační protein – 18KDa, který je na vnější mitochondriální membráně. Je znám jako periferní nebo mitochondriální benzodiazepinový receptor. Nyní se ví, že podporuje transport cholesterolu přes membránu mitochondrie, což se projeví v syntéze NS (Reddy, 2012).

### 1.3 Mechanismus účinků

Ve studiích se prokázalo, že akutní účinky NS nejsou způsobeny mechanismy jako u běžných steroidů, tedy vlivem na genovou transkripci. Avšak u chronických účinků působí jak negenomické, tak i pro steroidy typické genomické mechanismy. Pro vliv na intracelulární steroidní receptory musí být ale předtím metabolicky přeměněny na klasické steroidy. Celkově jsou NS na intracelulárních receptorech neaktivní (Rupprecht et al., 1993).

Rychlé účinky NS jsou dány interakcemi s neuronálními membránovými receptory a iontovými kanály, což vyvrací principy klasických steroidů, které vykazují účinky až po delší době. Rupprecht et al. ve studiích (1993, 1996) potvrzuje nízkou afinitu NS k jaderným receptorům steroidních hormonů, i když se na ně mohou po oxidaci 3 $\alpha$ -hydroxylové skupiny vázat. Reddy dále v několika studiích blokováním progesteronových receptorů dokázal, že klasický steroidní receptor není nutný k vyvolání sedativních, anxiolytických nebo antikonvulzivních účinků progesteronu (Reddy, 2010).

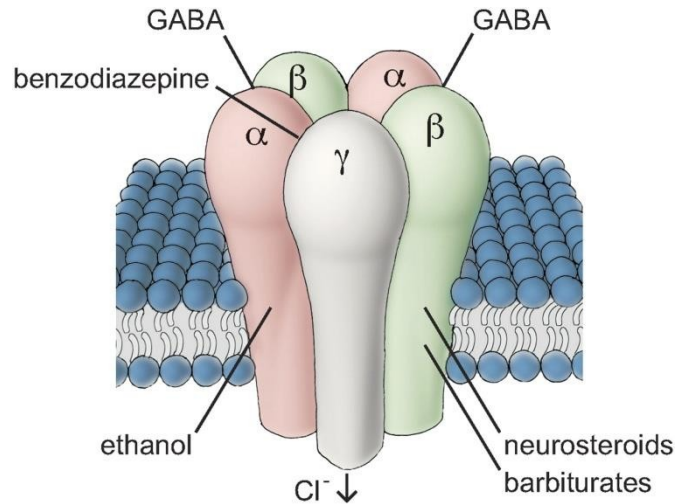
Konečně bylo prokázáno, že neurosteroidy přímo modulují aktivitu ligandem řízených iontových kanálů, zejména receptorů GABA-A (Lambert et al., 2003).

### 1.4 GABA-A receptory

Receptory GABA-A jsou hlavními cílovými strukturami NS. Mohou být regulovány jak pozitivně, tak negativně na základě chemické stavby konkrétního steroidu (Reddy, 2003).

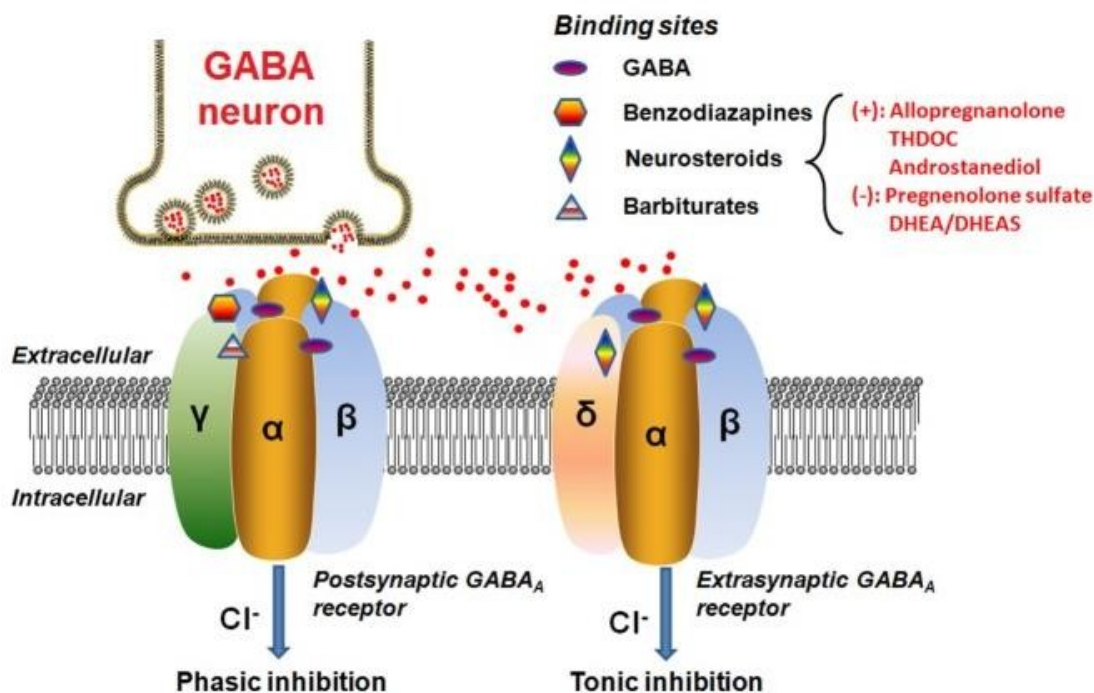
Tento podtyp rodiny GABA receptorů zprostředkovává většinu synaptické inhibice v CNS. Strukturně se jedná o heteropentamery s pěti proteinovými

podjednotkami, které dohromady tvoří kanál pro chloridové ionty. Existují 7 podtypů, které se od sebe liší různým zastoupením jednotlivých proteinových podjednotek. Většina receptorů GABA-A se skládá z  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  nebo  $\delta$  podjednotky (viz obrázek 3). GABA aktivují kanál a prouděním chloridových iontů do buněk dojde k hyperpolarizaci (Reddy, 2003).



Obrázek 3. GABA-A receptor (podtyp s  $\gamma$  podjednotkou) s příklady látek, ovlivňující propustnost iontového kanálu pro chloridové ionty (převzato z flipper.diff.org)

GABA-A receptory zabraňují depolarizaci produkované excitační neurotransmisí. Existují dva typy inhibiční neurotransmise způsobené těmito receptory: synaptická (fázická) a extrasynaptická (tonická) inhibice. NS modulují oba typy a tím potencují jak fázické, tak tonické proudy. Fázická inhibice je výsledkem vazby na  $\gamma 2$  podjednotku intermitentním vyplavováním vysokých dávek GABA z nesynaptických zakončení. Tonická inhibice je zprostředkována kontinuální aktivací receptoru přes vazbu na  $\delta$  podjednotku nízkými hladinami GABA (viz obrázek 4).  $\delta$ -podjednotka se nachází na dendritech granulárních buněk gyrus dentatus hippocampu a propůjčuje důležité funkční charakteristiky receptorům GABA-A. Synaptické receptory jsou periodicky aktivovány malými koncentracemi GABA, která se uvolňuje z axonů GABAergních interneuronů. Extrasynaptické receptory GABA-A jsou aktivovány molekulami GABA, které unikly systému zpětného vychytávání transportéry. Tonická inhibice hraje jedinečnou roli při kontrole excitability hippocampu „nastavením“ základní dráždivosti (Reddy, 2003).



Obrázek 4. Znáznornění rozdílu mezi synaptickým (vlevo) a extrasynaptickým (vpravo) receptorem GABA-A. Dále jsou znázorněny vazebná místa pro četné molekuly, včetně NS, které se dají rozdělit na pozitivní a negativní modulátory (Cai, 2018).

Neurosteroidy jako allopregnanolon (ALLO), THDOC a androstanediol jsou silné pozitivní alosterické modulátory GABA-A receptorů. Vážou se na místa podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ . Předpokládá se, že jde o jiná vazebná místa než v případě barbiturátů či benzodiazepinů. Výsledný efekt spočívá v navýšení pravděpodobnosti otevření kanálu, tedy ve výsledku delší doby otevření. Kanálem proudí více chloridových iontů, což vede ke snížení dráždivosti neuronu (Reddy, 2003).

Předpokládá se, že receptory obsahují více míst pro agonistu GABA a vykazují buď pozitivní nebo negativní výsledný efekt daného modulátoru. Nedávné studie ukázaly existenci až tří vazebných míst NS na receptoru. Jedno pro alosterický efekt ALLO, další pro přímou aktivaci ALLO a třetí pro antagonistický efekt sulfatovaných NS jako je pregnanolon sulfát (Hosie, 2007).

Pozitivní alosterické působení NS na GABA-A v nízkých koncentracích (nanomoly) bylo potvrzeno v elektrofyziologických studiích. Hladiny NS tedy kontinuálně moduluji frekvenci receptorů GABA-A (Dhir, 2012).

NS mohou modulovat většinu izoforem GABA-A receptorů. Benzodiazepiny například jen ty, které obsahují  $\gamma 2$ -podjednotku a postrádají  $\alpha 4$  nebo  $\alpha 6$ -podjednotku.

Obecně platí, že specifická  $\gamma$ -podjednotka může ovlivňovat výsledný efekt NS na modulaci. (Lambert, 2003).

Ukázalo se, že  $\delta$ -podjednotky způsobují větší citlivost k ovlivnění receptorů právě neurosteroidy. Pokusy u myši, které postrádají  $\delta$ -podjednotky, ukázaly velký pokles senzitivity receptorů na podání NS (Mihalek, 1999). Zdá se, že tyto podjednotky nemají vztah přímo k vazbě NS na receptor, ale zvyšují účinky NS, pokud dojde k jeho navázání. Ačkoliv má GABA významnou afinitu k receptoru, nevykazuje příliš vysokou vnitřní aktivitu („efficacy“). Tím, že se v okolí receptoru nacházejí NS v kombinaci s přítomnou  $\delta$ -podjednotkou, i přes již nasaturované receptory, může dojít ve výsledku k významnému ovlivnění iontového kanálu (Glykys, 2007).

Při vysokých koncentracích ( $>10\mu\text{M}$ ) jsou NS schopny aktivovat kanály receptorů i v nepřítomnosti GABA. V tomto množství odpovídají farmakodynamicky NS spíše barbiturátům. Tyto přímé účinky mají farmakologický význam u exogenně podávaných NS. V tomto případě se nedá říct jaká je míra efektu mechanismů vycházející z nízkých koncentrací NS (Dhir, 2012, Reddy, 2002).

Sulfátové neurosteroidy mají inhibiční účinky na GABA-A (Akk, 2001). Patří sem pregnanolon sulfát (PAS) a DHEAS. Tyto NS blokují receptory při nízkých mikromolárních koncentracích působením nekompetitivním antagonismem na rozdílných vazebných místech než ALLO a THDOC (Dorota Majewska, 1987). Vazbou na receptory vyvolají snížení frekvence otevírání kanálu, ačkoliv přesný mechanismus blokády není znám (Akk, 2001).

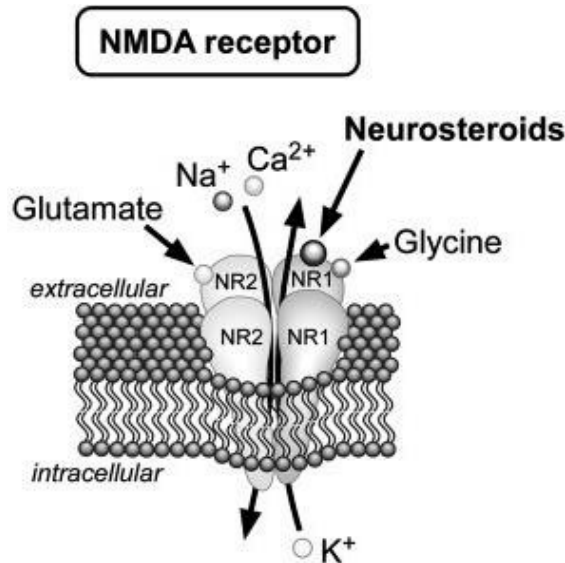
## 1.5 NMDA receptory

Další ze struktur, kde se mohou uplatnit NS, jsou glutamátové receptory typu NMDA (N-methyl-D-aspartát). V porovnání s GABA receptory nejsou mechanismy NS s NMDA receptory tolik prozkoumány. Nebylo zatím přesně identifikováno vazebné místo (Compagnone, 2000).

NMDA receptory jsou iontové kanály, které po navázání glutamátu a glycinu propouští  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky a  $\text{K}^+$  z buňky. Jedná se o heteromerní komplexy, složené z NR1, NR2A-D a/nebo NR3A-B podjednotek. Podjednotky jsou vždy topologicky stejně orientované - extracelulární N-konec, 4 membránové domény (M1-4) tvořící transmembránové (v případě M2 intracelulární) vratné klíčky a intracelulární C-konec (Sobolevsky, 2009).



Podjednotky NMDA receptoru tetramerní komplex, na kterém se vyskytují 2 vazebná místa pro glutamát a NMDA (NR2 podjednotka) a 2 místa pro glycin v případě NR1 podjednotky (Krausová, 2010).



Obrázek 5. NMDA receptor. Znázorněny jsou stavební podjednotky (NR1, NR2), tok iontů, látky ovlivňující aktivaci receptoru. Receptor vyžaduje 2 molekuly glutamátu nebo aspartátu a dvě molekuly glycinu. NS obsazují alosterické místo (Tsutsui, 2016)

NMDA receptory disponují dvěma místy pro alosterickou modulaci pomocí NS. Jedno zprostředkovává účinky pozitivních modulátorů, druhé negativních. Sulfátové neurosteroidy PS a DHEAS se ukázaly jako silné alosterické agonisty na receptorovém komplexu NMDA (Wu et al., 1991).

Mezi endogenní s inhibičním vlivem na NMDA receptory patří  $3\alpha5\beta S$  - pregnanolon sulfát (PAS), který ovlivňuje i GABA-A, AMPA nebo kainátové receptory. K tomu, aby se PAS navázal, musí být přítomna molekula glutamátu (use-dependentní antagonist), ale na druhou stranu není závislý na membránovém potenciálu (voltage-independentní). PAS zmenšuje pravděpodobnost otevření iontového kanálu, tudíž frekvence a doba otevření je snížena, což má výsledný negativní vliv (Chvojková, 2013).

Tonicky aktivované NMDA receptory jsou ovlivněny více než fázičky aktivované receptory na synapsích (synaptické NMDAr). Je to dáno use-dependentním působením PAS a farmakokinetickými vlastnostmi. Tento princip je důležitý pro možné klinické využití NS v momentech excitotoxicity zvýšeným množstvím extracelulárního

glutamátu. NS by znamenali efektivní omezení patologické aktivace NMDA receptorů, aniž by ovlivnili synaptický přenos (Chvojková, 2013).

Mezi zástupce s potenciačním účinkem patří DHEAS nebo pregnenolon sulfát (PS), u kterého byl zjištěn i inhibiční vliv na AMPA, kinátové receptory, GABA-A a glycinové receptory (Wu et al., 1991).

V poslední době se ukazuje, že PS nemá jednoznačný efekt. Výsledná modulace záleží na zastoupení jednotlivých podjednotek NMDA receptoru. Zatímco receptory s NRC2 a NR2D inhibuje, tak receptory s NR2A nebo NR2B potencuje. Pozitivní a negativní alosterický efekt je nejspíše dán různými alosterickými vazebnými místy pro NS jednotlivých podjednotek. Předpokládá se, že inhibiční vazebné místo by mohlo být shodné s vazebným místem pro  $3\alpha5\beta S$  (Horak, 2006).

