

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Bc. Jitka Hanzalová

**Vývoj motoriky laboratorního potkana po
opakovaném podání antagonisty AMPA receptoru**

Diplomová práce

Praha 2018

Autor práce: **Bc. Jitka Hanzalová**

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

Oponent práce: **RNDr. Karel Valeš, Ph.D.**

Datum obhajoby: **2018**

Bibliografický záznam

HANZALOVÁ, Jitka. Vývoj motoriky laboratorního potkana po opakovaném podání antagonisty AMPA receptoru. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství, 2018. 79 s. Vedoucí diplomové prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Abstrakt

Látka IEM 1460 je antagonistou AMPA receptorů v mozku. Jde o derivát adamantinu, jenž byl již v několika studiích testován jako potenciální věkově vázané antikonvulzivum. V rešeršní části práce jsou shrnuty poznatky o receptorech, se zaměřením na receptory typu AMPA, látky IEM 1460, epilepsii a ontogenetickém vývoji laboratorního potkana. Výzkumná část se věnuje hodnocení účinků látky IEM 1460 na hrubou motoriku potkana v několika postnatálních dnech života. Pro hodnocení spontánní motoriky zvířete bylo využito sledování v Open fieldu, pro hodnocení provokované motoriky bylo použito několik specifických testů. Do výzkumu bylo zařazeno celkem 30 zvířat. Látky (IEM 1460 v dávce 3 mg/kg, IEM 1460 v dávce 10 mg/kg nebo fyziologický roztok v objemu 2 ml/kg) byly mláďatům podávány intraperitoneálně v pěti po sobě následujících dnech (ve věku P7 – P11) a zvířata byla opakovaně testována ve věku 12, 15, 18, 21, 25, 31 a 60 dní. V tomto výzkumu nebyl prokázán významný vliv látky IEM 1460 na hrubou motoriku laboratorního potkana a látka tedy zůstává vážným kandidátem na věkově specifické antiepileptikum.

Klíčová slova

AMPA receptory, GluA2 podjednotka, IEM 1460, epilepsie, laboratorní potkan, motorický vývoj

Bibliographic identification

HANZALOVÁ, Jitka. Motor development after repeated dosing of AMPA receptors antagonist in laboratory rats. Prague: Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Department of rehabilitation and sports medicine, 2018. 79 p. Supervisor prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Abstract

Substance IEM 1460 is an antagonist of AMPA receptors in the brain. It is a derivative of adamantane, which has already been tested in several studies as a potential age-related anticonvulsant. In the research part of the thesis there is a summary of the knowledge about receptors, focusing on AMPA receptors, IEM 1460, epilepsy and ontogenetic development of laboratory rat. The research section evaluates the effect of IEM 1460 on motor skills of a rat in a few postnatal days of its life. To evaluate spontaneous animal motor skills, Open-Field tracking was used, and several specific tests were used to evaluate provoked motor skills. A total of 30 animals were included in the research. Substances (IEM 1460 at 3 mg / kg, IEM 1460 at 10 mg / kg or 2 ml / kg saline) were infused intraperitoneally on five consecutive days (ages P7-P11) and the animals were repeatedly tested at age 12, 15, 18, 21, 25, 31 and 60 days. In this study, IEM 1460 has not been shown to have significant effect on the gross rat motor skills and therefore the substance remains as a serious candidate for age-specific antiepileptic drugs.

Keywords

AMPA receptors, GluA2 subunit, IEM 1460, epilepsy, laboratory rat, motor development

Prohlášení

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

V Praze

Poděkování

Zvláštní poděkování patří panu prof. MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za jeho cenné rady a připomínky při vedení mé diplomové práce a rovněž za jeho pomoc při statistickém zpracování dat. Dále bych ráda poděkovala paní RNDr. Anně Mikulecké, Ph.D. za její pomoc při práci s programem EthoVision®. Poděkování patří také mým nejbližším za podporu během celého studia.

OBSAH

ÚVOD	9
1 PŘEHLED POZNATKŮ.....	11
1.1 RECEPTORY.....	11
1.1.1 Přenos signálu	11
1.1.2 Glutamát.....	12
1.1.3 Receptory pro glutamát	13
1.1.4 AMPA receptory	15
1.1.4.1 Propustnost AMPA receptory ovládaných kanálů.....	17
1.1.4.2 Vývojové změny v expresi podjednotek AMPA receptorů	18
1.1.4.3 Struktura AMPA receptoru	19
1.1.4.4 AMPA receptor a epileptický záchvat	20
1.2 FARMAKOLOGICKÉ OVLIVNĚNÍ AMPA RECEPTORU.....	21
1.2.1 Látka IEM 1460	22
1.3 EPILEPSIE.....	23
1.3.1 Vznik záchvatu	24
1.3.2 Druhy epileptických záchvatů	25
1.3.2.1 Parciální záchvaty (fokální)	25
1.3.2.2 Primárně generalizované záchvaty.....	27
1.3.3 Léčba epilepsie.....	28
1.4 LABORATORNÍ POTKAN.....	29
1.4.1 Ontogenetický vývoj potkana.....	29
1.4.1.1 Motorický vývoj.....	30
1.4.1.2 Vývoj sensorických systémů	33
1.4.1.3 Vývoj nervového systému.....	34
1.4.1.4 Pohlavní vývoj	35
1.4.2 Behaviorální studie.....	36
2 CÍLE A HYPOTÉZY	37
3 METODIKA.....	38
3.1 METODIKA VÝZKUMNÉ ČÁSTI PRÁCE	38
3.1.1 Testování	38
3.1.1.1 Open field (OF).....	39
3.1.1.2 Righting test	40
3.1.1.3 Negativní geotaxe	40
3.1.1.4 Bar holding test	40
3.1.1.5 Svislý žebřík.....	41
3.1.1.6 Horizontální žebřík	41
3.1.1.7 Chůze na rotarodu	42
3.1.2 Statistické zpracování dat.....	42
4 VÝSLEDKY.....	43
4.1 OPEN FIELD TEST.....	43
4.1.1 Průměrná rychlost pohybu	43
4.1.2 Uběhnutá vzdálenost	45
4.1.3 Počet návštěv středu Open fieldu	47
4.1.4 Čas strávený ve středu Open fieldu.....	49

4.2	RIGHTING REFLEX	52
4.3	NEGATIVNÍ GEOTAXE	52
4.4	HORIZONTÁLNÍ HRAZDA	53
4.5	SVISLÝ ŽEBŘÍK.....	56
4.6	PRAVIDELNÝ HORIZONTÁLNÍ ŽEBŘÍK	58
4.7	NEPRAVIDELNÝ HORIZONTÁLNÍ ŽEBŘÍK.....	61
4.8	CHŮZE NA ROTARODU	65
5	DISKUZE	67
6	ZÁVĚR.....	72
7	SEZNAM ZKRATEK.....	73
8	SEZNAM LITERATURY	74

ÚVOD

Epilepsie je neurologické onemocnění postihující děti i dospělé. Jedná se o soubor různorodých syndromů, jejichž společným rysem jsou opakující se záchvaty. (Rokyta, 2015) Dle Amblera jde z klinického hlediska o intermitentní, paroxysmální a stereotypní poruchu vědomí, chování nebo motorických či senzitivních funkcí. (Ambler, 2011) Ovšem je nutné si uvědomit, že výskyt záchvatů není jediným projevem této nemoci. Epilepsie je rovněž charakteristická výskytem nejrůznějších přidružených obtíží, jako například deprese, poruchy pozornosti, migrenózní bolesti hlavy aj. Tyto komorbidity mají také negativní vliv na život pacienta a je důležité na ně během práce s pacientem, ať už jako lékař či fyzioterapeut, nezapomínat. (Browne a Holmes, 2008)

Přestože faktory jako věk, pohlaví či národnost mohou mít vliv na vznik a rozvoj této nemoci, jedná se ve většině případů o tzv. epilepsii idiopatickou, tedy bez konkrétní zjevné příčiny. (Browne a Holmes, 2008; Nevšimalová, 2002) Dle metaanalýzy z roku 2016, do které bylo zařazeno celkem 222 studií, je prevalence tohoto onemocnění celosvětově 0,76 %. (Fiest et al., 2017) Ve vyspělých zemích je každoročně 50 nově zachycených případů epilepsie na 100 000 obyvatel. V rozvojových zemích je incidence až dvojnásobná a je vyšší procento pacientů v dětském věku. Ve vyspělých zemích lze díky kvalitní perinatální péči sledovat pokles výskytu epilepsie u dětí a převaze přítomnosti tohoto onemocnění u seniorů, což souvisí s dosažením vyššího věku a přežíváním mozkových infarktů. (Komárek et al., 2005)

Nezralý mozek je ke generování epileptických záchvatů více náchylný než mozek dospělý. Příčinou je jednak dosud plně nevyzrálý inhibiční systém a zároveň zvýšený excitační glutamatergní přenos. Za většinu rychlé depolarizace jsou zodpovědné glutamátové ionotropní receptory typu AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazol propionová kyselina). Tato rychlá signalizace je pro člověka důležitá, avšak prolongovaná aktivace AMPA receptorů má výrazně toxický vliv na neurony a je klíčová pro tvorbu a šíření záchvatovité aktivity. AMPA receptory jsou složeny ze čtyř podjednotek označovaných jako GluA1, GluA2, GluA3 a GluA4. Zajímavá je především podjednotka GluA2, která je schopna regulovat propustnost AMPA receptorů pro Ca^{2+} ionty. Většina AMPA receptorů ve vyvíjejících se neuronech je pro Ca^{2+} propustných (GluA2 podjednotka chybí a/nebo je přítomna needitovaná GluA2 podjednotka, která je pro Ca^{2+} rovněž propustná). (Bowie, 2008; Kew, Kemp, 2005; Szczurowska a Mareš, 2015) Ve většině zralých neuronů je naopak převaha

podjednotky GluA2 v editovaném stavu, díky níž dochází ke tvorbě kanálů pro Ca^{2+} nepropustných. (Hsu a kol., 2010; Szczurowska a Mareš, 2015)

V léčbě epilepsie se využívá řada antikonvulziv, či jejich kombinace, dle typu epilepsie a individuální odpovědi pacienta na látku. Přesto, že se v klinické praxi využívají již i antiepileptika třetí generace, není přibližně u 20 % pacientů farmakoterapie úspěšná. Navíc má většina léčiv celou řadu nežádoucích účinků. Tato fakta vedou k dalšímu výzkumu nových látek. (Singer, Zawada, 2013; Shorvon et al., 2016) Protože nově nalezené léky by mohly minimalizovat omezení dané nemocí a tím umožnit pacientům s epilepsií prožít kvalitnější život, rozhodla jsem se aktivně zapojit do preklinického výzkumu, jehož náplní je hodnocení vlivu látky IEM 1460, která cílí právě na ionotropní AMPA receptory a je potenciálním věkově specifickým antikonvulzivem. V této práci se zaměřuji na možné negativní ovlivnění hrubé motoriky výše zmíněnou látkou a věřím, že má práce bude přínosem pro eventuální další výzkum látky IEM 1460.