Jedna z potenciálních syntetických látek je pregnanolon glutamát (PG), vyrobený v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. Jedná se o analog  $3\alpha5\beta S$ , u kterého je sulfátová skupina na C3 nahrazena glutamátem, čímž se zlepšil přestup přes HEB. Další výhodou je, že nepodléhá deaktivaci steroidními sulfohydrolázami. Podobně jako  $3\alpha5\beta S$  blokuje tonicky aktivované NMDA receptory a má neuroprotektivní účinky (Rambousek et al., 2011).

## 1.6 Ostatní receptory

Mezi další receptory, s kterými interagují NS, jsou podle farmakologických studií receptory  $\sigma$ . Jedná se o rodinu receptorů vyskytující se hojně právě v mozku. Z NS můžeme jmenovat DHEAS, pregnenolon a PS, přičemž DHEAS a PS se chovaly jako agonisté a progesteron jako antagonist. DHEAS potencuje, zatímco PS inhibuje NMDA-indukovaný norepinefrin a oba jsou citlivé na antagonisty  $\sigma$  receptoru. Účinky PS a DHEAS na  $\sigma_1$  receptory mohou být základem presynaptického účinku indukujícího uvolňování glutamátu (Reddy, 2010).

Sigma receptory byly identifikovány relativně nedávno. Změny ve funkci nebo jejich zastoupení v CNS se jeví jako další možnost v léčbě neurologických onemocnění jako je například epilepsie, amyotrofická laterální skleróza (ALS), Parkinsonova, Alzheimerova nebo Huntingtonova choroba (Piechal, 2021).

## 1.7 Možnosti neurosteroidů v léčbě

NS vycházející z 3 $\alpha$ -hydroxy-pregnanu, jako je ALLO, pregnenolon a THDOC, mají sedativní, anxiolytické a antikonvulzivní účinky. PS a DHEAS jsou naopak excitacioní a zlepšují paměť a působí proti úzkostem. Neuroaktivní steroidy (exogenní steroidy) se syntetizují pro lepší farmakokinetické vlastnosti a stále se vymýšlejí nové deriváty pro vyšší účinnost a snížení vedlejších nežádoucích účinků. I mezi nimi najdeme deriváty pro sedativní a anxiolytické účinky (minaxolony), dále anestetické (alfaxolon) nebo antiepileptické (Reddy, 2010).

<u>Neurosteroid</u>	<u>Pharmacological actions</u>	<u>Mechanism of action</u>
<b>Allopregnanolone</b>	Sedative-hypnotic	Potentiation of GABA-A receptor function
	Anxiolytic, anticonvulsant	
	Antistress, neuroprotection	
<b>THDOC</b>	Sedative-hypnotic	Potentiation of GABA-A receptor function
	Anxiolytic, anticonvulsant	
	Antistress, neuroprotection	
<b>Androstenediol</b>	Anxiolytic, anticonvulsant	Potentiation of GABA-A receptor function
<b>Pregnenolone sulfate</b>	Anxiogenic, proconvulsant	Inhibition of GABA-A receptor function
	Memory-enhancing, neuroprotection	Enhanced NMDA receptor function
<b>Dehydroepiandrosterone sulfate</b>	Anxiogenic, proconvulsant	Inhibition of GABA-A receptor function
	Memory enhancing	Enhanced NMDA receptor function
	Neurogenesis, neuroprotection	Antiglucocorticoid action

Tabulka 1. Farmakologické vlastnosti a mechanismy účinku základních NS (Reddy, 2010)

### 1.7.1 Epilepsie

Epilepsie je onemocnění CNS, při kterém se objevuje abnormální mozková aktivita, která vyústí v záchvaty, neobvyklé chování nebo pocity a v neposlední řadě ztrátě vědomí. Příznaky mohou být pestré. Někteří lidé nepřítomně zírají, u jiných se objevují tonicko-klonické záchvaty horními i dolními končetinami, které jsou v povědomí lidí, když se řekne epilepsie, nejrozšířenější. Lidé si často neuvědomí, že jediný záchvat automaticky neznamená, že daná osoba trpí tímto onemocněním. K diagnóze epilepsie jsou obecně vyžadovány alespoň 2 záchvaty bez známého spouštěče, které mají mezi sebou odstup alespoň 24 hodin. Léčebné postupy mohou být chirurgické nebo lékové.

Rizikovou skupinou jsou dětští pacienti. Dětské epilepsie se od onemocnění dospělých liší. U dospělých pacientů jsou typické symptomatické epilepsie nádorové, traumatické nebo cévní etiologie. U dětí převládají vrozené poruchy kortikálního vývoje, genetické mutace nebo perinatální poškození mozku (Košťálová, 2020).

Problémem se onemocnění stává, pokud je farmakorezistentní k známým léčivům a to dokonce i při kombinované dvojterapii. Proto se v dnešní době začíná zkoumat více preparátů, které by byly farmakokineticky vhodnými kandidáty bez vedlejších závažných účinků, například na vývoj motoriky, což je předmětem zkoumání této diplomové práce.

Neurosteroidy a jejich syntetická analoga (neuroaktivní steroidy) jsou cílem mnoha studií pro svoje antikonvulzivní účinky. V mnoha zvířecích modelech, při kterých se vyvolávaly záchvaty různými podněty jako aplikace pilokarpinu nebo pentetrazolem (Mareš et al., 2006), se některé neurosteroidy jeví jako významná antikonvulziva. Dále se zkoumaly účinky NS na záchvaty způsobené z vysazení kokainu, etanolu, diazepamu nebo samotných neurosteroidů (Devaud et al., 1996, Reddy a Rogawski, 2001, Tsuda et al., 1997). Ve velmi vysokých dávkách jsou NS účinné i před elektricky vyvolávanými šoky u myši (Reddy, 2010).

Ačkoli se přírodní neurosteroidy zdají jako slibné substance v léčbě, jsou zde určité překážky komplikující klinické použití. Typický zástupce endogenních NS allopregnanolon má například velmi krátkou biologickou dostupnost z důvodu rychlé inaktivace a eliminace konjugací glukuronidu nebo sulfátu na 3 $\alpha$ -hydroxylové skupině. Dále může být uvedená hydroxylová skupina oxidována na keton, čímž se obnoví aktivita na receptorech steroidních hormonů (Rupprecht, 1993).

Z těchto důvodů se lidé snaží najít vhodné syntetické analogické látky, které by měly výhodné farmakologické vlastnosti a nabídly možnosti léčby různých onemocnění, včetně epilepsie. Ganaxolon (3 $\alpha$ -hydroxy-3 $\beta$ -methyl-5 $\alpha$ -pregnan-20-on), 3 $\beta$ -methyl analog ALLO má dobré farmakokinetické vlastnosti a stejně jako ALLO je pozitivním alosterickým modulátorem GABA-A receptorů a je účinným antikonvulzivem při penetrazolem (PTZ) vyvolanými záchvaty (Reddy, 2010).

Průkaz antikonvulzivního účinku NS prokázal i Mareš et al. (2006), konkrétně byl použit ALLO na PTZ vyvolané záchvaty. Výsledky ukázaly, že ALLO snížil incidenci záchvatů a to především u mladších mláďat (P12).

### 1.7.2 *Katameniální epilepsie*

Katameniální epilepsie je onemocnění, při kterém ženy trpí záchvaty vázané na konkrétní dobu menstruačního cyklu a postihuje až 60% žen s epilepsií. Často tyto epilepsie bývají farmakorezistentní. Záchvaty se počítají v každé fázi cyklu a pak se stanoví diagnóza. Existují 3 vzorce katameniální epilepsie: perimenstruační, perioovulační a neadekvátní katameniální záchvaty v luteální fázi. Perimenstruační patří mezi nejčastější. V současné době neexistuje žádná medikamentózní cílená léčba na menstruační epilepsie (Reddy, 2010).

Ukazuje se, že na výskyt těchto záchvatů má vliv několik mechanismů jako kolísání hladin antiepileptik, změny rovnováhy vody a elektrolytů a fyziologické změny hladin hormonů během menstruačního cyklu. Bylo dokázáno, že endogenní NS (adrenální steroidní hormony a cirkulující androgeny) podstatně ovlivňují náchylnost k záchvatům (Reddy, 2009). Vysvětleno je to sníženou hladinou progesteronu (antikonvulzivní hormon) v perimenstruačním období, kde dochází k nejčastější exacerbaci onemocnění. Dále se vysazením progesteronu nebo ALLO dokázala zvýšená náchylnost k záchvatům. Je to dáno zvýšenou expresí  $\alpha 4$ -podjednotky receptoru GABA-A, což je molekulární signál pro zvýšenou neuronální excitabilitu (Smith, 1998). Další studie zkoumaly vysadit NS. Docházelo k zvýšené náchylnosti chemokonvulzivních záchvatů, snížené účinnosti benzodiazepinů a valproátu, ale zvýšil se antikonvulzivní efekt aplikovaných NS (Reddy, 2010).

Konvenční antiepileptika nejsou příliš účinná. Hormonální látky jako progesteron nebo NS se jeví jako vhodní kandidáti racionální terapie. Přestože je progesteron ve studiích snížením záchvatnosti úspěšný, má vedlejší nežádoucí hormonální účinky. Syntetické neuroaktivní steroidy by mohli být možností, jak se vyhnout nežádoucím vedlejším účinkům. Jedním ze slibných přípravků je Ganaxolon (viz diskuze).

### 1.7.3 *Úzkost*

NS hrají roli i v etiologii úzkosti. U ALLO, THDOC či progesteronu byly prokázány anxiolytické účinky. Podávání progesteronu vyvolalo sedativní účinky u mužů a žen. Tyto účinky se mohou blokovat pikrotoxinem, který funguje jako inhibitor neurotransmise přes GABA receptory. Tím se prokázal anxiolytický mechanismus NS vycházející z jejich vazby na alosterické místo GABA-A receptorů. Vliv NS na úzkost se objevuje i při léčbě fluoxetinu (inhibitor zpětného vychytávání serotoninu), při které

dochází k zvýšeným hladinám ALLO v mozku. Pacienti s indukovanými záchvaty paniky měli naopak hladiny ALLO snižené. Tudiž aplikace syntetických analogů NS by mohla mít význam při léčbě úzkostných stavů (Reddy, 2010).

Zvýšených hladin NS se dá docílit i zvýšenou biosyntézou pomocí selektivních ligandů pro translokátorové proteiny (FGIN-1-27, AC-5216, XBD173). Tím by opět došlo ke stimulaci GABA-A receptorů a výsledným anxiolytickým účinkům. Odpadla by komplikace léčby benzodiazepiny v podobě sedace a lékové tolerance (Rupprecht, 2009).

#### **1.7.4 Paměť a učení**

Ve studiích bylo prokázáno, že NS mají vliv na proces učení a paměť jak u mladých, tak starších lidí (Reddy, 2003). Mayo et al. (1993) zkoumal PS aplikovaný do bazálního magnocelulárního jádra, což mělo za následek zvýšení paměti. Aplikace ALLO měla naopak protichůdné účinky. Flood (1992) ve studiích uvádí, že aplikací pregnenolonu, PS, DHEA a DHEAS zvýšil paměť u myši. Aplikace byla systémová nebo do různých struktur podle konkrétní látky. Nejcitlivější strukturou a preparátem byla aplikace PS do amygdaly (Flood, 1995). Studií proběhlo mnoho a vždy se prokázaly výrazně korelace hladin NS s kognitivními funkcemi. PS zlepšil učení v Morrisově vodním bludišti nebo zlepšil výkon v úkolech hledání potravy. ALLO naopak snižoval retenci pachového úkolu u potkaních mláďat (Reddy, 2010).

Zajímavým zjištěním byly i hladiny DHEA a DHEAS u pacientů trpících Alzheimerovou chorobou. Předpokládá se, že uvedené látky mají vliv na stárnutí a kognitivní funkce. Dokonce je na trhu DHEA dostupný jako přípravek proti stárnutí. PS, DHEA a DHEAS (v tomto případě jako ligandy  $\sigma$  receptorů) zmírňují paměťové deficity vyvolané  $\beta$ -amyloidem související s Alzheimerovou chorobou. (Maurice, 1998).

Mezi další onemocnění, kde NS hrají roli v etiologii nebo léčbě patří deprese, stres, schizofrenie, premenstruační syndrom nebo léčba závislosti na alkoholu.

## 2 ONTOGENEZE LABORATORNÍHO POTKANA

### 2.1 Obecné informace

Laboratorní potkan je potkan poddruhu *Rattus norvegicus domestica*, který je chován pro vědecké účely. Ačkoliv se pro výzkum používají méně než myši, stále mají důležitou roli jako zvířecí model v psychologii a biomedicínské vědě (John G. Valdenbergh, 2000). Vzhledem k tomu, že patří po anatomické, farmakologické a fyziologické stránce mezi nejprozkoumanější zvířata, tvoří až 95% pokusných zvířat v biomedicínském výzkumu. V dnešní době již existuje několik vyšlechtěných druhů, které se používají pro různé účely. V laboratořích FÚ AV ČR se používají potkani rodu Wistar. Jedná se o bílé albíny. Dále existují druhy jako Long-Evans, Sprague Dawley nebo tzv. „knockout rats“, které jsou pomocí genetického inženýrství upravené, aby mohli simulovat lidské nemoci a mohli být použity při vývoji nových léčiv. Jedná se například o modely pro výzkum diabetu, Alzheimerovy a Parkinsonovy nemoci, hypertenze a v neposlední řadě epilepsie (Abbott, 2004).

K mému překvapení se motorickému vývoji potkanů lidé věnují již mnoho let. První zmínky o motorickém vývoji se objevují v práci Smalla (1899), který ale primárně zkoumal behaviorální chování laboratorních potkanů. O několik let na to navázal Crozier a Pincus (1926, 1933) s prací geotaktického chování. Rozsáhlejší práci popisující motorický vývoj ve spojení s dozráváním určitých mozkových částí pak zpracoval roku 1933 Tilney (Altman, 1975).

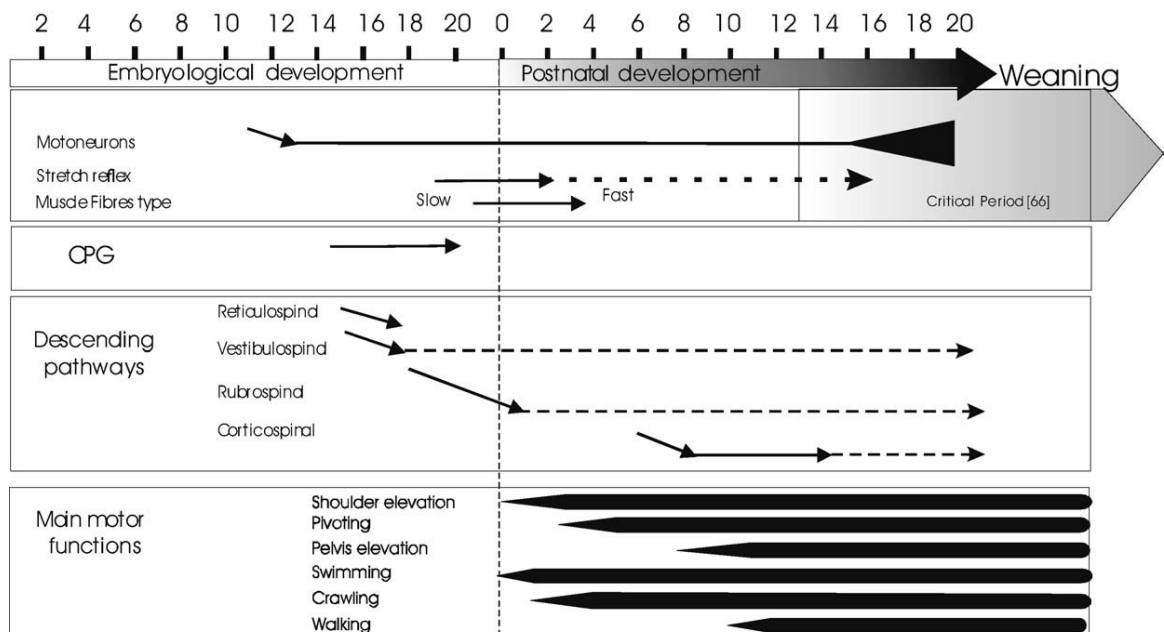
### 2.2 Ontogenetický vývoj potkana

Většina obratlovců je brzy po narození schopno stoje či chůze. Potkani a lidé patří do skupiny savců, kteří jsou v době narození v mnoha systémech ještě nevyvinutí (Vinay, 2002). Jak u lidí, tak u potkanů dochází k rozvoji motorických, sensorických a senzitivních funkcí a reflexů díky vrozeným vzorcům CNS (Vinay et al., 2002; Vojta a Peters, 1995).

Vývoj člověka a potkana je velice podobný. Určité rozdíly jsou dány poměry dozrávání jednotlivých struktur CNS a délkami trvání jak prenatalního, tak postnatalního vývoje. Dalším významným společným znakem je kranio-kaudální vývoj. (Vinay et al., 2005).

Prenatální období u lidí trvá 9 měsíců a dospělost se udává kolem 20 let, zatímco u potkanů trvá vývoj 6 týdnů (3 týdny embryonální a 3 týdny postnatální). Dospělost je dosažena již v 60. dni (Vinay, 2005).

Jak již bylo uvedeno výše, potkani i lidé se rodí velmi nezralí. Potkaní mláďě se rodí hluché a slepé. K orientaci mu slouží olfaktorický systém, který v tuto dobu hraje důležitou roli při hledání bradavky matky, aby mohlo sát mléko. Z dalších systémů, které hrají velmi důležitou úlohu při vývoji, je systém vestibulární. Rovnovážný systém se začíná vyvíjet 8. embryonální den (E8) a končí 15. dnem postnatálním (P15). Descendentní dráhy z mozkového kmene dosahují struktur lumbální části míchy pár dní před porodem. Jedná se o reticulospinální a vestibulospinální dráhy. Dále je třeba zmínit serotogenní a noradrenergické projekce, které byly častými cílovými strukturami při laboratorních in vitro pokusech. Uvedené dráhy nedozrají dříve než do konce druhého postnatálního týdne (Clarac, 1998).



Obrázek 6. Schéma zrání struktur podílejících se na motorice (Jamon, 2006)

Čas vzniku a následný růst struktur týkající se lokomoce je znázorněn šipkami. Embryonální vývoj se vztahuje k procesům objevujícím se již v děloze. Šikmé šipky znázorňují antero-posteriorní gradient). Přerušované šipky značí kontinuální maturaci. Diagram ve spodní části znázorňuje nabytí motorických funkcí v daném čase.



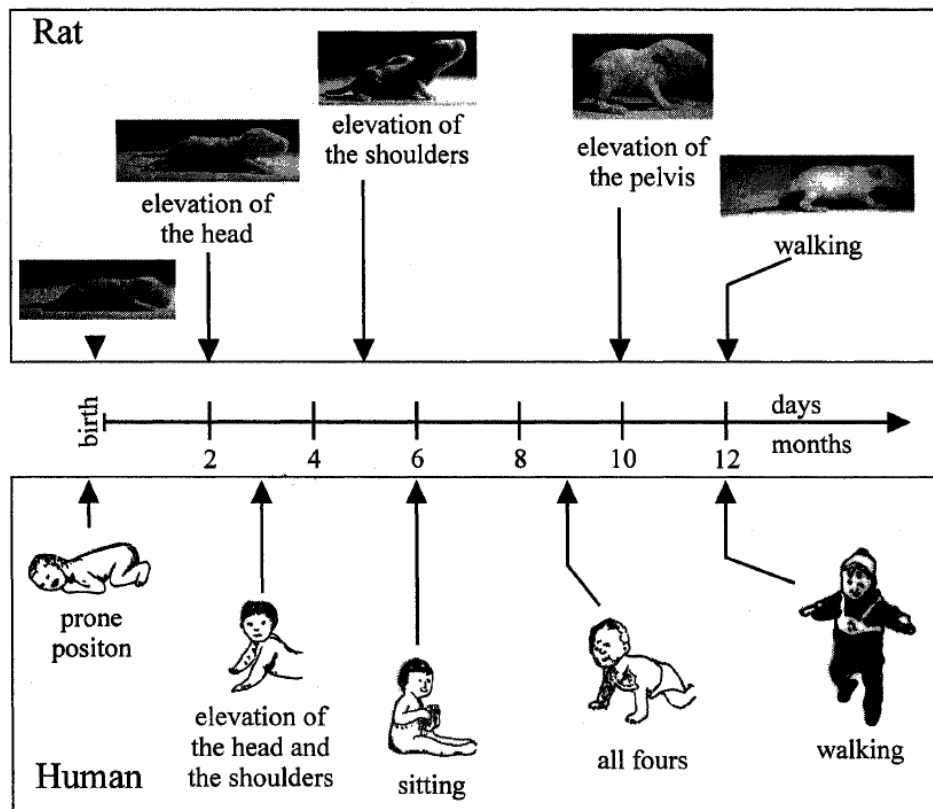
## 2.3 Vývoj lokomoce a postury potkana

Lokomoce se dělí na 2 složky. Fázická komponenta je zodpovědná za rytmické kontrakce končetin a svalů trupu a vychází z tzv. „central pattern generators“ (CPG) ve spinální míše. Druhá komponenta lokomoce – tonická složka, nastavuje celkový tonus posturálních svalů, který je potřebný k pohybu. Na rozdíl od složky tonické, tak se fázická komponenta (CPG) objevuje již při narození. K prvním projevu posturální kontroly tak dochází již v prvním týdnu. To vše koreluje se zráním několika systému jako je například muskuloskeletální systém, senzomotorika, vyšší mozková centra, descendentní dráhy z cortexu do míchy a ascendentní dráha zajišťující zpětnovazebný tok informací do supraspinálních jader (Vinay, 2005)

Vinay ve své práci uvádí, že jeden den potkana koresponduje se 3 měsíci novorozence. Můžeme to například vidět v druhém postnatálním dni (P2) vývoje potkana, kdy je schopný již zvedat hlavu nad podložku. To samé je běžné u 2-3 měsíčního fyziologického dítěte. Kolem pátého postnatálního dne (P5) začíná potkaní mládě zvedat ramena od podložky, což je spojováno s funkční zralostí předních končetin, které jsou schopny nést váhu přední části těla. Zadní končetiny jsou do konce prvního týdne neaktivní a nejsou tedy schopny podpořit elevaci pánve. Funkce akrálních částí, jako jsou packy a prsty, se rozvíjí desátý den (P10). Dvanáctý den je mládě schopno chůze. V tomto stručném nastínění si můžeme povšimnout (Obrázek x) velké podobnosti ve vývoji lokomoce s člověkem (Vinay, 2005).

Od P12-P13 se chůze začne postupně zlepšovat. Oči jsou po 13. dni již plně otevřené, což má velmi stimulující efekt a hraje roli při zdokonalování řízení pohybu u mnoha savců. Motorika končetin je stále ještě pomalá a kontrola trupu slabá. V P14 se objevují vertikální pohyby v podobě stoje na zadních, což umožňuje volnost předních končetin pro manipulaci. V P15 se komplexní pohyby stávají plynulejšími a více efektivními. Signifikantně se zlepšuje i rychlost pohybu (Clarac, 1998).

Gramsbergen (1998) zkoumal EMG vzory extenzorů zadních končetin – musculus gastrocnemius, m. soleus a m. tibialis anterior ve funkci antagonisty. Zjistil, že před P15 jsou pohyby hlavy prováděny pouze ve statických polohách. Jakmile potkan dosáhne tohoto věku, začínají se pohyby hlavy objevovat i při chůzi. Nálezy na EMG koreluje s různým zapojováním těchto svalů v krokovém cyklu. Od P16 je reciproční aktivace extenzorů a flexorů v souvislosti s krokovým cyklem mnohem přesnější.



Obrázek 7. Schématické porovnání vývoje lokomoce člověka a potkana (Vinay, 2005)

### 2.3.1 Shrnutí

Ačkoliv jsou některé reflexy vyvolatelné okamžitě (plavání), je mládě potkana stejně jako člověk v době narození lokomočně neaktivní. Nejvýznamněji se postura vyvíjí první den od narození do dvou týdnů života. Jakmile dozrají senzorické receptory, dojde k výraznému zlepšení dynamické složky motoriky (Gramsbergen, 1998).

Dále autoři rozdělují vývoj motoriky na 3 fáze. P4-P5 je označováno jako brzké postnatální období, kde není mládě ještě příliš motoricky zdatné a je charakterizováno zvedáním hlavy a sacími pohyby k zajištění potravy. Od P6-P12 pozorujeme první vertikální pohyby v podobě zvedání ramen od podložky a vsunutím předních končetin do abdukce tak, aby došlo k elevaci přední části těla. Od P16 se objevují komplexní motorické vzory jako stavění na zadní končetiny. Dospělost značí plynulost pohybů nebo třeba i začínající péče o srst (Jamon, 2006).

## 2.4 Senzorické funkce

### 2.4.1 Význam aferentních vstupů pro vývoj

Senzorické vstupy hrají důležitou roli při vývoji somatosenzorického kortexu během neonatální periody. Mezi brzké stimuly můžeme zařadit pasivní interakce mláďate s matkou nebo se svými sourozenci, ale také aferentní „feedback“ (zpětnou vazbu) vznikající ze spontánní motorické aktivity (Akhmetshina, 2016).

Zajímavým faktem je zcela zásadní význam vibrisů (hmatové vousy) u hlodavců. Vibrisy jsou stimulovány taktilními podněty sourozenců z vrhu, ale též spontánními pohyby. U hlodavců se popisuje specifická struktura nazývaná „barelový kortex“, což je část somatosenzorické kůry a je velmi spjatá se stimuly z hmatových vousů, které tuto oblast významně aktivují. Studie (Akhmetshina, 2016) dále porovnávaly endogenní a exogenní stimuly z hmatových vousů a výsledky potvrzují důležitost prostředí při vývoji kůry během neonatální periody, neboť u izolovaných zvířat byla kortikální aktivita z absence vnějších podnětů nižší (Akhmetshina, 2016).

Další studie (Smirnov, 2019) porovnávaly efekt zastřížení vibrisů s kontrolní skupinou. Byly sledovány dvě věkové skupiny P1-P8 a P9-P16. V těchto skupinách již probíhají důležité vývojové procesy (otevírání očí, chůze, péče o sebe, stoj na zadních končetinách, rozvoj hybnosti předních končetin) včetně lokomoce. U kontrolních skupin proběhlo předstírané zastříhnutí. Ve skupině P1-P8 se zastříženými hmatovými vousy se prokázalo zpomalení ve všech výše zmíněných procesech. U starší skupiny pouze péče o sebe. Zajímavým výsledkem bylo, že u všech obou starších skupin, s kterými se manipulovalo (zkoumané i kontrolní), došlo k opoždění v explorativním chování, ale naopak k akceleraci péče o srst (Smirnov, 2019).

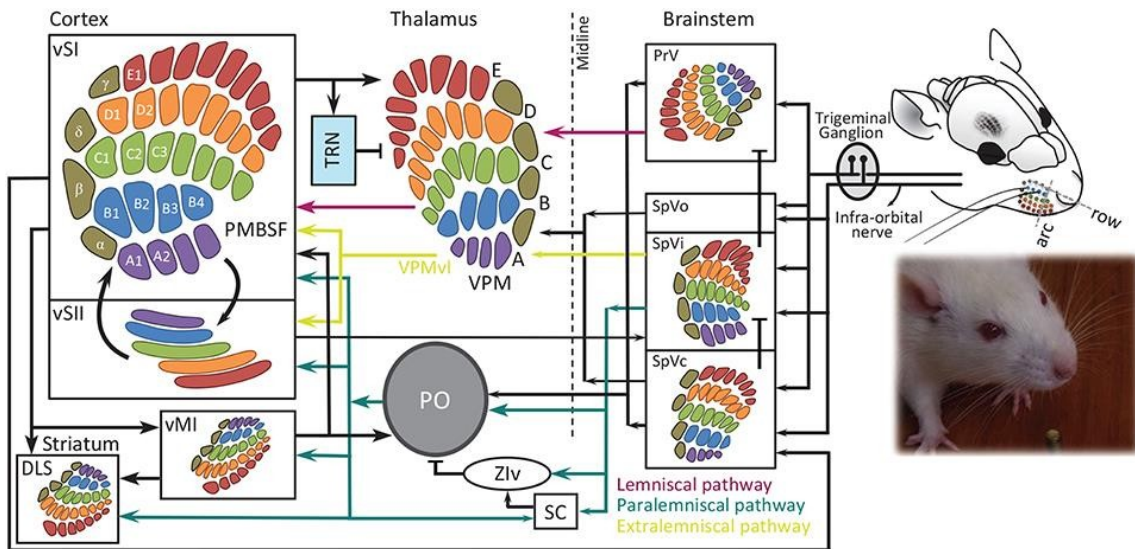
Dosavadní poznatky o funkcích somatosenzorické kůry a o vlastnostech senzorycky evokovaných reakcí u novorozených hlodavců jsou založeny především na studiích využívajících izolovaná novorozená mláďata s přidržováním hlavy (Khazipov et al., 2004; Yang et al., 2009; Blumberg et al., 2015). Bylo prokázáno, že aktivita neuronové sítě v somatosenzorickém kortexu mláďate má diskontinuální časovou organizaci a charakteristické přerušované záchvaty, které jsou organizovány ve tvaru vřeténka a gama oscilací. Ty jsou odděleny pauzami s nulovou aktivitou o délce desítek sekund (Khazipov et al., 2004; Minlebaev et al., 2007, 2009, 2011; Yang et al., 2009, 2013). Tato aktivita může být spontánní i po deaferentaci, nicméně je účinně vyvolatelná exogenní somatosenzorickou stimulací, což v hnízdě reprezentuje jak

matka, tak sourozenci. Dalším zdrojem stimulace jsou spontánní myoklonické záškuby a úleky, což je pro novorozená mláďata charakteristické. Tyto podněty způsobují aktivitu v somatosenzorickém thalamu a mozkové kůře (Khazipov et al., 2004; Mohns a Blumberg, 2010; Tiriac et al., 2012). Celkové smyslové vstupy do mozkové kůry mohou zahrnout jak samostatně generované pohyby novorozeného potkana, tak pasivní stimulaci poskytovanou sourozenci a matkou. Detailnější principy konkrétních mechanismů smyslových podnětů a jejich vlivu na somatosenzorickou kůru v naturalistickém prostředí jsou zatím velkou neznámou (Akhmetshina, 2016).

Ve studiích aferentních vstupů vidím jistou podobnost z Vojtovy metody u novorozenců. Zde si také všímáme projevů, které nás mohou informovat o zralosti CNS a zároveň máme možnost vstoupit do procesu neuroplasticity zevními stimuly a ovlivnit tak případný patologický vzor vývoje jedince.