1 PŘEHLED POZNATKŮ

1.1 Receptory

Receptor je látka bílkovinné povahy, na kterou se váží neurotransmitery, hormony a ostatní látky, obecně ligandy. Po navázání specifické látky dojde ke změně propustnosti buněčné membrány nebo k aktivaci intracelulární odezvy. Celý receptorový komplex je složen z tzv. rozpoznávacího místa, kde dochází k navázání látky, efektorové složky, která zabezpečuje odezvu a transdukční složky, jež vede informaci mezi výše zmíněnou rozpoznávací a efektorovou částí. Receptory se dělí na receptory spojené s iontovými kanály (ionotropní) a na receptory spřažené s G proteinem (metabotropní). V této diplomové práci se budu zabývat zejména AMPA receptory, jež patří mezi receptory ionotropní. Ionotropní receptory jsou receptory, jež po připojení signální molekuly ze zevního prostředí přímo ovlivňují některý z iontových kanálů. Dojde k otevření nebo naopak uzavření iontového kanálů pro specifické ionty, které se pohybují po svém elektrochemickém gradientu, což vede ke změně membránového potenciálu. Ionotropní receptory se vyskytují v povrchové membráně buněk, ale rovněž v cytoplazmě, jádře a v membránách buněčných organel. (Ganong, 2005; Rokyta, 2015)

„Membránové kanály jsou integrální bílkoviny, které jednou nebo vícekrát procházejí fosfolipidovou dvojvrstvou membrány a umožňují přestup hydrofilních látek (např. iontů nebo vody). Iontové kanály jsou tvořeny speciálními integrálními membránovými proteiny, které jsou schopny propouštět mezi zevním a vnitřním prostředím buněk určité ionty (jsou selektivně permeabilní, což je dáno rozměrem průchodu pro ionty nebo náboji vnitřního povrchu – iontové pasti). Vlastní přenos probíhá formou usnadněné difuze a přímo nespotebovává energii.“ (Rokyta, 2015, str. 20)

Extracelulární prostředí představuje pro buňku stálý zdroj specifických molekul, které mohou aktivovat povrchové receptory. Jestliže dojde ke zvýšení nebo snížení množství těchto signálů, následnou odpovědí buňky je snížení či zvýšení počtu receptorů, což vede ke zvýšení (senzitivizaci) nebo snížení (desenzitivizaci) množství aktivovaných receptorů na předpokládanou úroveň. Tento mechanismus slouží k udržení stálosti signálu. (Rokyta, 2015)

1.1.1 Přenos signálu

Informace neboli nervové vzruchy, se předávají mezi jednotlivými neurony prostřednictvím synapsí. Tento pojem značí místo vzájemného dotyku dvou sousedních neuronů. Synapse se skládá ze tří částí – části presynaptické, synaptické štěrbině a části postsynaptické. Díky specifickým

receptorům pro specifické mediátory, jež se vytváří v presynaptické části nervových buněk, se signál přeneše do buňky a ovlivní její aktivitu. Existují rovněž elektrické synapse, avšak ty mají v lidském organismu minoritní zastoupení. Rozeznáváme tři druhy synaptických váček vyskytujících se v presynaptické části a obsahujících různé neurotransmitery – malé světlé váčky obsahující acetylcholin, glycin, kyselinu gama-aminomáselnou (GABA) a glutamát, malé váčky s denzním povrchem obsahující katecholaminy a váčky s denzním povrchem, které obsahují neuropeptidy. Pro splynutí synaptických váček s membránou a následné uvolnění jejich obsahu je důležitý Ca^{2+} . Akční potenciál (AP) dosáhne presynaptické části, otevře kanály pro Ca^{2+} a dojde k uvolnění neurotransmiteru. Obsah váček je tedy exocytózou uvolněn do synaptické štěrbině, mediátor se naváže na receptor postsynaptické membrány, čímž se v ní otevírají iontové kanály a dochází ke vzniku postsynaptických potenciálů. V organismu vznikají dva hlavní typy postsynaptických potenciálů – excitační postsynaptický potenciál (EPSP), jež je způsobený excitačními mediátory a inhibiční postsynaptický potenciál (IPSP), způsobený mediátory inhibičními. Při EPSP se otevírají Na^+ (Ca^{2+}) kanály na postsynaptické membráně, ionty vstupují do buňky a dochází k depolarizaci. Při IPSP se otevírají K^+ a Cl^- kanály, kladné ionty vystupují ven z buňky a záporné naopak do buňky vstupují. Tím je membrána hyperpolarizována a dochází ke snížení excitability neuronu. (Ganong, 2005; Kittnar, 2011; Rokyta, 2015) Po aktivaci iontové kanály podlehnou spontánní desenzitizaci a uzavření navzdory stálé přítomnosti agonisty. (Madden, 2002)

1.1.2 Glutamát

Glutamát neboli kyselina L-glutamová je glukogenní neesenciální aminokyselina, jež se v organismu uplatňuje u mnoha reakcí. Pro potřeby této diplomové práce je zejména významný fakt, že se jedná o hlavní excitační neurotransmitter centrální nervové soustavy (CNS). Jde o neurotransmitter, který aktivuje oba typy glutamátových receptorů – ionotropní i metabotropní. Tyto specifické receptory se nacházejí zejména na membráně postsynaptického neuronu a jejich aktivací dojde k excitačnímu synaptickému přenosu. Dle Ganonga je glutamát zodpovědný až za 75 % veškerého excitačního přenosu v mozku. Předpokládá se, že aktivace těchto receptorů má vliv na proces učení a paměť. Avšak při přílišné aktivaci glutamátových receptorů dochází k excitotoxické smrti neuronů a k možnému rozvoji neurodegenerativních chorob. Je znám zejména vliv zvýšeného množství glutamátu v ischemizované tkáni mozku. Na druhou stranu lze zmíněného excitotoxického působení někdy cíleně využít, a to při potřebě zničit těla nervových buněk bez poškození sousedních axonů v určité lokalitě. Toho lze užít například při potřebě vyvolání velmi silné analgezie. V takovém

případě se do mozkové tkáně aplikuje mikroinjekce glutamátu či jeho syntetických analogů. (Ganong, 2005; Kew, Kemp, 2005)

Glutamát je v presynaptických zakončeních skladován ve váčcích, k jejichž vylití do synaptické štěrbině dochází po depolarizaci a s ní spojeném zvýšení koncentrace iontů Ca^{2+} v synaptoplasmě. Uvolněný glutamát poté aktivuje glutamátové receptory vyskytující se na postsynaptické membráně. (Ganong, 2005)

1.1.3 Receptory pro glutamát

Glutamátové receptory se vyskytují v CNS. Rozeznáváme dva typy receptorů pro glutamát – metabotropní a ionotropní.

Metabotropní receptor (mGluR) působí přes G proteiny navázané na intracelulární konec bílkovinných molekul. Pokud je tento receptor aktivován, dojde k uvolnění G proteinu a je spuštěna metabolická kaskáda. Metabotropní receptory nenesou specifické informace, mají zejména modulační funkci. Jejich výskyt v mozku je četný, lze je nalézt především v mozečku a hippokampu. (Ganong, 2005)

Ionotropní glutamátový receptor (iGluR) je iontový kanál, vyskytující se na membráně, který se otevře po navázání agonisty glutamátu. Ligandem řízené iontové kanály se obecně tvoří jako homo- nebo hetero-oligomerní sestavy integrálních membránových proteinových podjednotek. Podle agonisty (analogů glutamátu) rozlišujeme 4 skupiny ionotropních glutamátových receptorů – NMDA receptory (N-methyl-D-aspartát), AMPA receptory (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazol propionová kyselina), kainátové receptory (kainát) a δ receptory. Není doposud objasněno, zda δ receptory rovněž tvoří kanály, které vážou ligand či zda fungují na podkladě proteinových interakcí. $\delta 2$ jsou z velké části vyjádřeny v Purkyňových buňkách mozečku. Nepřítomnost povrchově vyjádřených $\delta 2$ způsobuje ataxii a narušuje vnímání strachu. (Bowie, 2008; Ganong, 2005; Jiang et al., 2007; Madden, 2002)

NMDA receptory jsou typické velmi pomalou aktivací a deaktivací, kdežto AMPA receptory jsou zodpovědné za rychlý excitační přenos na synapsích, což je pro CNS podstatná vlastnost. Kainátové receptory mohou stejně jako AMPA receptory zprostředkovat excitační synaptické signály a navíc se podílejí na modulaci presynaptického uvolňování neurotransmiteru, čímž regulují sílu

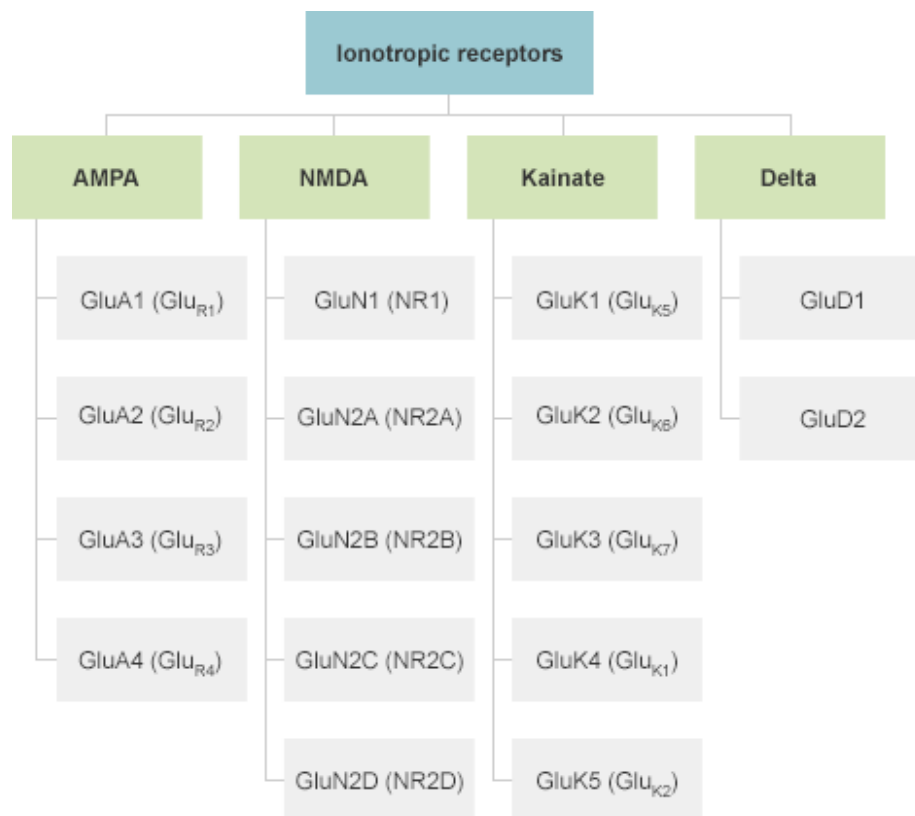
synaptických vazeb. Kainátové receptory jsou také potenciálním cílem pro aplikaci farmak při léčbě epilepsie a bolesti. (Madden, 2002)

V literatuře rovněž nacházíme dělení na NMDA a non-NMDA receptory, přičemž k aktivaci NMDA receptoru je nutné současné navázání glutamátu a glycinu, zatímco k aktivaci non-NMDA receptorů postačuje vazba s glutamátem. (Kleckner, Dingledine, 1988) NMDA receptor je kationtový kanál (anionty kanálem neprostupují) umožňující přístup pro Na^+ , K^+ , ale rovněž Ca^{2+} ionty. Během klidového membránového potenciálu je NMDA kanál blokován extracelulárními Mg^{2+} ionty a k odstranění této blokády je nezbytná depolarizace membrány. Depolarizace může nastat buď aktivací receptorů AMPA, které jsou často společně lokalizovány s NMDA receptory, nebo akčním potenciálem zpětného šíření. AMPA receptory jsou rovněž kationtové kanály, avšak většina je prostupná především pro jednomocné kationty (umožňují vtékání Na^+ a vytékání K^+) a pro vnější Ca^{2+} ionty jsou jen slabě propustné. (Bowie, 2008; Ganong, 2005; Rokyta, 2015)

Dalším rozdílem je, že NMDA receptory se vyskytují výhradně na neuronech, zatímco AMPA receptory a kainátové receptory nacházíme na neuronech i gliových buňkách. (Ganong, 2005)

Odklon od fyziologické regulace glutamátových receptorů může mít vliv na vznik některých neurologických a psychiatrických onemocnění. Bowie uvádí spojitost s Alzheimerovou chorobou, Parkinsonovou chorobou, Huntigtonovou chorobou, epilepsií, depresí a schizofrenií. (Bowie, 2008) Jediné léčivo doposud používané v klinické praxi, jež cílí na iGluRs, je nízkoafinitní blokátor NMDA receptoru, memantin, používaný k léčbě časných stadií Alzheimerovy choroby. (Bowie, 2008)

Každá skupina ionotropních glutamátových receptorů obsahuje několik podjednotek vlastních receptorů (obrázek 1).