#### **2.4.2 Somatosenzorický systém**

Somatosenzorický systém je zvláště zajímavý, protože potkani používají své obličejové vousy k získání velkého množství informací o objektech v jejich prostředí. Systém je specializovaný na přijímání a zpracování aferentních informací z receptorů spojených s jejich vousy. Každý vous je reprezentován „barelovou strukturou“ (barrel-like structure) v trigeminálním jádru mozkového kmene, ventroposteriorním jádře kontralaterálního thalamu a primární somatosenzorické oblasti S1 kontralaterálního kortexu. Somatosenzorické informace o dotyku ze všech částí povrchu těla jsou přenášeny z jader dorzálního sloupce a komplexu trigeminu do kontralaterálního ventroposteriorního thalamickeho komplexu (VP) a poté do somatosenzorického kortexu. Kortex zahrnuje primární reprezentaci (S1) se stejným modulárním uspořádáním „sudů“ pro vstupy do vousů a podobnými moduly pro jiné části těla, které jsou od sebe odděleny septy obsahující menší počet buněk. Jedná se o jakési uspořádání vousů, které se „obtiskne“ do každé za vzaté struktury a drží si prostorové uspořádání (viz obrázek x). Rostrální hranice je tvořena dysgranulárním kortexem s méně vyvinutou vrstvou 4, která je zapojena do propriocepce. Mezi další somatosenzorické oblasti patří oblast S2, parietální ventrální (PV) oblast a kaudální pás somatosenzorického systému. Všechny tyto vyšší úrovně přijímají informace z oblasti S1, kdežto S1, S2 a PV přijímají talamicke vstupy z VP (Ebner, 2015).



Obrázek 8. Schéma zapojení vousů do barelového kortexu. Každý vous je označen kombinací písmena a číslicí odpovídající jeho pozici. A-E udává řadu od dorzální k ventrální, čísla pořadí od ocasní k rostrální. **PMBSF** – zadní-mediální soudkové dílčí pole, **PO** – zadní talamické jádro, **PrV** – hlavní trigeminální jádro, **SC** – colliculus superior, **SpVi** - spinální trigeminální jádra pars interpolaris, **SpVo** - pars oralis, **SpVc** - pars caudalis, **TRN** - retikulární jádro thalamu, **VPM** - ventro-posteriorní mediální jádro, **vM** - vibrisální primární motorická kůra, **vS** - vibrisální primární somatosenzorický kortex, **vSII** - sekundární somatosenzorický kortex se somatotopickou mapou (Adibi, 2019)

### 2.4.3 Vestibulární systém

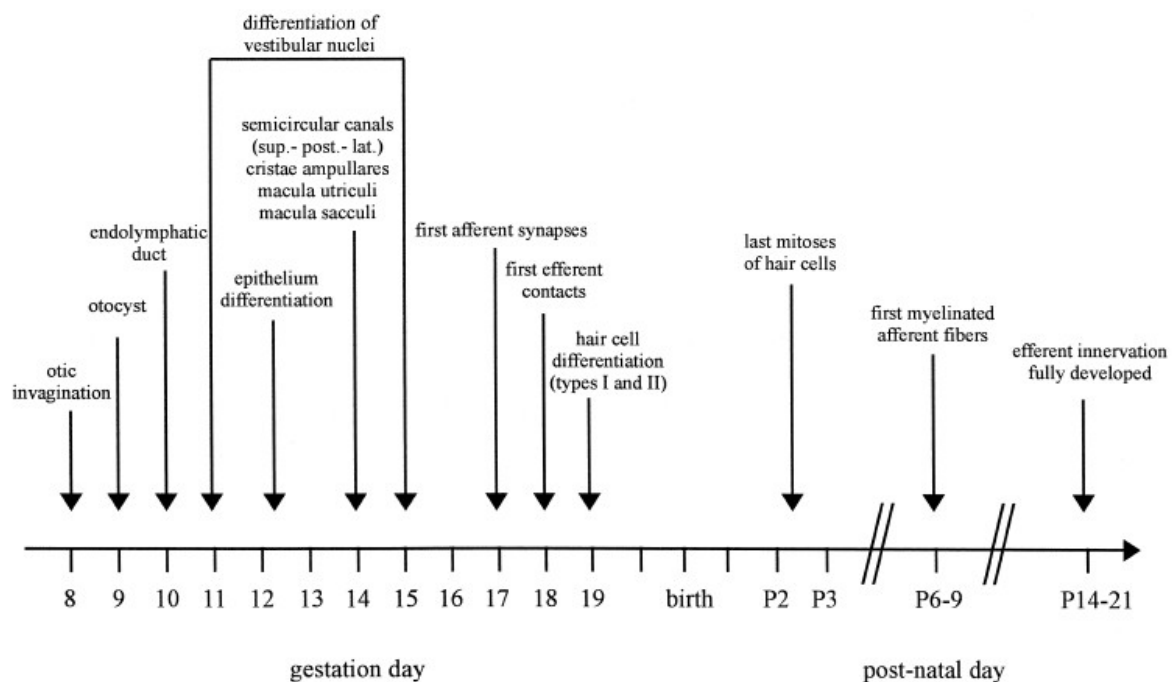
Gravitace se stala významným stimulem pro rozvíjení posturálních funkcí všech suchozemských živočichů. Nejdůležitějšími systémy pro řízení postury proti vnějším silám jsou systémy vestibulární a somatosenzorický. Vzhledem k tomu, že jsou tyto systémy v době narození nezralá, je jakákoliv koordinace neefektivní. (Košťálová, 2020).

Stejně jako u člověka vestibulární systém spolupracuje s ostatními strukturami (zrakové a proprioceptivní vjemy) podílejícími se na motorice. Tím je dosažená efektivní posturální aktivita hlavy a trupu v trojrozměrném prostředí proti gravitaci. Části vestibulárního systému jsou receptory, vestibulární jádra a jejich aferentní a eferentní dráhy (Clarac et al., 1998).

Vestibulární systém se začíná vyvíjet 8. embryonální den (E8) invaginací otické membrány. Následující den (E9) se formují otocysty a v E10 je viditelný endolymfatický kanálek. V E12-E13 začne diferenciace neuroepitelu a koncem E14 lze rozpoznat klíčové struktury – cristae ampullares, maculus utriculus a maculus sacculus. Terminální mitozy vláskových buněk se objevují mezi E14 a P2 s vrcholem v E17. E17 a E18 jsou charakteristické pro objevení aferentních a eferentních nervových zakončení.

E19 je typický pro diferenciaci vláskových buněk na typy I a II. Diferenciace vestibulárních jader probíhá mezi E11 a E15. Tato jádra hrají důležitou roli při prvních dnech života mláďete potkana. Laterální jádra se účastní posturální stabilizace již při narození, mediální a posteriorní o dva týdny později se stabilizací pohledu (Clarac, 1998).

Přestože jsou vláskové buňky zralé na konci prvního poporodního týdne a jejich eferentní zapojení trvá ještě další 2-3 týdny, tak je vestibulární stimulace efektivní již v prvním postnatálním dnu (P1). V těchto dnech narůstá počet synaptických těl a synapsí mezi vláskovými buňkami a aferentními nervy a dokončují se transdukční mechanismy zráním iontových kanálů (Clarac, 1998).



Obrázek 9. Schématické znázornění vývoje vestibulárního systému (Clarac, 1998)

#### 2.4.4 Sluchový orgán

Sluchové funkce se neobjeví do P12. Bolles testoval sluch pomocí úlekových reakcí reagující na krátký zvukový stimul. Mláďata stará 12 dní nereagovala, zatímco všechny starší věkové skupiny již disponovaly úlekovým reflexem. Do doby než mláďata přestanou být kojena, reagují na zvuk úlekem bez ohledu na stav bdělosti. Od P19 již reagují na zvuky mimo klec a od P21 je citlivost na zvuk vyšší s doprovodnými behaviorálními reakcemi v podobě pátracího chování po zdroji zvuku vyjádřené během ke stěně klece nebo očichováním (Bolles, 1964).

### **2.4.5 Zrak**

Počátek vizuálně orientačních reakcí není tak přesně stanovený jako v případě sluchu. Otevření víček se objevuje v rozmezí P13-P14. Může se zdát ještě před plným rozevřením víček, že se mláďata natahují k objektům při současném očichávání. Budí to dojem, že se na danou věc dívají, ale toto chování se vyskytovalo i u pokusů, kde byli jedinci oslepeni, čímž se prokázalo, že zde není žádná spojitost s vizuálním stimulem (Bolles, 1964).

### **2.4.6 Čich**

V době narození, jak již bylo zmíněno, je čich nejdůležitějším vstupem informací. V této době, ačkoliv není olfaktorický systém ještě plně zralý, jsou receptorové synapse aktivní a schopny poslat informace do čichového kortexu (Clarac, 1998).

Běžně se při očichávání objevují doprovodné pohyby nosem a vousy, mělké dýchání a charakteristická postura. U mladých jedinců (okolo P4) je toto vidět spíše vzácně a chybí pátrací pohyby nosem a vrtění vousů. K dospělému komplexnímu vzoru očichávání se mládě vyvine až kolem P11, což se ještě více zvýrazní s první chůzí v dalších dnech. Okolo P15 již mládě systematicky očichává celý prostor klece a veškeré objekty, na které narazí. Od té doby už používají potkani čich neustále mimo spánek, sycení nebo při péči o srst (Bolles, 1964).

### 3 CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem diplomové práce bylo sledování vlivu allopregnanolonu na motoriku mláďat laboratorního potkana v motorických testech. Získaná data budou sloužit jako referenční studie k diplomové práci z roku 2020 (Tereza Košťálová), která zkoumala vliv nového neuroaktivního steroidu pregnanolonpyroglutamátu, který se jeví jako potenciálně vhodná látka při léčbě dětských epilepsií. Testovány byly pouze krátkodobé účinky. Dlouhodobé účinky je třeba doplnit v dalších studiích. Byly mezi sebou porovnávány 3 věkové skupiny, kde každá z nich byla rozdělena ještě dále na skupiny s nižším a vyšším dávkováním.

#### **Hypotéza 1**

$H_0$ : motorika se v průběhu vývoje signifikantně nemění.

$H_A$ : motorika se v průběhu vývoje signifikantně mění.

#### **Hypotéza 2**

$H_0$ : motorika potkanů se po podání allopregnanolonu oproti kontrolní skupině signifikantně nemění.

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

#### **Hypotéza 3**

$H_0$ : motorika potkanů se signifikantně nemění v závislosti na dávkování použité látky.

$H_A$ : motorika potkanů se signifikantně mění v závislosti na dávkování použité látky alespoň v jednom motorickém testu.



## 4 METODIKA

Testování bylo prováděno v behaviorální laboratoři na půdě Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (FGÚ AV ČR) za podpory projektu PharmaBrain, vše v souladu se zákonem ČR o ochraně zvířat proti týrání, podle standardů humánní péče a využívání laboratorních zvířat.

### 4.1 Pokusná zvířata

Pro pokusy byla použita mláďata potkana typu Wistar. Tento druh pochází z Wistar Institutu v Pennylvánii. Více než polovina linií, které se dnes používají po světě, pocházejí právě z originální kolonie, kterou započal fyziolog Henry Herbert Donaldson (Clause, Bonnie Tocher 1998).

Podmínky chovu probíhaly podle standardů FGÚ AV ČR. Byl dodržen pravidelný 12 hodinový světelný režim, stálá teplota 22 °C a vlhkost 55%. Zvířata se po 5.dni rozdělila do skupin po 10 samcích a matce. Kromě doby provádění testů měli k dispozici potravu a vodu.

### 4.2 Testování

Testy probíhaly v klidné místnosti s umělým osvětlením a konstantní teplotou 24°C a vždy ve stejném časovém rozmezí od 13:00 do 16:00. Všechny motorické testy jsem prováděl a vyhodnocoval já. Účinná látka allopregnanolon byla aplikována intraperitoneálně.

Testováno bylo celkem 60 jedinců, kteří byli rozděleni do 3 věkových kategorií. 12, 18 a 25 denní skupiny byly ještě dále rozděleny na poloviny, s tím že část dostala vyšší dávku zkoumané látky 10 mg/kg a druhá nižší 5 mg/kg. Kontrolním skupinám bylo aplikováno organické rozpouštědlo cyklodextrin (CDX) 10 mg/kg. Každý potkan byl testován pouze jednou. Měření probíhalo v období od 30. 6. 2022 do 21. 7. 2022.

Nejprve bylo potřeba všechny přesně zvážit, zaznamenat a označit buď přímo na hřbet či značením na ocas. Dále byl přes břišní stěnu v 7 minutových intervalech aplikován allopregnanolon, který se nechal 20 minut působit, potom následovaly motorické testy. Začínali jsme měřením spontánní motoriky v openfield testu, který byl nastaven na 5 minut, a poté následovaly jednotlivé motorické testy pro dané věkové skupiny. U 12 denních mláďat jsme pro měření motorické aktivity použili surface

righting test, bar holding test, negative geotaxis test a wire mesh ascending test. U 18 a 25 denních jedinců byl použit surface righting test, bar holding test a horizontální žebříky s tím, že jeden byl pravidelný a druhý nepravidelný.

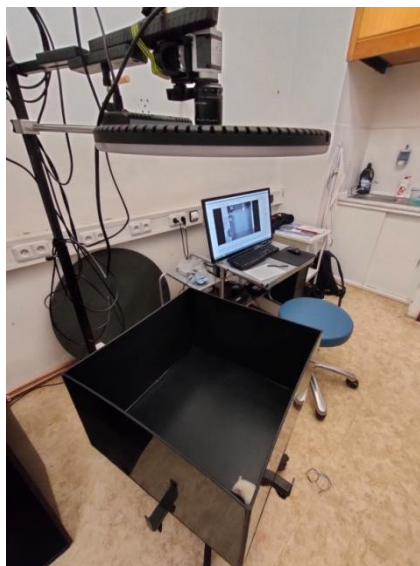
### 4.3 Motorické testy

Pro hodnocení krátkodobých účinků allopregnanolonu bylo použito 6 motorických testů podle Altmana a Sudarshana (1975) a Mikulecké a Mareše (2002), které korelují s úrovní vyžrání CNS. Hodnocení spontánního pohybu se měřilo ve vyhrazeném prostoru, tzv. „openfield test“, v kterém je motorika potkanů automaticky zaznamenána a vyhodnocena pomocí kamery z vrchu a softwaru EthoVision XT (©Noldus Information Technology).

#### 4.3.1 *Openfield test*

Openfield test je jednoduchý senzomotorický test, který stanovuje míru obecné aktivity, motoriku, míru anxiety a s tou související badací tendence pokusného zvířete. Potkani preferují držet se stěn a aktivně příliš nevyhledávají otevřené prostory, což v tomto testu zastupuje střed pole.

Testování jedinci byli vždy položeni do stejného rohu, čímž měření začalo. Jejich pohyb byl nahráván z vrchu kamerou (Panasonic Wv BP330), která byla umístěna 1 metr nad středem sledovaného prostoru. Po dobu 5 minut byla aktivita zaznamenávána a následně zpracovávána systémem. Měřenými parametry byla vzdálenost, kterou potkan po dobu 5 minut ušel, průměrná rychlost, dále doba do prvního vstupu do středu, čas setrvání ve středu a frekvence, kolikrát se v centru pole vyskytl.