Obrázek 1. Klasifikace ionotropních glutamátových receptorů (převzato z: <http://www.abcam.com/content/glutamate-receptors>)

Tyto podjednotky se mohou v rámci jedné skupiny různě kombinovat, čímž vznikají mnohé kombinace receptorů. Variabilitu ještě zvyšuje úprava RNA a alternativní sestřih. Tyto modifikace mohou ovlivnit rozsah i kinetiku elektrofyziologické odpovědi kanálu. iGluRs tedy vykazují enormní molekulární a funkční rozmanitost. (Madden, 2002; Lilliu et al., 2001; Szczurowska a Mareš, 2015)

Každá podjednotka glutamátového receptoru obsahuje 4 semiautonomní domény - extracelulární amino-terminální doménu (ATD), extracelulární ligand vázající doménu (LBD), transmembránovou doménu (TMD) a intracelulární karboxyl-terminální doménu (CTD). (Sobolevsky et al. 2009)

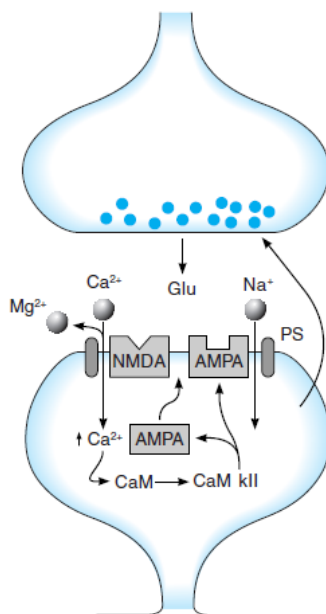
1.1.4 AMPA receptory

AMPA receptory jsou heterotetramery, jež jsou složené z podjednotek známých jako GluA1 až GluA4 (rovněž označované jako GluR1 až GluR4). Jsou zodpovědné za rychlou excitační synaptickou signalizaci v mozku. Tato rychlá signalizace je pro člověka důležitá, avšak prolongovaná aktivace AMPA receptorů má výrazně toxický vliv na neurony a je klíčová pro tvorbu a šíření záchvatovité aktivity. Vzhledem k široké distribuci AMPA-selektivních iGluRs v CNS je tato třída

receptorů spojována nejenom s epilepsií, ale celkově s velkým množstvím neurodegenerativních i jiných poruch CNS. (Bowie, 2008; Madden, 2002; Szczurowska a Mareš, 2013)

AMPA receptory, a obecně iGluRs, hrají rovněž důležitou roli v synaptické plasticitě, jako je dlouhodobá potenciace (Long-Term Potentiation, LTP) a dlouhodobá deprese (Long-Term Depression, LTD), které se významně podílí na schopnosti učení a paměti. (Bowie, 2008; Madden, 2002)

„Dlouhodobá potenciace je rychle vznikající stabilní zvýšení postsynaptické odpovědi na presynaptickou stimulaci vyvolané krátkou salvou podnětů o vyšší frekvenci, která aktivuje presynaptické neurony.“ (Ganong, 2005, str. 116) LTP může trvat až několik dnů a je alespoň zčásti způsobena zvýšením intracelulární koncentrace Ca^{2+} v postsynaptickém neuronu. V oblasti hipokampu, kde byla LTP nejvíce prozkoumána, způsobuje glutamát po uvolnění z presynaptických zakončení depolarizaci postsynaptického neuronu primárně aktivací AMPA receptorů. Tato aktivace uvolní Mg^{2+} blokádu NMDA receptorů a vápenaté ionty se spolu se sodíkem dostávají do neuronů. Zvýšené množství Ca^{2+} v cytosolu aktivuje kalmodulin (CaM), který poté aktivuje Ca^{2+} -kalmodulinkinázu II (CaM kII). Díky kináze se zvětšuje vodivost iontových kanálů AMPA receptorů a zároveň se zvyšuje počet AMPA receptorů v synaptické štěrbině. Navíc postsynaptický neuron vysílá chemický signál k neuronu presynaptickému, kde působí dlouhodobý vzestup výdeje glutamátu. (obrázek 2)



Obrázek 2. Vznik LTP v dendritech buněk CA1 hipokampu (Ganong, 2005, str.116)

Dlouhodobá deprese naopak snižuje efektivitu synaptického přenosu. Pravděpodobně je způsobena defosforylací AMPA receptorů, která vede k poklesu vodivosti jejich iontových kanálů a snížení počtu receptorů v synaptické štěrbině. (Ganong, 2005)

Dle Maddena má na AMPA receptory vliv i kainát, jenž je tzv. parciální agonista a indukuje menší stupeň aktivace a rovněž menší stupeň desenzitizace než AMPA nebo glutamát. (Madden, 2002)

Koncentrace AMPA receptorů v CNS se během života člověka mění. Nejvyšší koncentrace je dosaženo v raných fázích ontogeneze a po narození, s postupujícím věkem receptory ubývají. Zejména v časných stádiích postnatálního vývoje se mění uspořádání podjednotek glutamátových receptorů typu AMPA i NMDA. Díky výrazné excitaci glutamátových receptorů v mozku novorozence může docházet k rychlému vývoji CNS, na druhou stranu ho však tato vlastnost činí náchylnějším k epileptickým záchvatům. (Szczurowska a Mareš, 2013)

1.1.4.1 Propustnost AMPA receptory ovládaných kanálů

Nepřítomnost GluA2 podjednotky v receptoru způsobí, že se AMPA receptor stává propustný nejen pro Na^+ a K^+ , ale rovněž pro Ca^{2+} ionty. Naopak pokud je GluA2 podjednotka v receptoru obsažena, je receptor pro Ca^{2+} ionty nepropustný. (Szczurowska a Mareš, 2013)

GluA2 je tedy jedinou podjednotkou AMPA receptoru, která vytváří homopolymery nepropustné pro Ca^{2+} ionty. Expresе všech ostatních podjednotek AMPA receptoru (GluA1, GluA3 a GluA4) vede ke značné bivalentní permeabilitě. Nicméně samotná přítomnost nebo nepřítomnost GluA2 podjednotky nutně neurčuje propustnost AMPA receptoru pro vápník. Důvodem tohoto rozdílu je jediný aminokyselinový zbytek, tzv. Q/R místo, které se nachází na vrcholu iontového kanálu (segment M2, viz níže). Toto umístění je ideální pro možnost ovlivňování toku dvojmocných iontů. Q/R místo podjednotek GluA1, 3 a 4 obsahuje neutrální aminokyselinu glutamin (tj. Q), zatímco podjednotka GluA2 může existovat ve dvou formách, nazývaných flip a flop. V prvním případě (varianta flop) není GluA2 podjednotka upravena, obsahuje rovněž aminokyselinu glutamin a kanál je propustný pro Ca^{2+} ionty. Ve druhém případě (varianta flip) je díky úpravě RNA neutrální glutamin vyměněn za kladně nabitý arginin (tj. R), který s největší pravděpodobností omezuje transport dvojmocného iontu díky molekulovým interakcím. Arginin byl tedy identifikován jako molekulární determinant zajišťující nepropustnost vápníku skrze receptory obsahující GluA2.

Převážná většina GluA2 u dospělých je upravena pro kódování argininu. (Bowie, 2008; Kew, Kemp, 2005; Szczurowska a Mareš, 2013; Szczurowska a Mareš, 2015)

U modelů ischemie bylo zjištěno, že inzult vede k down-regulaci GluA2, což má za následek zvýšení permeability pro Ca^{2+} ionty, které posléze mohou poškodit mitochondrie a iniciovat buněčnou smrt. (Bowie, 2008)

1.1.4.2 Vývojové změny v expresi podjednotek AMPA receptorů

Každá z podjednotek AMPA receptoru je kódována izolovaným genem a má typický vzor exprese, tedy aktivity genu a vyjádření informace, v místě a čase. Zdá se, že regulace transkripce podjednotek AMPA receptoru je uskutečňována během ontogenetického vývoje. (Lilliu et al., 2001)

Poměr v zastoupení AMPA receptorů propustných a nepropustných pro Ca^{2+} se během vývoje mění a rovněž zastoupení v jednotlivých oblastech mozku je rozdílné. V nezralém mozku je množství GluA2 podjednotek nižší než v dospělosti, což může vést k vyšší náchylnosti ke glutamátém zprostředkovanému excitotoxickému poškození. Zdá se, že příčinou zvýšené excitability je přítomnost AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} , jež působí hyperexcitaci a následný zánik inhibičních GABA-ergních interneuronů. (Szczurowska a Mareš, 2013; Szczurowska a Mareš, 2015).

Rovněž v dospělosti může selektivní exprese AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} v CNS vysvětlovat, proč jsou určité neuronové populace citlivé na excitotoxicitu. (Bowie, 2008)

Ve ventrálním mesencephalu a striatu jsou četně zastoupeny všechny podjednotky AMPA receptorů. Hrají zde zásadní roli v kontrole bazální aktivity a neuronální plasticitě zmíněných struktur. GluA1 a GluA4 mRNA jsou více exprimovány v mesencephalu než ve striatu, k jehož vývoji dochází v rámci prenatálního období později (E15 - P0). (Lilliu et al., 2001; Szczurowska a Mareš, 2015). Nejvíce jsou GluA2 a GluA3 podjednotky vyjádřeny v kortikothalamických synapsích, což zdůrazňuje význam kortikothalamického vstupu v selektivním zvýraznění či přenosu senzorických informací thalamem a v nastavení thalamokortikální reciprocity. (Szczurowska a Mareš, 2013) V časných stádiích života jsou nejvíce rozšířeny podjednotky GluA3 a GluA4, kdežto podjednotka GluA2 je vyjádřena nejméně. S vývojem mozku se exprese GluA4 v hipokampu snižuje a naopak exprese GluA2 se zvyšuje, až dosáhne v mozku dospělého potkana dominantního zastoupení. (Pandis et al., 2006)

Několik studií naznačuje, že u hipokampu a amygdaly převládají AMPA receptory bez upraveného GluA2 s vysokou propustností pro Ca^{2+} v inhibičních interneuronech, zatímco pyramidové buňky mají převážně non- Ca^{2+} permeabilní AMPA receptory. (Kew, Kemp, 2005) K převaze v zastoupení AMPA receptorů nepropustných pro Ca^{2+} v pyramidových neuronech

potkana dochází mezi P13 a P21. (Kumar et al., 2002). Tento časový úsek ovšem platí pouze pro AMPA receptory na synapsích. Na dendritech těchto neuronů totiž AMPA receptory obsahující GluA2 převažují již od P6. (Hsu et al., 2010). To je zřejmě důvod, proč jsou dendrity kortikálních pyramidových neuronů již v časných stádiích postnatálního vývoje nepropustné pro Ca^{2+} . (Szczurowska a Mareš, 2013)

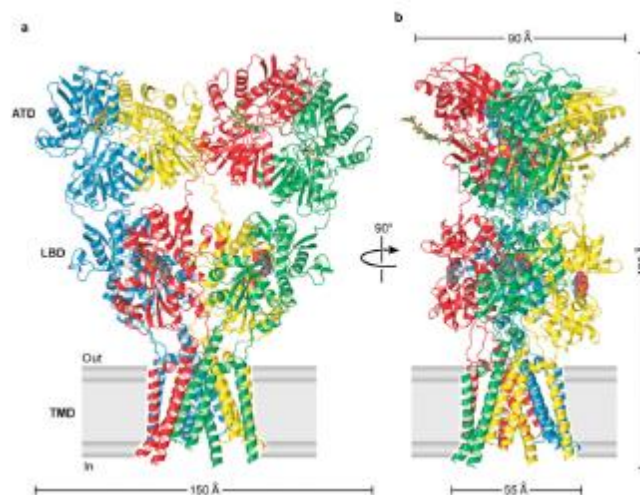
1.1.4.3 Struktura AMPA receptoru

K lepšímu porozumění fungování glutamátových receptorů pomohla tzv. krystalografická data. Výsledky dat vedly k novému chápání vazby agonistů a antagonistů ke glutamátovým receptorům a tím umožnily porozumět i tomu, jakým způsobem probíhá jejich regulace. (Sobolevsky et al., 2009)

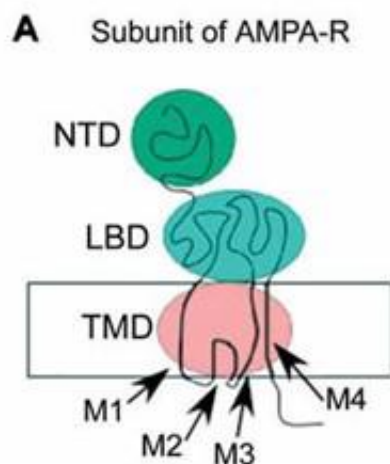
Všechny podjednotky AMPA receptorů mají stejnou primární strukturu. Jak bylo uvedeno výše, každá podjednotka se skládá z extracelulární amino-terminální domény (ATD), extracelulární ligand vázající domény (LBD), transmembránové domény (TMD) a krátké intracelulární karboxyl-terminální domény (CTD). (Sobolevsky et al., 2009)

Podjednotka GluA2, jež je nejčastěji popisována, má tvar podobný velkému písmenu „Y“, kde jsou hlavní tři domény uspořádány ve vrstvách. ATD zaujímá horní část pomyslného písmene Y a podílí se na sestavení specifického receptoru, přenosu a modulaci, LBD je vložena mezi ATD a iontový kanál, je centrem pro vazbu agonistů či kompetitivních antagonistů a hraje roli v aktivaci propustnosti membrány, TMD tvoří vlastní iontový kanál, který obsahuje tři membránu překlenující segmenty (M1, M3 a M4) a „reentry smyčku“, neboli segment M2. Segment M4 je následován intracelulární CTD, jež se podílí na lokalizaci a regulaci receptoru. (Kew, Kemp, 2005; Sobolevsky et al., 2009) (obrázek 3,obrázek 4)

Kromě toho, že aktivované AMPA receptory generují excitační postsynaptický potenciál, mohou rovněž vysílat informace do extracelulárního prostoru o své vlastní desenzitizaci. (Nakagawa et al., 2005)



Obrázek 3. Krytalografická struktura GluA2 podjednotky AMPA receptoru (Sobolevsky et al., 2009, str. 17)



Obrázek 4. Struktura AMPA receptoru (Nakagawa et al., 2005)

1.1.4.4 AMPA receptor a epileptický záchvat

Vlivem epileptického záchvatu může dojít ve vyvíjejícím se mozku k rychlým změnám v uspořádání a funkci podjednotek AMPA receptoru. Různé oblasti mozku vykazují různou náchylnost ke vzniku epileptických záchvatů. Například v mozečku epileptický záchvat díky převaze inhibičních neuronů nevzniká. Naopak staré korové oblasti, typicky hipokampus, patří mezi nejvíce náchylné. Zvýšená excitabilita hipokampu může přeměnit tuto oblast mozku na tzv. epileptickou síť. Při různých typech záchvatů dochází ke změně exprese podjednotek GluA2, tudíž i ke změně

propustnosti pro Ca^{2+} . Dle typu se může jednat o změny omezující se na určité období vývoje či o změny dlouhodobé.