Obrázek 10. Openfield test (archiv autora)

### 4.3.2 *Surface righting test*

Righting reflex je motorická schopnost mláděte dostat se z supinační polohy do pronační. U hlodavců se objevuje v průměru u 5. dne v rozsahu 1 – 10 dnů. Tento test vyžaduje trupovou stabilitu a může ozřejmit posturální disbalance (Feather-Schussler, 2016).

Potkan byl umístěn v supinační poloze na rovném povrchu, aby se hlavou a trupem dotýkal podložky. Měřila se doba do otočení na břicho případně s jakými odchylkami. Otočení do 1 sekundy bylo hodnoceno jako úspěšné číslem 1, zvýšení času otočení značilo patologii.



Obrázek 11. Righting test, 5 denní mládě (Feather-Schussler, 2016)

### 4.3.3 *Negative geotaxis test*

Tento test hodnotí motorickou koordinaci na nakloněné rovině. Potkan byl položen hlavou dolů na rovině s hrubým povrchem a sklonem 30°. Díky vestibulárnímu podnětu vznikajícímu vlivem gravitace má mládě tendenci otočit se hlavou směrem nahoru. Pro otočení o 180° byl stanoven limit 90 sekund, byly zaznamenávány i případy částečného otočení.



Obrázek 12. Negative geotaxis test (archív autora)

#### 4.3.4 *Bar holding test*

Vis na hrazdě testuje uchopovací reflex a sílu jak pacek, tak celých končetin. Tento test se doporučuje provádět od 10. postnatálního dne (Feather-Schussler, 2016). Potkan byl uchopen za šíji a přiblížen k hrazdě tak, aby se mohl dotknout předními packami a aktivně chytit. Dřevěná hrazda o délce 25 cm a průměru 1 cm byla umístěna ve výšce 25 cm nad akváriem, které bylo vystlané měkkým povrchem. Byl měřen jak celkový čas visu pomocí úchopového reflexu předními i zadními končetinami, tak způsob držení případně i vylezení na hrazdu.



Obrázek 13. Bar holding test (archiv autora)

#### 4.3.5 *Wire mesh ascending test*

Pro tento test byla použita podložka z pevného materiálu, která má v sobě otvory, takže připomíná síť. Je dlouhá 45 cm, široká 15 cm a s laboratorním stolem svírá 70°. Potkan byl umístěn na spodní část a měřil se čas, za který vyleze na horní plošinu. Časový limit byl 60 sekund. Pokud nevylezl až nahoru či spadl, zaznamenala se uražená vzdálenost za daný čas.

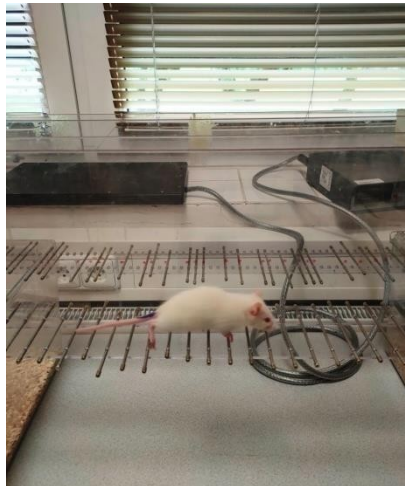


Obrázek 14. Wire mesh ascending test (archiv autora)

#### 4.3.6 Pravidelný a nepravidelný horizontální žebříky

Horizontální žebříky byly tvořeny kovovými příčkami, které jsou ukotveny do dvou plexiskel, které rovněž slouží jako stěny. Šířka takto vytvořené trasy byla úzká tak, aby byli potkani motivováni jít pouze vpřed a neotáčeli se, což se v některých případech stejně stalo. Délka žebříků byla 1 m a byly na každé straně umístěny na akvária ve výšce 30 cm nad pracovní plochou. U pravidelného žebříku byl rozstup příček 1 cm, u nepravidelného kolísala vzdálenost od 1 do 5 cm.

Testovaný jedinec byl umístěn na jeden konec a měřil se čas prolezení na druhou stranu. Rovněž jsme počítali chyby v podobě prošlapů nebo sklouznutí mimo příčky. Časový limit byl 60 sekund a bylo zachováno pořadí žebříků s tím, že se vždy začínalo na pravidelném. Pokud potkan nedošel na konec, zaznamenala se ušlá vzdálenost a čas.



Obrázek 15. Chůze po žebříku  
(archiv autora)

## 5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Výsledky měření v openfield testu zpracoval automaticky software EthoVision XT. Zbýlé motorické testy byly měřeny ručními stopkami.

Pro zpracování hodnot byl použit program SigmaStat® (SYSTAT). Nejdříve byly spočítány průměry a míry rozptylu (směrodatná odchylka a střední chyba průměru) pro jednotlivé věkové a dávkové skupiny. Dále jsme výsledky skupin (kontrolní, 5 mg/kg, 10 mg/kg) srovnali s parametrickou analýzou rozptylu ANOVA. Pokud rozložení dat neodpovídalo normálnímu rozložení, byla použita neparametrická metoda ANOVA on Ranks vždy s následným párovým srovnáváním Holm-Sidakovým testem. Jako hladinu statistické významnosti jsme používali 5%.

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

## 6 VÝSLEDKY

V této kapitole jsou uvedeny výsledky měření doplněné o grafy s popisky. Statistické zpracování a design grafů byl proveden v softwaru SigmaStat a SigmaPlot® (SPSS).

Jak již bylo zmíněno výše, byly provedeny pouze testy s krátkodobými účinky, dlouhodobé je třeba doplnit v dalších pokusech. Jedná se o provedení stejných testů jako u krátkodobých účinků doplněné o „Passive avoidance“ test zkoumající krátkodobou a dlouhodobou paměť a „Jumping down with choice test“, který se zaměřuje na míru anxiety potkanů.

### 6.1 Akutní účinky

Celkově bylo testováno 62 mláďat potkana ve třech věkových skupinách – 12, 18 a 25 denní. Každá věková kategorie byla dále rozdělena na dávkování nižší a vyšší (5 a 10 mg/kg). Ačkoliv jsme při měření přidali 2 kontrolní jedince, naměřená data kontrolní skupiny byla doplněna z výše uvedené práce Terezy Košťálové (2020). Kontrolám bylo aplikováno organické rozpouštědlo cyklodextrin (CDX) 10 mg/kg.

#### 6.1.1 *Surface righting test*

Tento test jsme použili ve všech 3 věkových skupinách.

U 18 denních a 25 denních nebyly zaznamenány změny v čase otočení. Potkani měli tendenci otáčet se již v rukou při umístování na podložku, či hned po položení do supinační polohy.

U 12 denních došlo k statisticky významným změnám. V dávkách 5 mg/kg proběhlo u 6 z 10 potkanů k otočení za více než jednu sekundu. V dávkách 10 mg/kg byly zaznamenány největší změny této věkové skupiny. 2 z 10 potkanů vykazovaly navýšení času otočení a 7 z 10 se neotočilo v časovém limitu vůbec a zůstali ležet.

#### 6.1.2 *Bar holding test*

Bar holding test byl též hodnocen ve všech 3 zkoumaných věkových skupinách. S věkem se doba udržení na hrazdě prodlužovala. Po aplikaci ALLO se časy zkrátily ve všech skupinách s tím, že největší rozdíly jsou ve skupině nejstarší (P25).

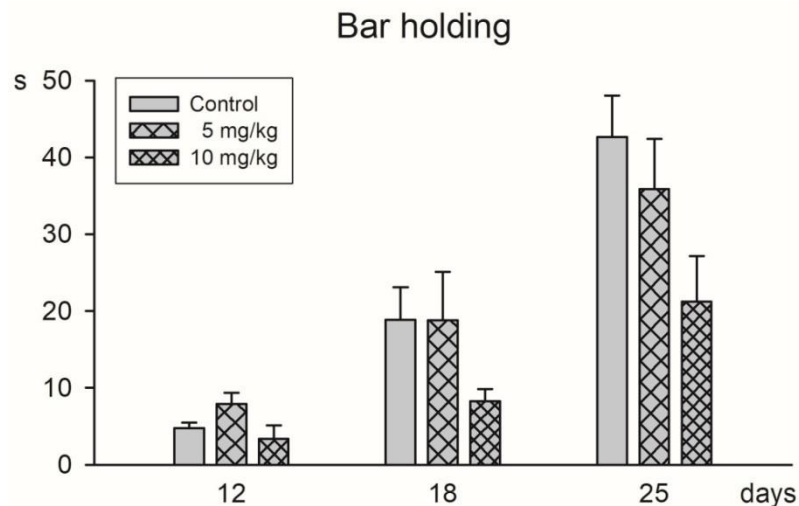
U 12 denních potkanů podání ALLO v dávce 5 mg/kg mírně zvýšilo celkové časy udržení na hrazdě oproti kontrolní skupině, jeden potkan dokonce dokázal vylézt

nahoru. Ve vyšší dávce 10 mg/kg polovina testovaných zvířat (5/10) ani nezahájila test z důvodu neuchopení hrazdy. U zbylých došlo ke zkrácení doby na hrazdě oproti kontrolní skupině.

Ve skupině s 18 denními mláďaty se nižší dávka neprojevila v časech testů oproti kontrolní skupině, až na jednoho jedince, který se ani nechytl. Zato vyšší dávky významně snížily časy testů oproti kontrolní skupině.

U nejstarší testované skupiny s 25 denními potkany byl zaznamenán pokles výsledných časů jak u nižší, tak u vyšší dávkové skupiny oproti kontrolní skupině (viz obrázek x). Dále se ve skupině s nižším dávkováním podařilo vylézt na hrazdu 3 potkanům z 10. S vyšší dávkou to zvládl pouze jeden.

Doba, po kterou se zvířata udrží na hrazdě, se prodlužuje s věkem. Je to výrazné pro kontroly a 5-mg/kg dávku. Vyšší dávka allopregnanolonu sice nezmění vývojový trend, ale časy jsou výrazně kratší. Signifikance nejsou vyznačeny, protože práce je jednoznačně zaměřena na účinky allopregnanolonu pro srovnání s pregnanolonpyroglutamátem v plánovaném rukopise.



Obrázek 16. Graf znázorňující výsledné časy na hrazdě. Osa X udává 3 věkové skupiny, osa Y značí výsledné časy (s). Šedé sloupce jsou kontrolní skupiny, šrafované sloupce jednotlivé dávky ALLO (viz legenda přímo v grafu).

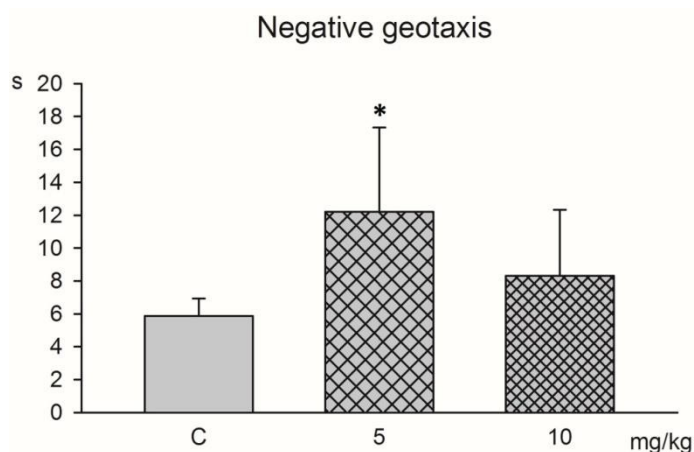
### 6.1.3 *Negative geotaxis test*

Tento test byl proveden pouze u nejmladší zkoumané skupiny, tedy 12 denních potkanů. K značným změnám došlo u obou dávkových skupin.

U 5 mg/kg došlo k signifikantnímu navýšení času otočení o 180° na nakloněné rovině a otočení dokončilo všech 10 potkanů. U dávky 10 mg/kg 3 z 10 nevykazovali



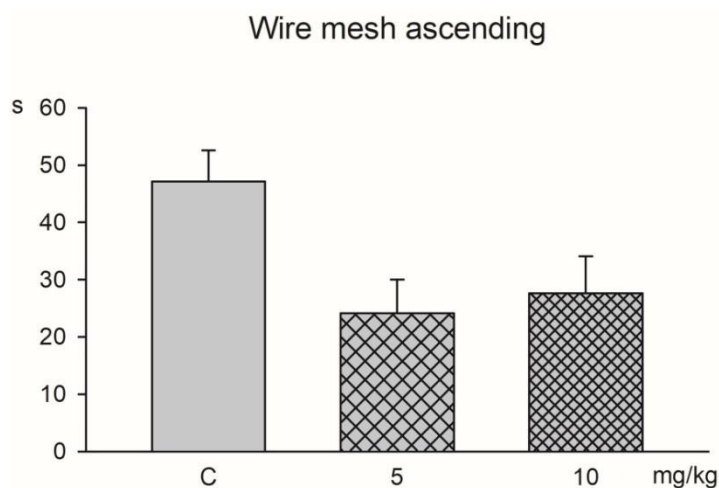
žádnou aktivitu a na nakloněné rovině se stěží udrželi v počáteční poloze a měli tendenci sklouznout dolů. 2 z 10 se otočili pouze o 90°.



Obrázek 17. Sloupcový graf znázorňující výsledky 12 denních potkanů v negativ geotaxis testu. Osa X představuje dávky aplikované látky. „C“ je kontrolní skupina s dávkou 10 mg/kg CDX. Osa Y udává čas (s) otočení o 180°. Hvězdička (\*) – signifikantní změna oproti kontrolní skupině

#### 6.1.4 Wire mesh ascending test

Poslední test, který byl proveden jen u nejmladších 12 denních potkanů, byl šplh na nakloněné mřížce – wire mesh ascending test. V obou dávkových skupinách se zkrátily časy pro vyšplhání nakloněné plošiny oproti kontrolní skupině. Ve skupině s 5 mg/kg ALLO nedokončil test jeden potkan, došplhal pouze do  $\frac{3}{4}$  celkové dráhy. Ve skupině s vyšším dávkováním nedokončili 2 z 10 po uražení pouze pětiny dráhy. U dalších 3 potkanů se neobjevila žádná aktivita a nedošlo ani k počátečnímu zachycení.



Obrázek 18. Graf znázorňující výsledky WMA testu u 12 denní potkanů. Na ose X jsou jednotlivé dávkové skupiny a kontroly (C). Na ose Y výsledné časy testů (s).

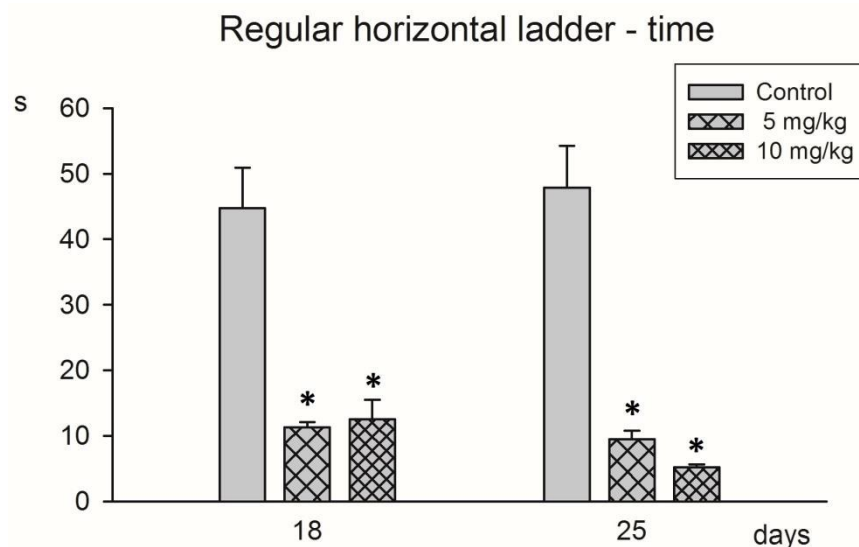
### 6.1.5 Chůze po pravidelném žebříku

Testy na žebřících byly prováděny u 18 a 25 denních potkanů. Mláďe bylo dáno na jeden konec a měřil se čas, za který po příčkách přejde na druhou stranu. Kromě času se zaznamenávaly i chyby, případně dvojchyby v podobě sklouznutí nebo propadnutí končetiny mimo příčky.

U 18 denních potkanů došlo k signifikantnímu zkrácení času dokončení testu v obou dávkovacích skupinách oproti skupině kontrolní. Ve skupině s nižším dávkováním (5mg/kg) 2 z 10 nedokončilo test. Jeden došel do poloviny a druhý pouze do třetiny, otočili se a vrátili na začátek. Ve skupině s vyšším dávkováním (10mg/kg) nedošli na konec 3 z 10 potkanů. První došel do jedné třetiny, druhý pouze do pětiny a třetí prolezl mezi příčkami v jedné třetině trasy.

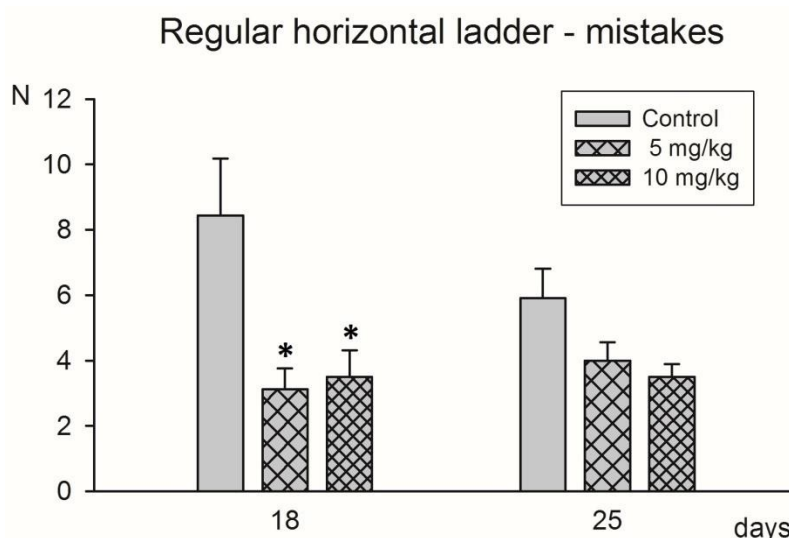
Co se týče počtů chyb (mistakes), je z grafu (obrázek x) patrné, že došlo k signifikantnímu snížení počtu provedených chyb v obou skupinách dávkování oproti kontrolní skupině. U 2 z 10 ze skupiny s 5 mg/kg jsme zaznamenali dvojchybu. Ve skupině s 10 mg/kg jsme naopak u 2 potkanů nezaznamenali jedinou chybu.

U 25 denních potkanů došlo též k signifikantnímu zkrácení času přezení na druhou stranu oproti kontrolní skupině. V porovnání časů skupin jednotlivých dávkovacích skupin, potkani s vyšší dávkou dosahovali o něco kratších časů. Test dokončili všichni jedinci.



Obrázek 19. Graf znázorňující výsledky časů chůze po pravidelném horizontálním žebříku u P18 a P25 mláďat. Šedé sloupce znázorňují kontrolní skupinu s 10 mg/kg CDX, řidší šrafovaní značí skupinu s 5 mg/kg ú.l., hustší šrafovaní skupinu s 10 mg/kg ú.l.. Osa X udává vývojové skupiny a osa Y čas v sekundách, (\*) – signifikantní změna oproti kontrolní skupině.

U nejstarší skupiny (P25) byl počet chyb menší oproti kontrolní skupině, nicméně ne tak výrazný jako u mláďat 18 denních. Nezaznamenali jsme v tomto případě výraznější rozdíl ve výsledcích v rámci množství aplikované látky.



Obrázek 20. Graf znázorňující počet chyb během provedení testu. Osa X udává 2 věkové skupiny (P18, P25), osa Y počet chyb. Šedý sloupec reprezentuje kontrolní skupinu s 10 mg/kg CDX, řídké šrafování skupinu s 5mg/kg ú.l., hustší šrafování s 10 mg/kg. (\*) – signifikantní změny.

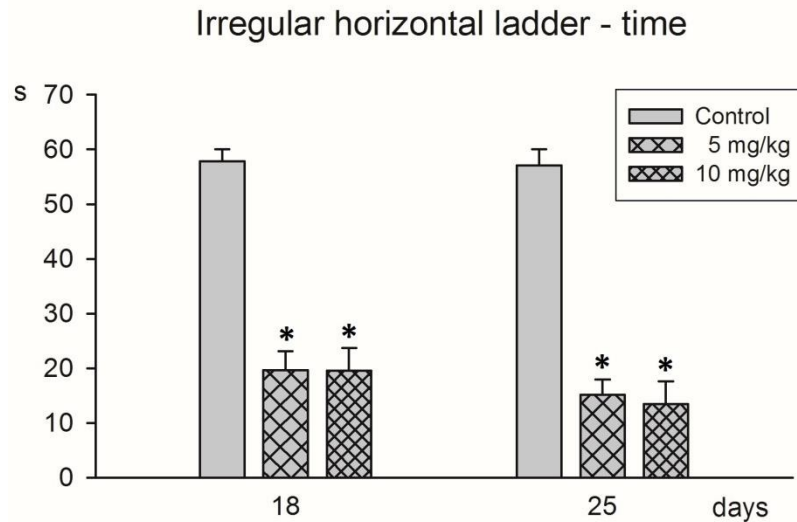
### 6.1.6 Chůze po nepravidelném žebříku

Tento test je metodicky shodný jako chůze po pravidelném žebříku až na to, že jsou jednotlivé příčky od sebe vzdáleny náhodně. Vyhodnocován byl opět jak čas, za který přešel potkan na druhou stranu, tak počet chyb, které během testu udělal.

Z výsledků vyplývá, že u 18 denních potkanů došlo k signifikantnímu zkrácení času chůze na druhý konec jak u nižší, tak u vyšší dávkové skupiny oproti skupině kontrolní. Co se týče nedokončeného testu, tak ve skupině s 5 mg/kg ALLO 4 z 10 potkanů nedošlo na druhý konec (2 se vrátili z 1/3, 1 z poloviční vzdálenosti, 1 z 3/4). Ve skupině s vyššími dávkami (10 mg/kg) nedokončilo test 5 z 10 potkanů (3 urazili pouze buď 50%, 75% nebo 20%).

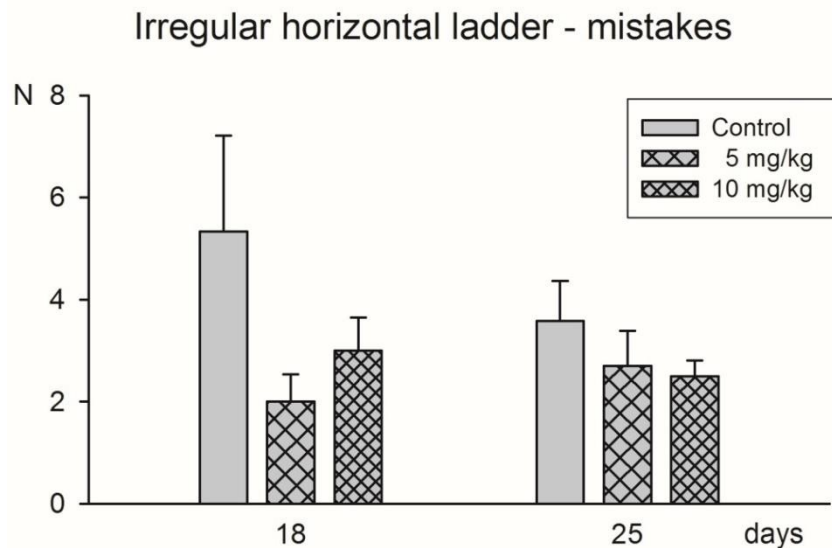
Počet chyb se u obou dávkových skupin (P18) oproti kontrolní snížil, s tím že u 5 mg/kg ALLO došlo k výraznějšímu poklesu počtu chyb oproti skupině s 10 mg/kg ALLO.

U 25 denních potkanů též došlo k výraznému poklesu časů dokončení testů u obou dávkových skupin oproti kontrolní skupině. V tomto věku dokončilo test úspěšně všech 10 potkanů.



Obrázek 21. Graf znázorňující výsledky chůze po nepravidelném žebříku. Osa X značí 2 věkové skupiny (P18, P25), osa Y čas v sekundách. Šedý sloupec je kontrolní skupina s 10mg/kg CDX, sloupec s řidším šrafováním značí skupinu s 5 mg/kg ALLO, sloupec s hustším šrafováním skupinu s 10 mg/kg ALLO. (\*) – signifikantní změna oproti kontrolní skupině.

Počet chyb se v případě nižšího i vyššího dávkování u nejstarší skupiny (P25) snížil oproti kontrolní skupině, s tím že v tomto případě chybovali mírně více jedinci s dávkováním vyšším (viz následující obrázek).



Obrázek 22. Graf znázorňující počet chyb při chůzi na nepravidelném žebříku. Osa X značí 2 věkové skupiny (18, 25), osa Y počet chyb. Šedý sloupec reprezentuje kontrolní skupinu s 10 mg/kg CDX, řidší šrafování skupinu s 5 mg/kg ALLO, hustší šrafování s 10 mg/kg ALLO.

### 6.1.7 *Open field test*

V tomto testu jsme 20 minut po aplikaci allopregnanolonu hodnotili spontánní motoriku potkanů po dobu 5 minut. Pohyb mláďete byl nahrán pomocí kamery a softwarem dále zpracován. Zaměřili jsme se na ušlou vzdálenost, průměrnou rychlost a chování ve vymezeném prostoru (viz dále).

U 12 denních mláďat došlo po aplikaci ALLO k výraznému útlumu motorického projevu, kdy zůstala nehybně ležet po celou dobu provádění testu v počáteční poloze. U skupiny s nižší dávkou se jednalo o 7 z 10 jedinců. Ve skupině s vyšším dávkováním nespolupracovalo též 7 z 10 potkanů. Hodnoty v následujícím textu se týkají pouze těch s motorickým projevem.

12 denní mláďata po aplikaci ALLO ušla výrazně větší celkovou vzdálenost v porovnání s kontrolní skupinou s tím, že u skupiny s 5 mg/kg ALLO jsme zaznamenali mírně zvýšené hodnoty oproti skupině s 10 mg/kg ALLO.

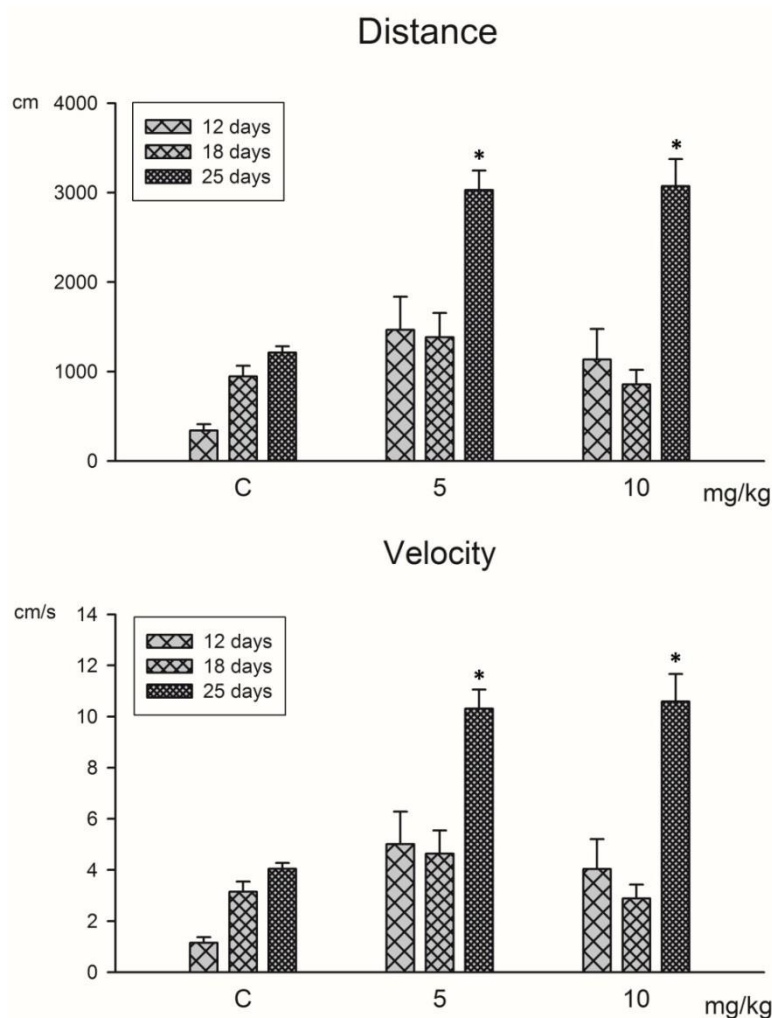
Nejvyšší průměrnou rychlostí též disponovala skupina s dávkou 5 mg/kg. V porovnání s vyšší dávkovací skupinou však nebyl rozdíl tak výrazný, ale obě skupiny se lišily oproti jedincům v kontrolní skupině s CDX, kde byly naměřené rychlosti významně menší.

U 18 denních potkanů ušla největší vzdálenost též skupina s 5 mg/kg ALLO. Nicméně kontrolní skupina v tomto věku vykazovala větší aktivitu než kontrolní skupina u 12 denních. Jedinci s vyšším dávkováním ušli nejmenší vzdálenost.

V průměrné rychlosti je u P18 zachováno stejné pořadí jako u uražené celkové vzdálenosti, nicméně je zde nárůst v kontrolní skupině oproti kontrolám 12 denním (viz následující obrázek).

Největší rozdíly v ušlé vzdálenosti i v porovnání s kontrolními skupinami byly naměřeny u nejstarší zkoumané věkové skupiny (P25). Rozdíly mezi dávkovými skupinami nebyly nikterak výrazné.

Hodnoty průměrné rychlosti v této věkové skupině vykazovaly stejný vzorec jako v případě ušlé vzdálenosti. Oproti kontrolní skupině jsou hodnoty výrazné, porovnání mezi dávkovými skupinami už nikoliv (viz obrázek).



Obrázek 23. Grafy znázorňující spontánní motoriku všech 3 věkových skupin v open field testu. Horní graf se týká ušlé vzdálenosti, dolní graf vypovídá o průměrné rychlosti. Na ose X jsou jednotlivé dávkovací skupiny, „C“ – kontrolní skupina s CDX. Na ose Y je v horním grafu celková vzdálenost, na spodním grafu průměrná rychlost v cm/s. Jednotlivé vzorce šrafování rozdělují věkové skupiny (viz legenda přímo v grafu). (\*) – signifikantní změna oproti kontrolní skupině.