Nárůst excitability je spojen s rychlým vzestupem exprese podjednotek GluA1 a GluA2 po záchvatu. Avšak cca 12 – 16 hodin po status epilepticus byl pozorován významný pokles exprese GluA1 a GluA2. Tento fakt může vést k uspořádání receptorů AMPA propustných pro Ca^{2+} a zvýšení toxicity endogenního glutamátu po neurologickém poškození. (Szczurowska a Mareš, 2013) Naopak nárůst GluA2 v buňkách zralého gyrus dentatus po status epilepticus snižuje propustnost pro Ca^{2+} , což může mít protektivní vliv na neurony a bránit excitotoxickému poškození. (Szczurowska a Mareš, 2013)

U modelů záchvatů jsou využívány antagonisté AMPA receptorů jako vysoce účinné antikonvulzivní látky. AMPA receptory však podléhají vývojovým změnám ve složení podjednotek. AMPA receptory propustné pro Ca^{2+} jsou vysoce exprimovány v somatosenzorickém kortexu v nezralém mozku. (Hsu et al., 2010; Szczurowska a Mareš, 2013) Jelikož je Ca^{2+} důležitou intracelulární signální molekulou, očekává se například určitý vliv regulace exprese podjednotky AMPA receptoru na poškození neuronů po proběhlých záchvatech. (Standley et al. 1995) Tyto specifické změny ve složení a expresních vzorcích AMPA receptorů během vývoje, jakož i jejich účast na intracelulární signalizaci jsou slibným cílem pro vývoj věkově specifických terapeutik, ovlivňujících excitotoxicitu a následné neuronální poškození. (Szczurowska a Mareš, 2013)

1.2 Farmakologické ovlivnění AMPA receptoru

V 80. letech 20. století byly testovány první antagonisté AMPA receptorů. Jednalo se o látky, které se ovšem vázaly i na vazebná místa pro glycin na NMDA receptoru, tudíž nebyly dostatečně selektivní, aby byly vhodně využitelné. Od té doby je do klinických studií zařazována řada látek, u kterých je specificita pro AMPA receptor výraznější. (Kew, Kemp, 2005)

Excitační synaptický přenos je zprostředkován zejména prostřednictvím rychlých kanálů GluA typu AMPA, které jsou považovány za klíčové pro chronickou neurodegeneraci. Například glutamátem vyvolané destrukci motorických neuronů lze zabránit blokádou AMPA receptorů, nikoli však blokádou receptoru NMDA. Proto jsou látky, jež cílí na receptory AMPA zajímavé pro terapeutické ovlivnění chronických neurodegenerativních poruch. Přestože existuje velké množství látek, známé svou modulací a blokací AMPA receptorů in vitro, zatím žádná z těch, co prošly klinickým testováním, nebyla vhodná pro použití v terapii pacientů. (Schlesinger et al., 2005)

1.2.1 Látka IEM 1460

Jak bylo uvedeno výše, jsou AMPA receptory postrádající GluA2 podjednotku (propustné pro Ca^{2+}) významně rozšířeny ve vyvíjejícím se mozku. Látka IEM 1460 [1-trimethylammonio-5-(1-adamantin-methylammonio)pentan]dibromid] je specifickým antagonistou právě těchto receptorů a proto by mohla být potenciálním věkově specifickým antikonvulzivem. Tato látka se řadí mezi tzv. adamantové deriváty, byla objevena v 90. letech minulého století a poté byla opakovaně testována jako blokátor AMPA receptorů prostupných pro vápník. (Bolshakov, 2005; Buldakova, 1999; Magazanik et al., 1997; Schlesinger et al., 2005; Szczurowska a Mareš, 2015) Kromě toho rovněž blokuje nikotinový receptor sympatických a parasympatických ganglií a je agonistou receptoru NMDA. (Gmiro et al., 2008)

Podle studií je antikonvulzivního účinku látky IEM 1460 dosaženo jak po intracerebrální, tak po intraperitoneální (periferní) aplikaci. V obou případech je účinek zprostředkován totožným centrálním mechanismem. Antikonvulzivní působení této látky na modelu nikotinem indukovaných záchvatů je kombinací blokady postsynaptických glutamátových receptorů typu AMPA v interneuronech hipokampu a pyramidových buňkách a blokady presynaptických nikotinových receptorů v gangliích parasymptiku. (Gmiro et al., 2008).

Použití látky IEM 1460 jako markeru nepřítomnosti GluA2 podjednotky odhalilo diferenciální distribuci AMPA receptorů bez GluA2 podjednotky v mozku potkana. Populace Bergmanových gliových buněk, jakož i striatálních cholinergních interneuronů se zdají být velmi homogenní a nevykazují expresi AMPA receptorů s GluA2 podjednotkou. Na rozdíl od nich, nepyramidové buňky hipokampu a mozkové kůry vykazují variace v zastoupení AMPA receptorů. Některé z těchto buněk obsahují oba typy AMPA receptorů (s i bez GluA2 podjednotky). Pyramidové neurony kortexu a hipokampu jsou na látku IEM 1460 poměrně málo citlivé. Rozdíl v afinitě k bloku látkou IEM 1460 pozorovaný v těchto typech buněk však naznačuje, že blokující aktivitu mohou ovlivnit některé další přítomné faktory. Předpokladem je, že právě počet podjednotek GluA2 v sestavě AMPA receptoru může být jedním z faktorů. (Buldakova, 1999; Buldakova, 2007)

Bylo prokázáno, že látka IEM 1460 v dávce 3 mg/kg hmotnosti, vykazuje u dospělých myší antikonvulzivní účinek u nikotinem vyvolaných záchvatů a rovněž u záchvatů vyvolaných kyselinou kainovou. (Gmiro et al., 2008) Na druhou stranu nedokázala potlačit maximální elektrošokové záchvaty, a to ani v dávce 30 mg/kg. (Borowicz, Banach, 2007).

Szczurowska a Mareš studovali možný antikonvulzivní účinek této látky u vyvíjejících se potkanů pomocí dvou modelů epileptických záchvatů. Jednalo se o záchvaty vyvolané látkou pentylenetetrazol a o záchvaty indukované kortikálními následnými výboji u potkanů ve věku P12,

P18 a P25. Aplikace látky IEM1460 v dávce 20 mg / kg měla za následek zpožděný nástup PTZ-indukovaných klonických záchvatů ve všech věkových skupinách. To značí, že blokáda AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} pomocí látky IEM 1460 byla dostatečná a zabránila šíření epileptické aktivity do motorického systému zvířete. U generalizovaných tonicko-klonických záchvatů indukovaných rovněž látkou PTZ měla látka v dávce 10 a 20 mg/kg antikonvulzivní účinek pouze u zvířat ve věku P18 a P25. Podávání IEM 1460 tedy způsobilo adekvátní blokaci AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} v oblastech mozku, podílejících se na generalizovaných tonicko-klonických záchvatech u 18 a 25denních mláďat, ovšem v tomto případě nebyla látka účinná pro věk P12. Ukázalo se, že tyto dva typy záchvatů indukované látkou PTZ (klonický a tonicko-klonický) jsou generovány v různých strukturách mozku. Zatímco klonické záchvaty vznikají z mozkové kůry a oblasti předního mozku, generalizované tonicko-klonické záchvaty generované v mozkovém kmeni jsou charakterizovány činností předního thalamu, mozkové kůry a dentálního gyru. Bylo však zjištěno, že postižení různých struktur mozku se může u jednotlivých zvířat měnit ve vztahu ke stádiu vývoje a způsobu podávání PTZ. (Szczurowska a Mareš, 2015) Po opakovaných stimulacích u kontrolních zvířat starších 12 dnů se trvání kortikálních následných výbojů postupně zvyšovalo. Dávka 10 mg/kg toto prodloužení zcela blokovala a dávka 20 mg/kg ho částečně potlačila. IEM 1460 mělo u zvířat ve věku P18 a P25 lehký prokonvulzivní účinek, tj. trvání následných výbojů se s opakovanou stimulací prodlužovaly. Z těchto výsledků lze vyvodit, že účinek látky IEM 1460 závisí na modelu použitých záchvatů, jejich iktogenní struktuře a rovněž na vývojových změnách v podjednotkovém složení AMPA receptorů. (Szczurowska a Mareš, 2015)

1.3 Epilepsie

Epilepsie je onemocnění, jež se projevuje opakovanými epileptickými záchvaty. Jde o soubor různorodých syndromů, které mají společné právě opakující se záchvaty. Jednotlivé syndromy charakterizuje specifický vzorec záchvatu, čas prvního výskytu, frekvence opakování, přidružené příznaky, souvislost s věkem jedince, výskytem v rodině, EEG záznamem a prognózou. Jako epileptický záchvat se označuje klinický projev vycházející z náhlých nadměrných synchronních abnormálních výbojů skupiny neuronů v tkáni mozku (epileptické ohnisko). Jedná se o přechodnou poruchu nervové činnosti, jejíž projevy mohou být ve smyslu poruchy motorické (klonické křeče, změny tonu svalstva), senzorické (parestzie, změny senzorického vnímání), vegetativní (změny frekvence dechu a tepu, zblednutí), poruchy vědomí nebo poruchy chování. Zmíněné příznaky se různě kombinují. (Králíček, 2011; Rokyta, 2015) Přestože jsou projevy epileptických záchvatů mezi

nemocnými různorodé, existuje několik charakteristických znaků, společných pro všechny epileptické paroxysmy. Jmenovitě charakterizuje epileptický záchvat náhlý vznik příznaků, přechodné trvání projevů, určitá stereotypnost projevů u jednotlivých nemocných a existence epileptického ohniska. (Králíček, 2011)

Ve většině případů se jedná o tzv. idiopatickou epilepsii, tedy bez zjevné příčiny. Asi 20 % epilepsií se řadí mezi symptomatické, které mohou být způsobeny mozkovými nádory, zraněními, infekcemi, rovněž i nadměrným užíváním alkoholu nebo jiných psychoaktivních látek. Prevalence epilepsie je 0,5 – 1 % (bez započtení ojedinělých záchvatů). Děti jsou postiženy 4× častěji než dospělí. Asi u 60 % dětských pacientů epilepsie během dospívání vymizí, avšak u části pacientů se záchvaty v průběhu puberty naopak objevují a přetrvávají do dospělosti. Epilepsie nemá vliv na inteligenci, jak dokládá skutečnost, že rozsah inteligenčních kvocientů pro epileptiky je obdobný jako u populace obecně. (Fiest et al., 2017; Nevšimalová, 2002; Singer, Zawada, 2013)

Přestavba neuronální sítě v mozku je pro epilepsii typická a odlišuje ji od ojedinělých epileptických záchvatů. Epileptický záchvat má během života mnohonásobně více jedinců a může ho vyvolat například iontová dysbalance (především hypokalcemie), hypertermie (febrilní křeče u dětí), hypoglykemie, některé jedy či léky a další. Přejít od jednotlivého záchvatu k rozvinutému onemocnění se nazývá epileptogeneze. Jedná se o dlouhodobý proces postupné transformace neuronové sítě. (Rokyta, 2015) „Změny vyskytující se během tohoto období jsou například: postupný zánik inhibičních interneuronů nebo excitačních interneuronů aktivujících inhibiční neurony a vytváření nových kolaterál, které míří zpět k excitačnímu neuronu a posilují jeho činnost.“ (Rokyta, 2015, str. 547)

1.3.1 Vznik záchvatu

U zdravého člověka jsou excitační i inhibiční nervové okruhy v mozku v tzv. dynamické rovnováze. Okruh excitační je zajišťovaný excitačními neurotransmitery, především glutamátem a inhibiční naopak inhibičními - GABA. Každá část mozku má specifickou úroveň excitability a synchronie. Excitabilita nervových buněk závisí na pohybu iontů přes specifické napětově řízené nebo receptorem aktivované membránové kanály. Rolí hraje typ, množství a rozmístění membránových receptorů buněk spojených s iontovými kanály, rovněž aktuální zastoupení podjednotek receptoru, úroveň aktivace systému druhého posla a modulace genové exprese neuronu. Důležitým krokem v posledních letech byla identifikace některých monogenních epilepsií, které jsou právě výsledkem mutací genů kódujících iontové kanály nebo receptory, tzv. epileptogenní kanalopatie. Záchvaty vznikají podle všeho přechodnou nevyrovnanou aktivitou excitačních

a inhibičních faktorů společně se změnou vlastností membrán buněk, poruchou rovnováhy iontů uvnitř a vně buňky či změnou modulačních mechanismů. Společným znakem záchvatů je hyperexcitabilita a hypersynchronizace v jedné nebo více oblastech CNS. (Rokyta, 2015; Shorvon et al., 2016)

U některých typů epilepsie je přítomen podnět, který se uplatňuje jako spouštěč záchvatu. Může se jednat o podnět ze zevního (světelné, akustické vjemy, psychicky stresující situace, konzumace alkoholu, některá farmaka apod.) i vnitřního prostředí (zejména humorální změny, např. závislost záchvatů na menstruačním cyklu u žen, t.j. katameniální epilepsie). (Nevšimalová, 2002)

1.3.2 Druhy epileptických záchvatů

Klasifikace záchvatů dle Mezinárodní klasifikace epileptických záchvatů vychází z klinického obrazu korelujícím s elektroencefalografickým vyšetřením. Epileptické záchvaty se dělí dle toho, zda je či není možné lokalizovat určitou oblast v mozku, ze které se patologická aktivita šíří (tzv. epileptické ložisko), na fokální a generalizované. Třetí obvykle udávanou skupinou záchvatů jsou tzv. neklasifikovatelné. (Komárek, 2005; Rokyta, 2015)

1.3.2.1 Parciální záchvaty (fokální)

Jako parciální záchvaty jsou označovány ty, u kterých počáteční klinické projevy nebo EEG záznam provedený v době záchvatu ukazují na zvýšenou elektrickou aktivitu v ohraničené oblasti mozkové kůry jedné mozkové hemisféry. (Králíček, 2011)

Epileptické záchvaty parciální můžeme dále dělit na záchvaty s jednoduchou symptomatologií, kdy se epileptické ložisko nachází zejména v neokortexu a klinické příznaky se dotýkají jednoho systému (motorické, senzitivní atd.), s komplexní symptomatologií, kdy je ložisko nejčastěji v limbickém systému a klinicky jsou přítomny poruchy chování, vědomí a vegetativní příznaky, a na parciální záchvaty sekundárně generalizované, kdy se původně parciální aktivita rozšíří na celý mozek. (Rokyta, 2015)

Při jednoduchých parciálních záchvatech nedochází k poruchám vědomí. Motorické záchvaty mají různý klinický obraz, dle toho, kde v motorickém kortexu se ohnisko nachází. Po skončení záchvatu může dojít k několik hodin trvající paréze postižených svalů (tzv. Toddova paréza). Projevy senzitivních záchvatů jsou nejčastěji parestzie postižených částí těla. Klinická manifestace sensorických záchvatů opět závisí na lokalizaci a může být velmi variabilní, dle postižené oblasti mohou vznikat skotomy, fosfény, sluchové nebo čichové halucinace, chuťové vjemy, vestibulární

poruchy aj. Rovněž se při těchto parciálních záchvatech mohou objevit i psychické projevy (stavy derealizace, depersonalizace aj.). (Nevšímalová, 2002)

Parciální záchvaty s komplexní symptomatologií provází vždy kvalitativní porucha vědomí, která je vyjádřena ihned na počátku záchvatu nebo může tento typ navazovat na jednoduchý parciální záchvat. Objevují se pohybové automatismy jako mlaskání, polykání, žvýkání, olizování nebo i komplexnější pohybové jednání a na záchvat je vždy amnézie. Někdy pohybové automatismy doprovází i smích, agresivní chování či jiné emoční projevy. Asi z 80 % se jedná o záchvaty temporálního původu. (Králiček, 2011; Nevšímalová, 2002)

Předpokladem vzniku parciálního záchvatu je tzv. epileptický neuron, jehož membrána je i v klidu lehce depolarizovaná, pravděpodobně kvůli poruše transportních iontových mechanismů a její odpověď na podráždění není generování jednoho akčního potenciálu, ale celé salvy, která vzniká na podkladě paroxysmálního depolarizačního posunu. Vstup extracelulárních iontů Ca^{2+} do neuronu způsobuje, že tvorba AP se rychle opakuje a depolarizace je prodloužena. Rovněž se otevírají napětově řízené Na^+ kanály, Na^+ ionty vstupují po koncentračním spádu do buňky a umožňují opakovanou tvorbu AP. Následně je gabaerními receptory zprostředkována repolarizace a hyperpolarizace. Podle typu buněk dojde buďto ke vstupu iontů Cl^- dovnitř buňky nebo vylití iontů K^+ z buňky ven. Opakovanými výboji se stále zvyšuje extracelulární koncentrace iontů K^+ . To omezuje rozsah hyperpolarizace a tak je depolarizace v okolí snazší. Ca^{2+} se hromadí v presynaptických zakončeních, což umožňuje zvýšené uvolňování excitačních neurotransmiterů. Prolongovaná depolarizace aktivuje NMDA receptor, čímž se zvýší vstup extracelulárního Ca^{2+} do buňky a excitabilita neuronů roste. (Rokyta, 2015)

„Uvažovanou podstatou primární poruchy iontových toků na membráně je možná dysfunkce $\text{Na}/\text{K} - \text{ATPázy}$, omezená schopnost gliových buněk pufrovat zvýšenou extracelulární koncentraci iontů K^+ , snížení činnosti inhibiční synapse, zvýšení excitační stimulace, remodelace synaptických spojení, metabolické změny v buňce nebo i změna objemu extracelulárního prostoru či extracelulárního iontového složení – snížení hladiny iontů Mg^{2+} a Cl^- a zvýšení hladiny K^+ “ (Rokyta, 2015, str. 548)

V různých oblastech mozku je pravděpodobnost vzniku epileptického ohniska různá. Nejčastěji vznikne fokus v neokortexu a limbickém systému (hipokampu, vzácněji v jiné části limbického systému). Naopak v cerebellu epileptické ohnisko nevzniká, jelikož zde jednoznačně převládají inhibiční synapse. (Rokyta, 2015)

1.3.2.2 Primárně generalizované záchvaty

Tyto záchvaty lze rozdělit do dvou skupin. První značíme grand mal, neboli velký záchvat, během kterého jsou postiženy velké svalové skupiny, objevují se tonické či klonické křeče (nebo kombinace obou), dochází ke ztrátě vědomí a vyřazení posturálních reflexů. Pravděpodobnou příčinou je náhlý vznik abnormálních výbojů v obou polovinách mozku. Druhým typem generalizovaného záchvatu jsou tzv. absence (dříve označován jako petit mal), kdy dochází rovněž k poruše vědomí, avšak pacient je schopný udržet vzpřímenou polohu (je porušena pouze ascendentní část retikulární formace, zatímco descendentní část postižena není). Tento typ záchvatů je typický pro děti v pozdním předškolním a školním věku, přibližně do začátku puberty. Určité typy záchvatů totiž nastupují při určitém stupni zralosti mozku. (Rokyta, 2015)

Můžeme nalézt i jiné, podrobnější dělení. Nevšimalová například dělí generalizované záchvaty do 6 skupin podle motorických projevů – 1.) záchvaty tonicko-klonické, 2.) tonické, 3.) myoklonické, 4.) atonické, 5.) absence a 6.) generalizované epileptické syndromy.

Jako nejčastější uvádí záchvaty tonicko-klonické, před jejichž započítáním se někdy objevuje tzv. prodromální stádium, které značí blížící se záchvat a jehož trvání může být několik hodin až dní. Toto stádium se projevuje změnou nálady, zvýšenou iritabilitou, bolestmi hlavy aj. Samotný záchvat začíná typicky tonickou fází, je následován fází klonickou a nakonec se objevuje postiktální stádium, kdy odeznívají motorické projevy, dechové funkce se normalizují a pacient s poruchou vědomí obvykle přechází do hlubokého spánku. Po probuzení bývá pacient ještě zmatený, unavený, bolí ho svaly celého těla a rovněž se objevuje úporná bolest hlavy. (Nevšimalová, 2002)

U tonických záchvatů dochází, jak název napovídá, k tonické svalové kontrakci. Křeč může predilekčně postihnout určité svalové skupiny anebo být generalizovaného rázu.

Jako myoklonii označujeme náhlý mimovolný záškub, který opět buďto postihuje určitou svalovou skupinu, nebo je generalizovaný. Myoklonické záchvaty jsou mnohdy sdruženy s věkově vázanými epileptickými syndromy.

Atonické záchvaty charakterizuje ztráta svalového tonu. Jako u výše zmíněných záchvatů rozlišujeme atonii určité svalové skupiny a atonii generalizovanou, jež vede k okamžitému pádu pacienta. Tyto záchvaty se vyskytují zejména v dětském věku. (Nevšimalová, 2002)

Absence byly popsány výše.

Jako poslední skupinu uvádí Nevšimalová generalizované epileptické syndromy. Tyto syndromy jsou vázány především na dětský věk a jsou idiopatické. Většina idiopatických epilepsií je důsledkem poruch iontových kanálů. Je prokázáno, že například excitabilita sodíkových kanálů

s věkem klesá. Některé formy jsou relativně benigní, jiné mají naopak závažnější prognózu. (Nevšimalová, 2002; Komárek, 2004)

Komárek uvádí dělení těchto epileptických syndromů dle věku pacientů, kdy typicky dochází k jejich prvnímu výskytu, na epileptické syndromy v prvním období (od narození do 4 měsíců), epileptické syndromy u kojenců a batolat (od 4. měsíce do 4. roku), epileptické syndromy u dětí mezi 4. až 12. rokem, epileptické syndromy u dospívajících a epilepsie se záchvaty při probuzení. Každá výše zmíněná skupina obsahuje několik epileptických syndromů. (Komárek, 2004)

1.3.3 Léčba epilepsie

Léčba symptomatické epilepsie spočívá v odstranění příčiny, jež je známá, je tedy kauzální. U epilepsie idiopatické příčina známá není, tudíž jde o léčbu symptomatickou s cílem minimalizovat příznaky a zajistit tak co nejkvalitnější život pacienta. V následujících odstavcích zmíním nejčastější metody, užívané v léčbě epilepsie.