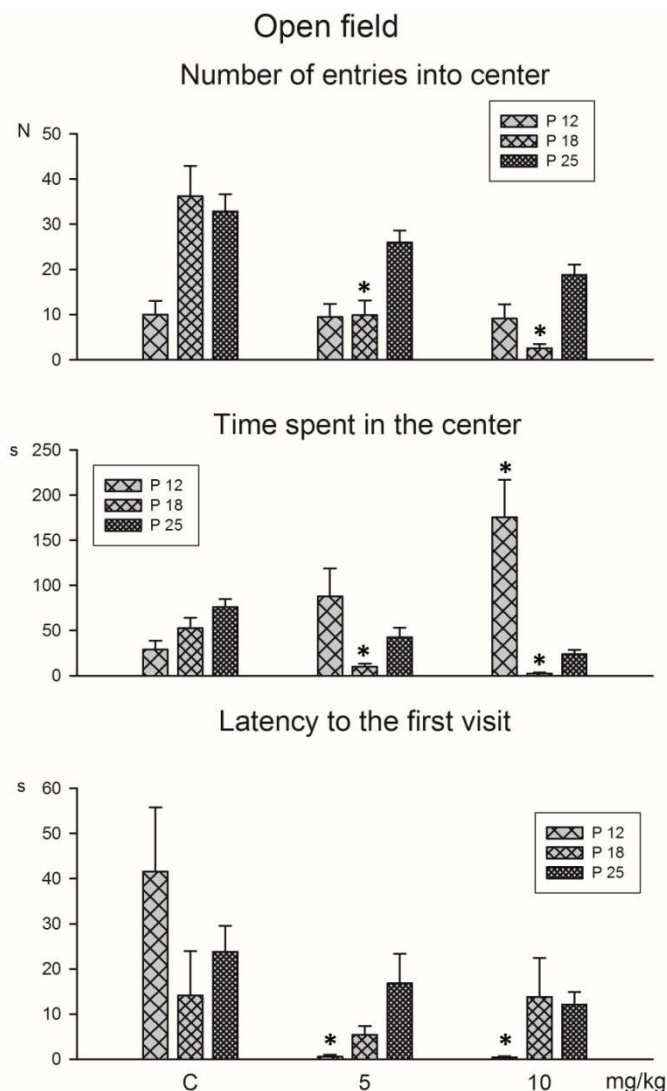
Dále jsme v openfield testu zkoumali kvalitativní chování v podobě vstupu do středu vymezeného testovacího prostoru. Potkani mají tendenci držet se stěn. Pohyb do centra vypovídá o míře anxiety a motivaci prozkoumávání nového prostředí. Hodnotili jsme dobu k prvnímu vstupu do centra, celkový čas setrvávání v tomto místě a kolikrát se do středu testovací plochy vraceli. Tyto parametry byly měřeny softwarem ve stejný moment spolu s celkovou ušlou vzdáleností a průměrnou rychlostí u všech věkových skupin.

U 12 denních potkanů došlo k největšímu útlumu motoriky, jak již bylo uvedeno u hodnot s celkovou vzdáleností a průměrnou rychlostí. Následující hodnoty opět reflektují pouze ty potkany, kteří vykazovali nějaký pohyb.

Co se týče počtů vstupu do centra, dávkování nemělo žádný vliv a hodnoty zůstávají téměř stejné. V obou dávkovacích skupinách došlo k navýšení času stráveného ve středu oproti kontrolní skupině, s tím že u dávky s 10 mg/kg byl nárůst významný.

18 denní mláďata v souvislosti s vyšším věkem vykazovala větší aktivitu během testování. S navyšováním dávky se počet vstupů a čas strávený v centru snižoval oproti kontrolní skupině, u skupiny s vyšším dávkováním signifikantně. Čas k prvnímu vstupu do středu pole byl u 10 mg/kg skupiny srovnatelný s kontrolní skupinou, došlo k mírnému zkrácení časů u 5 mg/kg skupiny.

25 denní mláďata vykazovala stejný vzorec zkracování časů ve všech sledovaných parametrech se zvyšující se dávkou (viz následující obrázek).



Obrázek 24. Grafy znázorňující chování potkanů v openfieldu. Horní graf znázorňuje počet vstupů do centra, střední udává čas strávený v centru a spodní graf ukazuje čas do prvního vstupu do středu. Na ose X jsou jednotlivé dávkové skupiny a skupina kontrolní (C). Osa Y v případě grafu s počty vstupů udává počet (N), ve zbylých grafech celkový čas (s). Hustota šrafování reprezentuje jednotlivé věkové skupiny (viz legenda přímo v grafu). (\*) – signifikantní změna oproti kontrolní skupině.

## 6.2 Výsledky hypotéz

Hodnocení hypotéz programem SigmaStat®(SYSTAT):

### Hypotéza 1

$H_0$ : byla zamítnuta, tj. motorika se v průběhu vývoje signifikantně mění.

### Hypotéza 2

$H_0$ : byla zamítnuta, tj. motorika se po podání allopregnanolonu mění alespoň v jednom motorickém testu.

### Hypotéza 3

$H_0$ : byla zamítnuta, tj. motorika se mění v závislosti na dávkování použité testovací látky alespoň v jednom motorickém testu.



## 7 DISKUZE

Při zpracovávání této diplomové práce mě překvapila aktuálnost daného tématu a množství článků, které vzniklo na toto téma v nedávné době. Mezi známé funkce neurosteroidů patří modulace neurální plasticity, ovlivňování procesů učení, zlepšení paměti, ovlivnění poporodních depresí a menší náchylnost k epileptickým záchvatům. Dále hrají roli při ovlivňování úzkosti, stresu a depresi nebo v sexuálně dimorfním chování a emočních reakcí, při kterých se mění hladiny jednotlivých sledovaných steroidů. Tím se nabízí využití NS a analogů při léčbě velkého množství pacientů napříč nemocemi mnoha systémů.

Důležité je brát zřetel na rozdíl mezi neurosteroidy a neuroaktivními steroidy. Tyto pojmy bývají zaměňovány a je mezi nimi velký významový rozdíl. Cílem mnoha studií je najít právě ty vhodné molekuly, které se chovají jako endogenní steroidy mající vliv na centrální nervový systém, ale disponují menším výskytem nežádoucích účinků.

Zajímavostí je, že právě v březnu tohoto roku (2022) byl v USA schválen Ganaxolon (pod obchodním názvem Ztalmy), jako medikace při záchvatech u pacientů s vzácným onemocněním „CDKL5-vázaná epileptická encefalopatie“ neboli „atypický Rettův syndrom“. Jedná se genetickou poruchu způsobenou patogenní variantou na genu CDKL5. Jedná se o analog allopregnanolonu. Tento neuroaktivní steroidy svojí podobností k endogennímu neurosteroidu právě moduluje GABA-A receptory. Má vliv jak na synaptické, tak extrasynaptické GABA-A receptory a normalizuje příliš excitované neurony.

Práce Terezy Košťálové (2020) zkoumala účinky nově objeveného neuroaktivního steroidu pregnanolonpyroglutamátu (PPG) syntetizovaného v Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České, který se jeví jako vhodný kandidát pro léčbu dětských epilepsií a je momentálně zadán pro klinické testování.

Tato práce měla za úkol porovnat účinky allopregnanolonu a PPG na motoriku mláďat laboratorního potkana, aby se potvrdila její vhodnost pro budoucí klinické využití. Výsledky motorických testů s PPG naznačují, že došlo k mírnému krátkodobému ovlivnění motorického chování, ale v případě dlouhodobého podávání této látky nebyl zjištěn nežádoucí vliv na vývoj motoriky. Výsledky s allopregnanolonem pro dlouhodobé účinky je třeba doplnit v dalších studiích, nicméně

akutní účinky podtrhují vhodnost PPG pro další studování, neboť v mnoha testech s ALLO došlo k výraznějšímu útlumu motoriky.

Zajímavými výsledky jsou celkové časy na horizontálních žebřících, kdy došlo u obou dávkových skupin ke snížení výsledného času chůze i počtu chyb oproti kontrolní skupině. Stejný fenomén, ale ne s takovým rozdílem, se objevil při testování chůze na pravidelném žebříku u 25 denních mláďat po aplikaci PPG. I zde měly kontrolní skupiny delší časy a menší počet jedinců, který test nedokončili. Vysvětlujeme si to vlivem PPG i ALLO na motivaci a úzkost mláďat při testování.

Další zajímavost se objevila při druhém testování stejné věkové skupiny, konkrétně u 18 denních mláďat. V den pokusů se testovaná mláďata rozdělí na poloviny podle množství aplikované dávky, v našem případě na 5 mg/kg a 10 mg/kg allopregnanolonu. Tudíž celkové výsledky měřené stejné věkové skupiny se stejným dávkováním pochází z dvou testovacích dnů. U 18 denních mláďat s vyšší dávkou testované látky došlo při druhém měření k výrazně většímu počtu nedokončených testů. Mláďata měli větší tendenci se vracet na začátek, než když jsem stejnou věkovou skupinu se stejným dávkováním měřil týden předtím. Jak již bylo zmíněno výše, v tomto testu se jak u ALLO tak u PPG nejspíše projevil vliv látek na anxieta a motivaci. Vysvětlujeme si rozdíl tím, že zvířata byla klidnější z důvodu zkušenější manipulace mezi testy. Obecně se ví, že potkani vnímají míru stresu lidí a chovají se rozdílně, s jakou jistotou je s nimi manipulováno.

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit akutní účinky allopregnanolonu na motoriku mláďat ve vybraných motorických testech a porovnat výsledky s akutními účinky PPG.

U surface righting testu došlo k výraznému útlumu, zvláště u 12 denních mláďat s vyšším dávkováním. V této skupině s vyšším dávkováním dokončilo otočení pouze 2 z 10 potkanů. Při testech s PPG dokončili všechna mláďata.

Jak u PPG, tak u ALLO docházelo s věkem k navyšování doby, po kterou se zvířata udrží na hrazdě. Oproti testování PPG, kdy se neprojevíly významné změny oproti kontrolním skupinám, tak u aplikace vyšší dávky ALLO u 18 denních a 25 denních mláďat vedlo ke zkrácení doby visu na hrazdě oproti kontrolní skupině.

Test negative geotaxis provedený pouze u 12 denních potkanů prokázal vliv jak PPG, tak ALLO na dobu otočení mláďete. V případě PPG narůstala doba s množstvím aplikované látky. V testování ALLO došlo k nejvýraznějším změnám v menší dávkové skupině. Ve vyšší dávkové skupině nedokončilo otočení o 1 zvíře více než v testech PPG.

Z grafu wire mesh ascendign testu vyplývá, že došlo k snížení doby vylezení na plošinu u obou dávkových skupin. Při testování PPG došlo k poklesu doby jen u skupiny s 5 mg/kg.

Chůze po pravidelném i nepravidelném žebříku prokázala u všech testovaných věkových skupin a obou dávkových skupin významné snížení času a snížení chybovosti. V porovnání s testy PPG došlo k výraznějšímu ovlivnění výsledných časů.

Openfield byl proveden u všech věkových skupin. Největší ovlivnění motoriky jsme zaznamenali u 12 denních potkanů. U obou dávkových skupin 7 z 10 potkanů zůstalo ležet a nevykazovalo žádnou aktivitu. Oproti testování PPG je to nejvíce signifikantní rozdíl.

18 denní potkani nevykazovali významné změny, u 10 mg/kg došlo k mírnému snížení celkové vzdálenosti.

25 denní potkani oproti kontrolám vykazovali větší průměrné rychlosti i uražené celkové vzdálenosti.

PPG měl tendenci s vyšší dávkou snižovat výslednou motoriku u 12 a 18 denních potkanů a to jak v ušlé vzdálenosti, tak průměrné rychlosti. Při testech s ALLO se tento fenomén nevyskytoval. U 12 denních došlo u obou dávkových skupin

k navýšení celkové ušlé vzdálenosti i průměrné rychlosti (více v případě 5 mg/kg). U 18 denních nedošlo k výraznějším rozdílům jako v případě aplikace PPG.

Jako poslední parametry jsme zkoumali celkové chování v openfieldu. Konkrétně jsme měřili počet vstupů do centra, doba setrvání ve středu a kolikrát se tam mládě potkana za celkový čas (5 minut) vydalo.

U 12 ti denních potkanů, která byla aktivní, se naměřili výrazně nižší časy do prvního vstupu do středu u obou dávkových skupin. Čas setrvání ve středu se navyšováním dávky zvyšoval a počet návratů byl u všech testovaných skupin oproti kontrolám beze změn.

18 denní mláďata se čas do prvního vstupu zkrátil jen u nižší dávky oproti kontrole. S postupným navyšováním dávkování se zkrátil celkový čas ve středu a počet vstupů do centra se u 10 mg/kg výrazně snížil oproti kontrolní skupině.

25 denní mláďata vykazovali sestupný trend s navyšováním dávkování oproti kontrole ve všech sledovaných parametrech

K největším rozdílům oproti testování PPG došlo u nejmladší testované skupiny a to především v době do prvního vstupu do centra. U 18 denních došlo jak u PPG, tak u ALLO skupin s navyšováním dávky ke snížení počtu vstupů do centra.

U 25 denních vyšlo jak u PPG, tak u ALLO ke snižování času do prvního vstupu do centra s navyšováním dávek. Co se týče počtu vstupů, tak byl vývoj s dávkováním opačný. Dále došlo k výrazným rozdílům v časech strávených v centru. Zatímco s navyšováním dávek PPG se celkový čas prodlužoval, tak u aplikace ALLO jsme toto zaznamenali pouze u 12 denních potkanů. U 18 ti denních a 25 ti denních docházelo ke zkracování výsledného času s postupným navyšováním dávky.