Využívá se řada antikonvulziv či jejich kombinace dle typu epilepsie a individuální odpovědi pacienta na látku. V dlouhodobých klinických pozorováních je 80 % pacientů s nově diagnostikovanou epilepsií, díky antikonvulzivní léčbě, bez záchvatů obvykle během prvního roku léčby. Ani antiepileptika třetí generace nejsou schopna dlouhodobé kontroly záchvatů přibližně u 20 % pacientů. Toto a fakt, že většina léčiv má celou řadu nežádoucích účinků, vede k výzkumu stále nových látek. (Singer, Zawada, 2013; Shorvon et al., 2016)

Jak bylo uvedeno výše, asi 20 % pacientů s idiopatickou epilepsií je rezistentních na farmakoterapii. U některých z těchto pacientů je metodou volby operace mozku. Pro indikaci operace je nutné, aby se oblast, ve které se záchvaty objevují, nacházela při opakovaných EEG vyšetřeních (obvykle pomocí implantovaných hloubkových elektrod) vždy ve stejné lokalitě. Dalším významným kritériem pro indikaci operace je nutnost lokalizace postižení v oblasti mozku, která může být bez významného porušení psychických funkcí redukována. (Singer, Zawada, 2013)

Dalším typem operace dnes už jen výjimečně používaným je tzv. calosomie. Jde o postup zahrnující částečné oddělení obou mozkových hemisfér tím, že se protnou axony tvořící corpus callosum. Tento typ operace se provádí v případě častých epileptických záchvatů typu grand mal, v současné době je používán jen výjimečně. Jiné léčebné postupy pro epilepsii zahrnují stimulaci nervus vagus. Pacientovi se implantuje zařízení, jež pomocí elektrické stimulace ovlivňuje nervus vagus a snižuje množství záchvatů. V omezeném počtu případů mohou být záchvaty pozitivně ovlivněny pomocí zvláštního dietního režimu, nazývaným ketogenní dieta. Tato dieta se vyznačuje

příjmem stravy s vysokým obsahem tuku a nízkým obsahem sacharidů. I přes spektrum farmak a chirurgických výkonů nedochází u 5 – 8 % pacientů ke kontrole záchvatů. (Singer, Zawada, 2013)

1.4 Laboratorní potkan

Norský neboli laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) byl prvním druhem, který byl domestikován za účelem vědeckého výzkumu. Již více než sto let je používán v behaviorálních, neurologických, fyziologických a jiných formách výzkumu. (Whishaw, 2004)

Novorozená mláďata potkanů nemají zralou CNS a svou zralostí odpovídají prenatalnímu stádiu vývoje člověka. (Gramsbergen, 1998). Díky tomu je možné sledovat vliv morfologického, fyziologického a biochemického zrání motorických a jiných systémů na motorické projevy jedince. (Altman, Sudarshan, 1975) Průběh motorického vývoje potkana je velmi dobře zmapován, což umožňuje zhodnotit působení různých endogenních a exogenních vlivů na zrání nervového systému. Jedním z exogenních vlivů může být podání farmaka, které je preklinicky testováno z hlediska vývojové toxicity (Calamandrei, 2004).

1.4.1 Ontogenetický vývoj potkana

Etapa vývoje zárodku trvá u potkana 22 – 23 dní (3 týdny) a stejná doba připadá i na vývoj postnatální, celkově se tedy jedná o 6týdenní vývoj. U člověka trvá vývoj o poznání déle. Dítě se fyziologicky rodí po přibližně 270 dnech intrauterinního vývoje a jeho postnatální vývoj je ukončen kolem 20. roku věku. Nicméně, lze pozorovat určitou podobnost mezi vývojem potkana a člověka, pokud jednomu dni vývoje potkana přiřadíme jeden měsíc vývoje člověka. (Jamon, 2006; Vinay et al., 2005). Vývoj je obdobný rovněž v tom, že u obou skupin probíhá podél rostrokaudální osy a proximodistálním směrem. (Vinay et al., 2005; Lelard et al., 2006; Geisler et al., 1993, Brocard et al., 1999) Výjimku tvoří antigravitační držení hlavy, kterého je mláďe schopno v delším časovém intervalu až koncem prvního týdne po narození. (Altman, Sudarshan, 1975; Clarac et al., 1998)

Jelikož novorozená mláďata potkanů nemají zralou CNS, úroveň jejich motoriky v době narození lze přirovnat ke stavu vývoje motoriky v pozdní fázi druhého trimestru prenatalního vývoje člověka. (Clancy, Darlington a Finlay, 2001; Gramsbergen, 1998).

1.4.1.1 Motorický vývoj

Jak bylo uvedeno výše, mláďata se po narození jeví jako velmi nezralá. Rodí se holá, mají slepená víčka, slyší jen v úzkém ultrazvukovém spektru a jejich pohybová aktivita je nepatrná (Jamon, 2006). Vestibulární aparát a čichový orgán jsou po narození vyvinuty lépe, i když ne zcela, a pomáhají prakticky slepému a hluchému mláděti dostat se k matce, jakožto zdroji obživy. (Clarac et al., 1998) Je zajímavé, že i působení prostředí v prenatálním období má vliv na vývoj vestibulárního aparátu a jeho funkci po narození. Toto tvrzení prezentuje studie, jež hodnotila novorozená mláďata potkanů, která byla v perinatálním období podrobena kosmickému letu, díky čemuž se u nich, oproti kontrolní skupině, projeví změny ve funkci vestibulárního systému (v případě odstranění taktilní a proprioceptivní stimulace). (Ronca, 2008) Geisler a spolupracovníci zase prokázali, že vestibulární deprivace v raném postnatálním stádiu (konkrétně z 5. postnatálního dne života) ovlivňuje motorický vývoj, zejména neoptimální stabilizaci trupu. Hlavním trvalým účinkem bilaterální vestibulární deprivace je oscilace hlavy během pohybu. (Geisler, 1997)

Pohyb lze schematicky rozdělit na dvě složky – fázickou složku, zodpovědnou za rytmické střídavé kontrakce končetin a svalstva trupu a složku tonickou, zastoupenou zejména posturálním svalstvem. (Vinay et al., 2005). Pozorování několika autorů dokládá, že fázická složka je při narození funkční, naopak tonická složka je poměrně nezralá a k jejímu dozrávání dochází postnatálně, významně již v prvním týdnu života potkana. (Altman et al., 1975, Vinay et al., 2005). Mendez-Gallardo et al. se shodují na tom, že vyjádření motorických vzorů je limitováno právě nedostatkem posturální kontroly a její vývoj je základem pro realizování složitější lokomoce. (Mendez-Gallardo et al., 2016) Tento vývoj závisí na zrání několika systémů (muskuloskeletální systém, senzomotorický systém, vyšší centra mozku, některé descendentní i ascendentní dráhy). (Vinay et al., 2005) Kromě toho záznamy elektromyografie (EMG) u novorozených potkanů naznačují, že rovněž svaly zrají a vytvářejí silnější spojení do druhého postnatálního týdne. Například motoneurony, které inervují extenzory hlezna, jsou při narození méně zralé než motoneurony inervující flexory. (Mendez-Gallardo et al., 2016)

Vzájemné postavení hlavy, trupu a končetin jsou společně s orientací těla v prostoru hlavními aspekty postury. Kvalitní postura je poté nezbytným předpokladem efektivního pohybu. (Geisler et al., 1993) Podle Altmana a Sudarshana (1975) lze vývoj postnatální lokomoce u potkana rozdělit do tří fází, respektive tří týdnů. Dominantním prvkem prvního týdne je pivotování, jež v druhém týdnu

postupně přechází do nejisté a pomalé chůze, která v průběhu třetího týdne dozraje a současně si zvíře osvojí i běh. V následujícím textu je postnatální vývoj potkana popsán podrobněji.

Altman a Sudarshan ve své studii, kdy pozorovali motorický vývoj potkanů ode dne narození (P0) do 21. dne života (P21), udávají, že novorozené mládě je v open fieldu většinu času bez pohybu, jeho končetiny jsou extendované a mají nižší svalový tonus. Úkolem končetin je v tomto stádiu vývoje zejména laterální podpora trupu. Tato funkce se však rychle mění, jelikož již od prvního dne dochází k postupné elevaci ramenních pletenců, které jsou na konci prvního týdne života zvednuta průměrně polovinu času. S elevací ramen je spojeno zrání horních končetin, které postupně začínají nést váhu přední části těla, zpočátku na loktech a spodní části paže a od uplynutí prvního týdne života již distálněji na tlapkách a jednotlivých prstech. Hlava je během prvního týdne života zvednuta jen zřídka, zvyšuje se sice frekvence laterálních pohybů hlavy, ale hlava zůstává v kontaktu s podložkou. (Altman, Sudarshan, 1975) Zadní končetiny nejsou koncem prvního týdne života ještě dostatečně zralé, aby unesly váhu pánve, avšak i u nich dochází v prvním týdnu k postupnému vývoji opěrné funkce. Tento fakt dokládá například práce Brocarda et al., při které byla pozorovaná zvířata v prvním týdnu života opakovaně umístěna na šikmou plošinu (sklon 45°) a vědci hodnotili extenzi zadních končetin. Ta se již během prvního týdne života výrazně vyvíjela, co do kvantity i kvality zapojení svalů a umožňovala zvířatům stabilizaci v této poloze. Pozorování také ukázalo, že zapojení extenzorů u novorozených zvířat (P0) se, pokud je vůbec přítomno, týká zejména kyčelních kloubů a postupně se rozšiřuje na kolenní i hlezenní kloub. Tato skutečnost je v souladu s tvrzením, že motorický vývoj končetin běží v proximodistálním směru. (Altman, Sudarshan, 1975; Brocard et al., 1999)

Lokomoční pohyb v prvním týdnu, jak bylo uvedeno výše, reprezentuje tzv. pivoting. Předpokladem pro pivotování je schopnost pohybu předních končetin, který se objevuje mezi 4. a 5. dnem života. Přední končetiny v podstatě působí jako pádla – zvířata se široce ohání, lehce se odrážejí pomocí lateroventrálních ploch tlapek, čímž produkují minimální pohon. Jelikož zadní končetiny ještě nejsou schopny pohyb předních končetin podpořit a zůstávají povětšinou ležet na podložce, dochází v pronační pozici k otáčení celého těla. (Altman, Sudarshan, 1975)

Od počátku druhého týdne zvíře zvedá hlavu a postupem času se prodlužuje doba, po kterou hlavu udrží zvednutou. Od 9. dne často nese přední část těla s hlavou směřující nahoru s typickou „čichací reakcí“ a od 12. dne je mládě schopno zvednout jednu přední končetinu od země, aniž by ztratilo rovnováhu. Rovněž během druhého týdne života dochází k náhlému zrychlení vývoje zadních končetin. Vývoj opět běží proximodistálně, pletenec dolní končetiny tedy dosáhne své funkce dříve

než distální části. Podpora tlapek a prstů je prvně viditelná 10. až 12. den a 15. den jsou již všechna mláďata schopna udržet celé své tělo zvednuté proti gravitaci. (Altman, Sudarshan, 1975)

Druhý týden lokomočního vývoje potkana lze charakterizovat pojmem crawling, česky plazení či lezení. Tento lokomoční pohyb vychází z pivotování postupným zapojováním zadních končetin, jež začínou rovněž vytvářet určitý pohon. Nejprve „pádají“ obdobně jako přední končetiny v prvním týdnu života a mláďe se plazí. Zpočátku není zapojení předních a zadních končetin vždy koordinované, zadní končetiny občas nestačí držet krok s předními a jsou taženy v extendované poloze se spodními částmi tlapek směřujícími vzhůru. Kolem 11. dne života začne zvíře pokládat zadní tlapy s roztaženými prsty na zem, tím se zlepší opora a může se postupně začít rozvíjet kvadrupedální chůze se vzpřímeným trupem. Chůze je zpočátku opět nezralá, zadní končetiny ještě nejsou schopny dlouhodobě držet krok s hbitými předními končetinami, často uklouznou a jsou vlečeny v neobratné pozici. (Altman, Sudarshan, 1975) S počátkem lokomoce se všechny čtyři končetiny přibližují k podélné ose těla a opěrná báze se zužuje. (Lelard et al., 2006)

Jak vyplývá z předcházejícího textu, začátkem třetího týdne již všechna zvířata drží hlavu zvednutou od země, končetiny jsou schopné kvalitní opěrné i fázické funkce a trup je vzpřímen. Současně od konce druhého týdne mají mláďata otevřené oči a dostává se jim dalších senzoryckých podnětů pomocí zraku. To dohromady vede k tomu, že zvířata v této době chodí již v téměř normálním vzoru, občas pouze s přehnaným zvedáním zadních končetin. Postupně se chůze zdokonaluje a zrychluje, již 16. den je zvíře schopno běhu. (Altman, Sudarshan, 1975) Zatímco v klidu má tvar páteře potkana v sagitální rovině tvar písmene S, při běhu se páteř v celé své délce extenduje, čímž se trup stabilizuje. (Lelard, 2006) Zrání senzomotorického systému však ještě není zcela ukončeno, jelikož dle studie Altmana a Sudarshana 19. a 20. den stále není dosaženo plně asymptomatické úrovně chůze v případě, že drsný povrch v open fieldu je nahrazen hladkým. (Altman, Sudarshan, 1975) Dle Shriner je chůze dospělého jedince dosaženo mezi P27 a P30, kdy ještě dochází k zužování opěrné báze. Během života potkana se báze obvykle rozšiřuje v případě ohrožení posturální stability. (Shriner et al., 2009) Clarke při své studii na potkanech (190 – 210 g) zjistil, že při průměrně rychlé chůzi je doba kontaktu předních končetin s podložkou asi 4 x delší, než trvání kontaktu zadních končetin. To značí, že přední končetiny se významně uplatňují v získávání taktilních informací z terénu. (Clarke, 1995)

Na rozdíl od člověka má potkan k dispozici ocas, jež využívá zejména jako stabilizační prvek. 7. až 10. den začíná potkan ocas vzpřímovat během chůze a později je stabilně nesen lehce nad podložkou (mezi 11. a 18. dnem života). Při ztrátě rovnováhy se zvíře snaží zlepšit stabilitu pomocí aktivního švihnutí ocasem. (Shriner et al., 2009)

1.4.1.2 Vývoj sensorických systémů

Protože vývoj sensorických systémů jde ruku v ruce s vývojem motoriky, jsou již některé informace obsaženy v předešlé kapitole. Zde se pokusím přehledně shrnout základní milníky sensorického vývoje.

Pro kvalitní posturu a prostorovou orientaci je nutný sensorický systém. V době jeho nezralosti nebo při jeho poškození dochází k nekompletní či neefektivní koordinaci. Pro udržení stability jsou zpracovávány a vyhodnocovány aferentní informace vizuální, propioceptivní a vestibulární. Finální podoba sensorických systémů je přítomna koncem třetího postnatálního týdne (Brocard et al., 1999). Čerstvě narozené mládě potkana má k dispozici pouze olfaktorický systém, chuť, vestibulární aparát a zčásti propiocepci (Clarac et al., 1998). Funkce žádného ze sensorických systémů přítomných po narození však není plně vyztárá. V rámci každé modality mláďata postupně reagují na větší rozsah podnětů, jsou citlivější na nižší intenzitu stimulace a úroveň zpracování podnětů se zvyšuje. (Whishaw, 2004) Olfaktorický systém funguje již v období prenatálním, ale po narození není ještě zcela vyvinutý. Drobné rozdíly pachů zvládají odlišit až dospělá zvířata, která již mají dostatek granulárních buněk. Obdobně je na tom rovněž ústrojí chuťové. (Calamandrei, 2004; Clarac et al., 1998, Wood et al., 2003) Počátek vývoje vestibulárního aparátu, vestibulárních jader a příslušných drah aferentních i eferentních je datován do 8. dne gestačního věku potkana. Po narození jsou reakce vestibulárního systému omezeny jak neúplnou zralostí samotného systému, tak především nezralostí systému hybného. Vestibulární aparát plně dozraje 2 až 4 týdny po narození. (Altman, Sudarshan, 1975; Brocard et al., 1999; Clarac et al., 1998)

Co se týče sluchu, zevní zvukovody jsou po narození uzavřeny a otevírají se 12. den postnatálního vývoje. Od té doby je sluch plně funkční. (Clarac et al., 1998)

Jak vyplývá z výše uvedeného, mládě je po narození téměř slepé, rozlišuje jen světlo a tmou, oční štěrby jsou uzavřeny a k otevření dochází 14. postnatální den, kdy potkan zachycuje první zrakové vjemy. Do té doby je schopen rozlišovat jen mezi světlem a tmou. (Altman, Sudarshan, 1975)

Již od P0 lze vyvolat monosynaptický napínací reflex, dle Brocarda je přítomný již 1 či 2 dny před narozením. (Brocard et al., 1999; Clarac et al., 1998) Proprioceptory a s nimi i napínací reflex se postnatálně nadále vyvíjí, kupříkladu svalová vřeténka jsou plně zralá 12. den po narození. (Muir,

2000) Kožní receptory jsou po narození také vyvinuty, avšak spoje mezi aferentními vlákny a centrálními neurony nejsou dosud zcela zralé. (Brocard et al., 1999)

Závěrem je nutné konstatovat, že vzájemné porovnávání vývoje potkana a člověka je sice možné, avšak je nutné mít na paměti, že u člověka vývoj sensoriky předchází vývoji motoriky, kdežto u potkanů je vývoj sensorických funkcí (např. zrak a sluch) pomalejší. (Velíšek, 1992)

1.4.1.3 Vývoj nervového systému

Nervový systém je v perinatálním období u potkana méně zralý, než ve shodném období u člověka. (Gramsbergen, 1998) Během prvních 3 týdnů života potkana dochází k rychlému vývoji jeho nervového systému. Obecně vývoj motorických dovedností následuje rostrokaudální gradient zrání mozkové kůry. Proto ústa a horní končetiny dozrávají časněji, než kaudálně uložené dolní končetiny. (Whishaw, 2004) Díky tomu, že je podrobně popsán vývoj motorického systému, lze vyhodnotit, zda některé vnitřní či zevní vlivy mají vliv na další neuronální vývoj a posléze i na vývoj motorický. (Calamandrei, 2004). V rámci postupného zrání CNS se v ontogenezi objevuje několik kritických etap, které jsou charakterizovány zvýšenou náchylností k poškození. Jedná se zejména o změny ve vývoji axonálních a dendritických větví, utváření synapsí, vývoji receptorů, iontových kanálů aj. (Clarac et al., 1998)

K dozrávání jednotlivých nervových struktur dochází postupně. Týden před narozením dozrávají první descendentní dráhy mezi mozkovým kmenem a míchou. Retikulární dráhy dosahují lumbální oblasti mezi 15. až 18. embryonálním dnem. V podobnou dobu dorůstá rovněž dráha vestibulospinální. Dráha rubrospinální je vyvinuta v den narození. Dráhy předních provazců dozrávají během prvního týdne po narození, kortikospinální dráha dosahuje bederní míchy 6. postnatální den. (Clarac et al., 2004)

Počátek neurogeneze ve většině kortikálních a subkortikálních oblastech je u potkana datován do 9. embryonálního dne a pokračuje do 15. dne postnatálního. U lidí probíhá kortikální neurogeneze převážně během gestace, ale může pokračovat až do 2,5 roku věku. (Semple, 2013) Kromě tvorby nových neuronů a jejich diferenciaci dochází v CNS také k synaptogenezi a myelinizaci.

Synaptogeneze se týká biochemických a morfologických změn, které umožňují tvorbu synapsí mezi neurony. U savčích druhů dochází nejdříve k nadměrnému větvení dendritů a axonů, jež jsou následně redukovány těsně před narozením o přibližně polovinu. Později, kolem puberty, dochází k další redukci buněčných spojů. Tyto synaptické změny se vyskytují bez významné ztráty neuronů

a jde o mechanismus umožňující efektivnější zpracování informací, který je společný pro většinu savců. (Andersen, 2003)

Myelinizace, neboli obalení axonů nervových buněk buňkami oligodendrogliovými a tvorba myelinu, je nezbytná pro šíření a rychlost přenosu vzruchů v savčím CNS. Proces myelinizace je postupný a v určitých oblastech mozku postupuje až do období dospívání. Začíná v periferním nervovém systému, mozkové kmeni a míše. V mozku postupuje kranálně a ventrálně (od laloku okcipitálního k čelním). Hlavním efektem myelinizace a zrychlení postupu akčních potenciálů po axonech je kompenzace prodlužování periferních nervů oři růstu jedince (Semple, 2013)

Podstatný rozdíl mezi lidským mozkiem a mozkiem potkana je ve velikosti a tvaru neokortexu. Mozková kůra potkanů je hladká (lisencefalická) a část označovaná jako neokortex je relativně malá. Naproti tomu lidský neokortex je významně větší a vyznačuje se gyrifikací (gyrencefalický mozek). Obecně mozková kůra potkana dosáhne 90 % své cílové hmotnosti 20. postnatální den. Člověk tohoto procentuálního vyjádření dosáhne mezi 2. a 3. rokem života. (Semple, 2013) Kognitivní schopnosti potkanů se rychle rozvíjejí během prvních 3 týdnů života a v mnohých situacích vykazují v době odstavu kognitivní asociace na úrovni dospělého zvířete. (Whishaw, 2004)

1.4.1.4 Pohlavní vývoj

Domestikovaná novorozená mláďata váží kolem 7 g a jsou plně závislá na péči matky. Počínaje 5. dnem života startuje růst srsti, 10. den je již celé mládě pokryto srstí, ačkoli plně vyvinutý dospělý typ srsti můžeme pozorovat až kolem 3. týdne života.

Mláďata jsou ihned po narození kojena. Kontakt nutný pro kojení je realizován za pomoci olfaktorického systému, to značí například fakt, že anosmická mláďata kojena nejsou. Ve velmi blízkém kontaktu s tělem matky setrvávají mláďata od P0 do P15. V přírodních podmínkách v brzkém věku mláďata nepřijímají mateřské mléko do pocitu sytosti, nýbrž spotřebují veškeré mléko, které je dostupné. Ve volné přírodě přestávají mláďata potkana přijímat mateřské mléko po 14 až 34 dnech po narození a toto jednání značí dosažení nezávislosti. V chovech a v laboratorních podmínkách jsou mláďata odstavována 21. den života. (Whishaw, 2004)

V tomto období musí být zvíře schopné zejména vyhnout se predátorům a nalézt potravu. Jde rovněž o počáteční období sexuálního zrání, které je u samic dokončeno mezi 32. a 34. dnem a u samců mezi 45. a 48. dnem. K páření dochází prvně kolem 41. až 45. postnatálního dne života. Dozrání sexuálního systému značí nástup adolescentního období. Toto období je charakteristické také

tím, že zvířata zvýšeně riskují a četnost bojů mezi sourozenci, jako formy sociální hry, dosahuje svého vrcholu. Jako dospělé lze zvíře označit po 8. týdnu života. (McCutcheon 2009; Whishaw, 2004)

1.4.2 Behaviorální studie

Behaviorální studie jsou jednou z možností vyšetřování změn v mozku po jeho poranění či po vystavení se chemickým látkám. Při hledání odchylek je vždy nutné znát normální vývoj a prvky chování, tzn. mít normu, podle které se lze řídit. V laboratorních podmínkách jsou studovány oblasti chování, které zahrnují senzomotorické zpracování, spontánní aktivitu, lokomoci, emocionalitu, učení, paměť a sociální i mateřské chování. (Valeš, Kubík, 2011) V této diplomové práci se zabývám především motorickým vývojem a jeho případným ovlivněním chemickou látkou.

2 CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda má opakované podání (ve věku P7 – P11) antagonisty AMPA receptoru vliv na vývoj motoriky laboratorního potkana. Byla použita látka s názvem IEM 1460, jež by mohla být věkově specifickým antiepileptikem využitelným v budoucnu v léčbě epilepsie u dětských pacientů.

Hypotézy jsme stanovili následovně.

H01: Látka IEM 1460 ovlivní spontánní lokomoci (testovanou v open fieldu).

HA1: Látka IEM 1460 neovlivní spontánní lokomoci.

H02: Látka IEM 1460 ovlivní motorickou výkonnost.

HA2: Látka IEM 1460 neovlivní motorickou výkonnost.

H03: Účinek IEM 1460 na motoriku je výraznější u mladších zvířat.

HA3: Účinek IEM 1460 na motoriku není výraznější u mladších zvířat.

3 METODIKA

3.1 Metodika výzkumné části práce

Pro výzkum bylo použito 30 mládřat potkana (samců) kmene Wistar. Zvířata pocházela z chovu Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Mládřata byla rozdělena do 3 skupin, kde 10 zvířat tvořilo kontrolní skupinu, které byl aplikován fyziologický roztok, 10 zvířat dostalo dávku 3 mg/kg látky IEM 1460 a 10 zvířat dávku 10 mg/kg IEM 1460. V každém testovaném vrhu deseti zvířat byly zastoupeny všechny tři zmíněné skupiny. Látky byly mládřatům aplikovány opakovaně v pěti po sobě následujících dnech (P7 až P11). IEM 1460 rozpouštěná ve vodě v koncentraci 5 mg/1 ml byla podávána intraperitoneálně v dávce 3 nebo 10 mg/kg. Kontrolní zvířata dostávala fyziologický roztok v objemu odpovídajícím vyšší dávce IEM 1460, t.j. 2 ml/kg. Injekce byly podávány vždy ve stejnou denní dobu, aby byl zachován rozestup 24 hodin mezi jednotlivými aplikacemi. Zvířata byla opakovaně testována ve věku P12, P15, P18, P21, P25, P31 a P60. Během testování byla zvířata umístěna v behaviorální laboratoři ve standartní kleci společně s matkou a sourozenci (ve věku P12, P15, P18 a P21) či pouze se sourozenci (ve věku P25, P31 a P60). Ve zbylé době, mimo testování, byla zvířata umístěna ve zvěřinci se stálou teplotou 24°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), relativní vlhkostí vzduchu 60 % ($\pm 5\%$) a střídáním světla a tmy po 12 hodinách. Voda a potrava byla zvířatům k dispozici ad libitum, vyjma doby testování.