## SEZNAM LITERATURY

ABBOTT, Alison. The Renaissance rat. *Nature* [online]. 2004, 428(6982), 464-466 [cit. 2022-08-01]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/428464a

ADIBI, Mehdi. Whisker-Mediated Touch System in Rodents: From Neuron to Behavior. *Frontiers in Systems Neuroscience* [online]. 2019, 13 [cit. 2022-08-10]. ISSN 1662-5137. Dostupné z: doi:10.3389/fnsys.2019.00040

AKHMETSHINA, D., A. NASRETDINOV, A. ZAKHAROV, G. VALEEVA a R. KHAZIPOV. The Nature of the Sensory Input to the Neonatal Rat Barrel Cortex. *Journal of Neuroscience* [online]. 2016, 36(38), 9922-9932 [cit. 2022-08-03]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.1781-16.2016

AKK, Gustav, John BRACAMONTES a Joe Henry STEINBACH. Pregnenolone sulfate block of GABA A receptors: mechanism and involvement of a residue in the M2 region of the  $\alpha$  subunit. *The Journal of Physiology* [online]. 2001, 532(3), 673-684 [cit. 2022-08-10]. ISSN 0022-3751. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0673e.x

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

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

BLUMBERG, Mark S., Greta SOKOLOFF, Alexandre TIRIAC a Carlos DEL RIO-BERMUDEZ. A valuable and promising method for recording brain activity in behaving newborn rodents. *Developmental Psychobiology* [online]. 2015, 57(4), 506-517 [cit. 2022-08-03]. ISSN 00121630. Dostupné z: doi:10.1002/dev.21305

- BOLLES, Robert C. a Paul J. WOODS. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Animal Behaviour* [online]. 1964, 12(4), 427-441 [cit. 2022-08-03]. ISSN 00033472. Dostupné z: doi:10.1016/0003-3472(64)90062-4
- CAI, HuaLin, Ting CAO, Xiang ZHOU a Jeffrey K. YAO. Neurosteroids in Schizophrenia: Pathogenic and Therapeutic Implications. *Frontiers in Psychiatry* [online]. 2018, 9 [cit. 2022-08-09]. ISSN 1664-0640. Dostupné z: doi:10.3389/fpsy.2018.00073
- CLARAC, François, Laurent VINAY, Jean-René CAZALETS, Jean-Claude FADY a Marc JAMON. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews* [online]. 1998, 28(1-2), 35-43 [cit. 2022-08-02]. ISSN 01650173. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-0173(98)00024-1
- CLAUSE BT. The Wistar Institute Archives: rats (not mice) and history. *Mendel Newsl.* 1998 Feb;(7):2-7. PMID: 11619935.
- COMPAGNONE, Nathalie A. a Synthia H. MELLON. Neurosteroids: Biosynthesis and Function of These Novel Neuromodulators. *Frontiers in Neuroendocrinology* [online]. 2000, 21(1), 1-56 [cit. 2022-08-10]. ISSN 00913022. Dostupné z: doi:10.1006/frne.1999.0188
- DHIR, Ashish a Michael A ROGAWSKI. Role of neurosteroids in the anticonvulsant activity of midazolam. *British Journal of Pharmacology* [online]. 2012, 165(8), 2684-2691 [cit. 2022-08-09]. ISSN 00071188. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01733.x
- DO REGO, Jean Luc, Jae Young SEONG, Delphine BUREL, et al. Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Frontiers in Neuroendocrinology* [online]. 2009, 30(3), 259-301 [cit. 2022-08-09]. ISSN 00913022. Dostupné z: doi:10.1016/j.yfrne.2009.05.006
- DOROTA MAJEWSKA, Maria a Rochelle D. SCHWARTZ. Pregnenolone-sulfate: an endogenous antagonist of the  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor complex in brain?. *Brain*

Research [online]. 1987, 404(1-2), 355-360 [cit. 2022-08-10]. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/0006-8993(87)91394-1

EBNER, Ford F. a Jon H. KAAS. Somatosensory System. In: The Rat Nervous System [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 675-701 [cit. 2022-08-10]. ISBN 9780123742452. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374245-2.00024-3

FEATHER-SCHUSSLER, Danielle N. a Tanya S. FERGUSON, 2016. A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. Journal of Visualized Experiments [online]. (117) [cit. 2022-07-30]. ISSN 1940-087X. Dostupné z: doi:10.3791/53569

FLOOD, J F, J E MORLEY a E ROBERTS. Pregnenolone sulfate enhances post-training memory processes when injected in very low doses into limbic system structures: the amygdala is by far the most sensitive. Proceedings of the National Academy of Sciences [online]. 1995, 92(23), 10806-10810 [cit. 2022-08-12]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.92.23.10806

FRYE, Cheryl A. Neurosteroids' effects and mechanisms for social, cognitive, emotional, and physical functions. Psychoneuroendocrinology [online]. 2009, 34, S143-S161 [cit. 2022-08-08]. ISSN 03064530. Dostupné z: doi:10.1016/j.psyneuen.2009.07.005

GLYKYS, Joseph a Istvan MODY. Activation of GABAA Receptors: Views from Outside the Synaptic Cleft. Neuron [online]. 2007, 56(5), 763-770 [cit. 2022-08-09]. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2007.11.002

GRAMSBERGEN, A. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development? Neuroscience & Biobehavioral Reviews [online]. 1998, 22(4), 547-553 [cit. 2020-04-01]. DOI: 10.1016/S0149-7634(97)00043-2. ISSN 01497634. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763497000432>

HARRISON, N. L. and Simmonds, M. A. (1984) Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Research*, 323: 287– 292.

HAWKES CH, Doty RL (12 February 2009). *The Neurology of Olfaction*. Cambridge University Press. pp. 37–. ISBN 978-0-521-68216-9.

HÉNIN, Jérôme, Reza SALARI, Sruthi MURLIDARAN a Grace BRANNIGAN. A Predicted Binding Site for Cholesterol on the GABAA Receptor. *Biophysical Journal* [online]. 2014, 106(9), 1938-1949 [cit. 2022-08-08]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2014.03.024

HORAK, M., K. VLCEK, H. CHODOUNSKA a L. VYKLYCKY. Subtype-dependence of N-methyl-d-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience* [online]. 2006, 137(1), 93-102 [cit. 2022-08-10]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.058

HOSIE, Alastair M., Megan E. WILKINS a Trevor G. SMART. Neurosteroid binding sites on GABAA receptors. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2007, 116(1), 7-19 [cit. 2022-08-09]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2007.03.011

CHVOJKOVÁ, Markéta. Vliv neuroaktivních steroidů inhibujících NMDA receptory na chování. Praha, 2013. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie. Vedoucí práce Valeš, Karel.

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

KHAZIPOV, Rustem, Anton SIROTA, Xavier LEINEKUGEL, Gregory L. HOLMES, Yehezkel BEN-ARI a György BUZSÁKI. Early motor activity drives spindle bursts in the developing somatosensory cortex. *Nature* [online]. 2004, 432(7018), 758-761 [cit. 2022-08-03]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature03132



KOŠŤÁLOVÁ, Tereza. Účinky neuroaktivního steroidu na motoriku mláďat laboratorního potkana. Praha, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství. Vedoucí práce Mareš, Pavel.

KRAUSOVÁ, Barbora. Modulace chemicky aktivovaných iontových kanálů neurosteroidy. 2010. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra fyziologie. Vedoucí práce Vyklický, Ladislav.

LAMBERT, Jeremy J., Delia BELELLI, Dianne R. PEDEN, Audrey W. VARDY a John A. PETERS. Neurosteroid modulation of GABAA receptors. *Progress in Neurobiology* [online]. 2003, 71(1), 67-80 [cit. 2022-08-09]. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/j.pneurobio.2003.09.001

MAREŠ, P., A. MIKULECKÁ, R. HAUGVICOVÁ a A. KASAL. Anticonvulsant action of allopregnanolone in immature rats. *Epilepsy Research* [online]. 2006, 70(2-3), 110-117 [cit. 2022-08-12]. ISSN 09201211. Dostupné z: doi:10.1016/j.eplepsyres.2006.03.009

MAURICE, T, T.-P SU a A PRIVAT. Sigma1 ( $\sigma$ 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate  $\beta$ 25–35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism. *Neuroscience* [online]. 1998, 83(2), 413-428 [cit. 2022-08-12]. ISSN 03064522. Dostupné z: doi:10.1016/S0306-4522(97)00405-3

MAYO, Willy, Françoise DELLU, Paul ROBEL, Jennate CHERKAOUI, Michel LE MOAL, Etienne-Emile BAULIEU a Hervé SIMON. Infusion of neurosteroids into the nucleus basalis magnocellularis affects cognitive processes in the rat. *Brain Research* [online]. 1993, 607(1-2), 324-328 [cit. 2022-08-12]. ISSN 00068993. Dostupné z: doi:10.1016/0006-8993(93)91524-V

MENSAH-NYAGAN et al., 1999 A.G. Mensah-Nyagan, J.L. Do-Rego, D. Beaujean, V. Luu-The, G. Pelletier, H. Vaudry. Neuroactive steroids: Expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system

MINLEBAEV, Marat, Yehezkel BEN-ARI a Rustem KHAZIPOV. Network Mechanisms of Spindle-Burst Oscillations in the Neonatal Rat Barrel Cortex In Vivo. *Journal of Neurophysiology* [online]. 2007, 97(1), 692-700 [cit. 2022-08-03]. ISSN 0022-3077. Dostupné z: doi:10.1152/jn.00759.2006

PATTE-MENSAH, C., L. MEYER, O. TALEB a A.G. MENSAH-NYAGAN. Potential role of allopregnanolone for a safe and effective therapy of neuropathic pain. *Progress in Neurobiology* [online]. 2014, 113, 70-78 [cit. 2022-08-08]. ISSN 03010082. Dostupné z: doi:10.1016/j.pneurobio.2013.07.004  
*Pharmacological Reviews*, 51 (1999), pp. 63-81

PIECHAL, Agnieszka, Alicja JAKIMIUK a Dagmara MIROWSKA-GUZEL. Sigma receptors and neurological disorders. *Pharmacological Reports* [online]. 2021, 73(6), 1582-1594 [cit. 2022-08-10]. ISSN 1734-1140. Dostupné z: doi:10.1007/s43440-021-00310-7

PINNA, Graziano, Erminio COSTA a Alessandro GUIDOTTI. Changes in brain testosterone and allopregnanolone biosynthesis elicit aggressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2005, 102(6), 2135-2140 [cit. 2022-08-08]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0409643102

RAMBOUSEK, Lukas, Vera BUBENIKOVA-VALESOVA, Petr KACER, et al. Cellular and behavioural effects of a new steroidal inhibitor of the N-methyl-d-aspartate receptor  $3\alpha5\beta$ -pregnanolone glutamate. *Neuropharmacology* [online]. 2011, 61(1-2), 61-68 [cit. 2022-08-10]. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2011.02.018

REDDY DS, Rogawski MA. Neurosteroids—endogenous regulators of seizure susceptibility and role in the treatment of epilepsy. *Jasper's Basic Mech Epilepsies*. 2012;9:258-80

REDDY, Doodipala S. a Michael A. ROGAWSKI. Stress-Induced Deoxycorticosterone-Derived Neurosteroids Modulate GABA A Receptor Function and Seizure Susceptibility. *The Journal of Neuroscience* [online]. 2002, 22(9), 3795-3805

[cit. 2022-08-09]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.22-09-03795.2002

REDDY, Doodipala Samba. Neurosteroids. In: Sex Differences in the Human Brain, their Underpinnings and Implications [online]. Elsevier, 2010, 2010, s. 113-137 [cit. 2022-08-09]. Progress in Brain Research. ISBN 9780444536303. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-53630-3.00008-7

RUPPRECHT, Rainer, Gerhard RAMMES, Daniela ESER, et al. Translocator Protein (18 kD) as Target for Anxiolytics Without Benzodiazepine-Like Side Effects. Science [online]. 2009, 325(5939), 490-493 [cit. 2022-08-12]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.1175055

RUPPRECHT, Rainer, Johannes M.H.M. REUL, Thorsten TRAPP, Bas van STEENSEL, Christian WETZEL, Klaus DAMM, Walter ZIEGLGÄNSBERGER a Florian HOLSBOER. Progesterone receptor-mediated effects of neuroactive steroids. Neuron [online]. 1993, 11(3), 523-530 [cit. 2022-08-12]. ISSN 08966273. Dostupné z: doi:10.1016/0896-6273(93)90156-L

SCHUMACHER, Michael, Paul ROBEL a Etienne-Emile BAULIEU. Development and Regeneration of the Nervous System: A Role for Neurosteroids (Paart 1 of 2). Developmental Neuroscience [online]. 2004, 18(1-2), 6-13 [cit. 2022-08-09]. ISSN 0378-5866. Dostupné z: doi:10.1159/000111391

SMIRNOV, Kirill a Evgenia SITNIKOVA. Developmental milestones and behavior of infant rats: The role of sensory input from whiskers. Behavioural Brain Research [online]. 2019, 374 [cit. 2022-08-03]. ISSN 01664328. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbr.2019.112143

SMITH, Sheryl S., Qi Hua GONG, Fu-Chun HSU, Ronald S. MARKOWITZ, J. M. H. FFRENCH-MULLEN a Xinshe LI. GABAA receptor  $\alpha 4$  subunit suppression prevents withdrawal properties of an endogenous steroid. Nature [online]. 1998, 392(6679), 926-929 [cit. 2022-08-12]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/31948

SOBOLEVSKY, Alexander I., Michael P. ROSCONI a Eric GOUAUX. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* [online]. 2009, 462(7274), 745-756 [cit. 2022-08-10]. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature08624

THOMAS, Peter a Yefei PANG. Membrane Progesterone Receptors: Evidence for Neuroprotective, Neurosteroid Signaling and Neuroendocrine Functions in Neuronal Cells. *Neuroendocrinology* [online]. 2012, 96(2), 162-171 [cit. 2022-08-09]. ISSN 0028-3835. Dostupné z: doi:10.1159/000339822

TOLETY, Spandana Bharadwaj, Nivedita MAITY a Anuradha H. V. Neurosteroids: current perspective in therapy of neuropsychiatric disorders. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology* [online]. 2019, 8(5), 1119-1125 [cit. 2022-08-08]. ISSN 2279-0780. Dostupné z: doi:10.18203/2319-2003.ijbcp20191611

TSUTSUI, Kazuyoshi a Shogo HARAGUCHI. Neurosteroids. In: *Handbook of Hormones* [online]. Elsevier, 2016, 2016, 537-e96-12 [cit. 2022-08-10]. ISBN 9780128010280. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801028-0.00096-9

VANDENBERGH JG (1 January 2000). "Use of House Mice in Biomedical Research". *ILAR Journal*. 41 (3): 133–135. doi:10.1093/ilar.41.3.133

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

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

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

Wu et al., 1991, F.S. Wu, T.T. Gibbs, D.H. Farb. Pregnenolone sulfate: A positive allosteric modulator at the N-methyl-d-aspartate receptor *Molecular Pharmacology*, 40 (1991), pp. 333-33

YANG, J.-W., I. L. HANGANU-OPATZ, J.-J. SUN a H. J. LUHMANN. Three Patterns of Oscillatory Activity Differentially Synchronize Developing Neocortical Networks In Vivo. *Journal of Neuroscience* [online]. 2009, 29(28), 9011-9025 [cit. 2022-08-03]. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.5646-08.2009

## SEZNAM PŘÍLOH

Obrázek 1: Schéma syntézy NS v mozku a jejich dopad na mozkové funkce (Do Rego, 2009) .....	11
Obrázek 2: Schéma syntézy NS. U šipek jsou uvedeny klíčové enzymy (Tolety, 2003) .....	11
Obrázek 3: GABA-A receptor .....	13
Obrázek 4: Znázornění rozdílu mezi synaptickým (vlevo) a extrasynaptickým (vpravo) receptorem GABA-A .....	14
Obrázek 5: NMDA receptor .....	16
Obrázek 6: Schéma zrání struktur podílející se na motorice .....	23
Obrázek 7: Schématické porovnání vývoje lokomoce člověka a potkana .....	25
Obrázek 8: Schéma zapojení vousů do barelového kortexu .....	28
Obrázek 9: Schématické znázornění vývoje vestibulárního systému .....	29
Obrázek 10: Openfield test (archiv autora) .....	33
Obrázek 11: Righting test, 5 denní mládě (Feather-Schussler, 2016) .....	34
Obrázek 12: Negative geotaxis test (archiv autora) .....	34
Obrázek 13: Bar holding test (archiv autora) .....	35
Obrázek 14: Wire mesh ascending test (archiv autora) .....	35
Obrázek 15: Chůze po žebříku (archiv autora) .....	36
Obrázek 16: Graf znázorňující výsledné časy na hrazdě .....	39
Obrázek 17: Sloupcový graf znázorňující výsledky 12 denních potkanů v negativ geotaxis testu .....	40
Obrázek 18: Graf znázorňující výsledky WMA testu u 12 denní potkanů. ....	40
Obrázek 19: Graf znázorňující výsledky časů chůze po pravidelném horizontálním žebříku .....	41
Obrázek 20: Graf znázorňující počet chyb během provedení testu .....	42
Obrázek 21: Graf znázorňující výsledky chůze po nepravidelném žebříku .....	43
Obrázek 22: Graf znázorňující počet chyb při chůzi na nepravidelném žebříku .....	43
Obrázek 23: Grafy znázorňující spontánní motoriku všech 3 věkových skupin v open field testu .....	45
Obrázek 24: Grafy znázorňující chování potkanů v openfieldu .....	46
Tabulka 1: Farmakologické vlastnosti a mechanismy účinku základních NS .....	18