3.1.1 Testování

Testování probíhalo vždy ve stejnou denní dobu v 7 vybraných postnatálních dnech věku zvířat (P12, P15, P18, P21, P25, P31 a P60). Vybrali jsme řadu testů, přičemž ne všechny vybrané testy bylo možné použít v každém věku zvířete (výběr zohledňuje aktuální stupeň vývoje). Jmenovitě se jedná o následující testy – open field, righting reflex, negativní geotaxe, horizontální hrazda, svislý žebřík, pravidelný a nepravidelný horizontální žebřík a rotarod test. Poměrně široká škála testů

umožňuje zachytit různé aspekty motorického chování zvířete. Jednotlivé testy budou popsány podrobněji, viz dále.

Analýza pohybu je jedním z hlavních aspektů vyšetřování chování. Pozorováním a analýzou některých pohybů můžeme posoudit poškození pohybového ústrojí, poškození mozku, vliv léku na pohyb a další. (Obradovic et al., 2013)

	Open field	Righting reflex	Negativní geotaxe	Bar holding	Svislý žebřík	Pravidelný horizontální žebřík	Nepravidelný horizontální žebřík	Rotarod
P12	+	+	+	+				
P15	+	+	+	+	+			
P18	+	+		+	+			
P21	+	+		+		+	+	
P25	+	+		+		+	+	
P31	+	+		+		+	+	
P60	+	+		+		+	+	+

Tabulka 1. Použité testy u jednotlivých věkových skupin (zdroj: vlastní)

3.1.1.1 Open field (OF)

Testování v open fieldu s následným zhodnocením je považováno za nejjednodušší test pro hodnocení spontánní motoriky. (Brooks, Dunnet, 2009) Existuje mnoho druhů arén vhodných k testování hlodavců. Pro tuto diplomovou práci byla zvolena čtvercová aréna o rozměrech 50 × 50 cm a výšce stěn 25 cm. Zvířata byla umístěna doprostřed arény a poté se mohla volně pohybovat. Jejich měřený pobyt v aréně trval 5 minut a mezi jednotlivými zvířaty byla aréna vždy vyčištěna, aby nebyly přítomny pachové stopy. Všechna zvířata byla nahrávána na kameru. Záznamy byly poté vyhodnoceny pomocí programu EthoVision®. K vyhodnocení byly vybrány celkem tři parametry, jmenovitě průměrná rychlost pohybu potkana, vzdálenost, jež během pobytu v OF uběhl a čas, strávený v centru arény. Motorický pohyb jsme tedy hodnotili výhradně kvantitativně. Dle výsledků lze poté posuzovat spontánní motorický projev, průzkumné úsilí zvířete a míru anxiety, což spolu vzájemně úzce souvisí. Pro možnost hodnocení výše zmíněného je nutné znát fyziologický projev zvířete v OF. Po vložení zvířete do středu open fieldu dojde typicky k následujícímu – zvíře

běží ke stěně, prozkoumává prostor po obvodu arény, po určité době se adaptuje na nové prostředí a sníží se míra jeho úzkosti, díky čemuž se odváží vydat zpět do centra arény. (Brooks, Dunnet, 2009)

3.1.1.2 Righting test

Righting test spolu s testem negativní geotaxe podávají, pomocí projevů motoriky, informace o stupni a stavu vývoje nervové soustavy. Dle Woodworthové jsou řazeny mezi tzv. neurologické testy. (Woodworth et al., 2011)

Při testování tohoto reflexu se zvíře položí na podložku do supinační pozice a měří se čas, za který se přetočí do pozice pronační. Pomocí tohoto testu hodnotíme vzpřimovací mechanismy, které jsou u potkana přítomny ihned po narození a v prvních dnech postnatálního období se dále vyvíjejí. Co do rychlosti reakce nedochází během vývoje k výrazným změnám, mění se však kvalitativní provedení otočky. V prvních několika postnatálních dnech života iniciuje přetočení těla rotace hlavy, později, asi ve věku P13 se mládě točí pomocí všech končetin. Schopnost koordinované otočky těla souvisí s dosažením zralého vzoru stoje a chůze. (Altman, Sudarshan, 1975)

3.1.1.3 Negativní geotaxe

K provedení testu negativní geotaxe je zapotřebí nakloněná rovina, typicky s úhlem sklonu 25°. Při testu je zvíře položeno na nakloněnou rovinu hlavou dolů a měří se čas, za který se zvíře otočí o 180° tak, aby hlava byla výše než tělo. Tento test jsme využili pouze u mláďat ve věku P12 a P15, jelikož starší zvířata z nakloněné roviny utíkala pryč a nebylo možné test provést.

3.1.1.4 Bar holding test

Při tomto testu je potkan zavěšen za přední končetiny na vodorovnou dřevěnou tyč o průměru 10 mm. Výška horizontální hrazdy činí 27 cm. Pod hrazdou je umístěna nádoba s molitanem, aby nedošlo ke zranění zvířat. Test hodnotí převážně svalovou sílu předních končetin, tedy jak dlouho je

zvíře schopno se na hrazdě udržet, eventuálně zda se dokáže za pomoci zejména zadních končetin, ale v podstatě celého těla, dostat nahoru na hrazdu. Časový limit pro tento test byl 60 sekund.

Dle Altmana a Sudarshana jsou některá zvířata schopná se poprvé vyhoupnout na hrazdu 11. postnatální den života. U všech jedinců se tato dovednost objevuje ve věku P21. (Altman, Sudarshan, 1975)

3.1.1.5 Svislý žebřík

Provedení tohoto testu spočívá v umístění zvířete na začátek svislého žebříku (spodní část) a měření času, za který zvíře vyleze nahoru na jeho konec. Na horní části žebříku se nachází plošina, kde byla během testování umístěna plastová nádoba s minimálně dvěma sourozenci pro zvýšení motivace testovaného zvířete. Časový limit pro splnění testu byl opět 60 sekund.

3.1.1.6 Horizontální žebřík

Chůze, eventuálně běh, po horizontálním žebříku testuje koordinaci předních a zadních končetin. Tento test jsme zařadili u zvířat ve věku P21 a starších, jelikož pro jeho zvládnutí je nutná zraková kontrola a aktivita kortikospinálních a rubrospinalních drah, jež dozrávají mezi 15. až 18. postnatálním dnem života. (Cummings et al., 2007; Muir, 2000).

Test chůze na horizontálním žebříku obvykle obsahuje dvě varianty, chůzi po žebříku pravidelném a nepravidelném. V této diplomové práci byly využity obě varianty. Žebříky byly dlouhé 90 cm s rozstupem příček 2 cm u pravidelného žebříku a 1 – 4 cm u žebříku nepravidelného. Testování probíhalo nejdříve na žebříku pravidelném a poté na nepravidelném. Z tohoto důvodu je výsledek na nepravidelném žebříku obvykle lepší, tj. kratší čas a méně chyb, přestože nepravidelný žebřík klade na koordinaci pohybu vyšší nároky.

Horizontální žebřík obklopují 2 stěny z plexiskla, jejichž vzdálenost lze regulovat dle aktuální velikosti zvířat. Je vhodné, aby šířka průchodu odpovídala velikosti zvířat, a ta se během testu neměla tendenci na žebříku otáčet. I přes toto opatření se zvířeti někdy podaří směr změnit nebo se zastavit a pokus v daném časovém limitu nedokončí.

Test probíhá následujícím způsobem. Mládě je vloženo na začátek žebříku, na jehož konci je umístěna nádoba se sourozenci za účelem zvýšené motivace zvířete žebřík přejít a dostat se tak k sourozencům. Měří se doba, za kterou zvíře žebřík přejde a počet chyb, které během chůze udělá.

Za chybu je považováno prošlápnutí tlapkou do prázdna, tj. mimo příčky žebříku nebo sklouznutí končetiny pod úroveň příček. Maximální čas, vyhrazený pro splnění testu, je 60 sekund.

3.1.1.7 Chůze na rotarodu

Rotarod je zařízení, jehož základním prvkem je rotující válec s protiskluzovou úpravou a nastavitelnou rychlostí rotace. Zvíře, umístěné na toto zařízení, je nuceno se neustále pohybovat směrem vpřed, aby z válce nespadlo. Je měřen čas, jak dlouho se zvíře na válci udrží. Pro tento test jsme opět vyhradili maximální čas testování 60 sekund. Každé zvíře absolvovalo test ve dvou variantách – při rychlostech 15 otáček/min a 20 otáček/min.

3.1.2 Statistické zpracování dat

Data získaná při testování provokované motoriky byla podrobena statistické analýze pomocí softwaru SigmaStat®. Video záznamy testu Open field byly nejprve hodnoceny v programu EthoVision® a vzešlá data byla posléze rovněž zpracována programem SigmaStat®. Pro srovnávání kontrol a skupin se dvěma dávkami byla použita jednosměrná analýza rozptylu – one way ANOVA. Pro hodnocení vývojových změn byla použita ANOVA pro opakované měření (RM ANOVA). V obou případech jsme následně srovnávali rozdíly mezi dvěma skupinami pomocí Holm-Sidakova testu. Hladina statistické významnosti byla stanovena na 5 % ($P < 0,05$). Veškerá statistická data byla následně graficky zpracována v programu SigmaPlot®.

4 VÝSLEDKY

Možné účinky látky IEM1460 jsou znázorněny vždy na barevných grafech (dvě dávky jsou odlišeny různou intenzitou barev). Šedivé grafy znázorňují výsledky, které nebyly prvotním účelem naší studie a pouze potvrzují vývoj motoriky popsany již v předcházejících diplomových pracích. Proto nejsou vyznačeny signifikantní rozdíly.

4.1 Open field test

Smyslem tohoto testu je zaznamenat a posléze vyhodnotit spontánní motoriku zvířete a hodnotit rovněž míru jeho úzkosti. Pro zvíře je přirozené vyhnout se jasně osvětlenému středu arény, na druhou stranu však má tendenci prozkoumávat nové prostředí. (Gates et al., 2011) Test Open field jsme prováděli u všech věkových skupin (P12, P15, P18, P21, P25, P31, P60). V testu jsme hodnotili následující parametry – průměrnou rychlost pohybu, vzdálenost, jež zvíře uběhlo, počet návštěv středu arény a čas strávený ve středu arény.

4.1.1 Průměrná rychlost pohybu

Při srovnání skupin dle dávky nalézáme signifikantní rozdíl oproti kontrolám u mláďat ve věku P21 pro obě skupiny (s dávkou 3 mg/kg i 10 mg/kg) a P25 u mláďat s dávkou 3 mg/kg látky. V těchto případech je průměrná dosažená rychlost zvířat výrazně nižší. (obrázek 5) Při srovnání skupin dle věku očekáváme se zvyšujícím se věkem i zvyšující se průměrnou rychlost. To však, dle našich výsledků, ne zcela platí. Vymyká se především, již zmiňovaná, skupina s dávkou 3 mg/kg, u které na grafickém zpracování nepozorujeme lineární nárůst rychlosti se zvyšujícím se věkem. (obrázek 6)

Konkrétní naměřené hodnoty jsou pro úplnost rozepsány v následujících odstavcích. Tímto způsobem budou popsány i následující testy, viz dále. Průměrná rychlost je zaznamenána v jednotkách cm/s.

P12: průměrná rychlost kontrolních mláďat dosáhla hodnoty $2,929 \pm 0,672$ cm/s, rychlost mláďat s dávkou 3 mg/kg byla průměrně $3,756 \pm 0,736$ cm/s a skupina s dávkou 10 mg/kg dosáhla hodnoty $1,821 \pm 0,407$ cm/s. Přesto, že u mláďat s dávkou 10 mg/kg vidíme tendenci k pomalejšímu pohybu při spontánní motorice, díky poměrně velkým středním chybám průměru nezaznamenáváme signifikantní rozdíl.

P15: průměr kontrol této věkové kategorie činil $3,111 \pm 0,588$ cm/s, u mláďat s dávkou látky IEM 1460 3 mg/kg byla průměrná rychlost $4,645 \pm 0,842$ cm/s, a u skupiny s dávkou 10 mg/kg jsme vypočítali průměrnou rychlost $3,379 \pm 0,765$ cm/s.

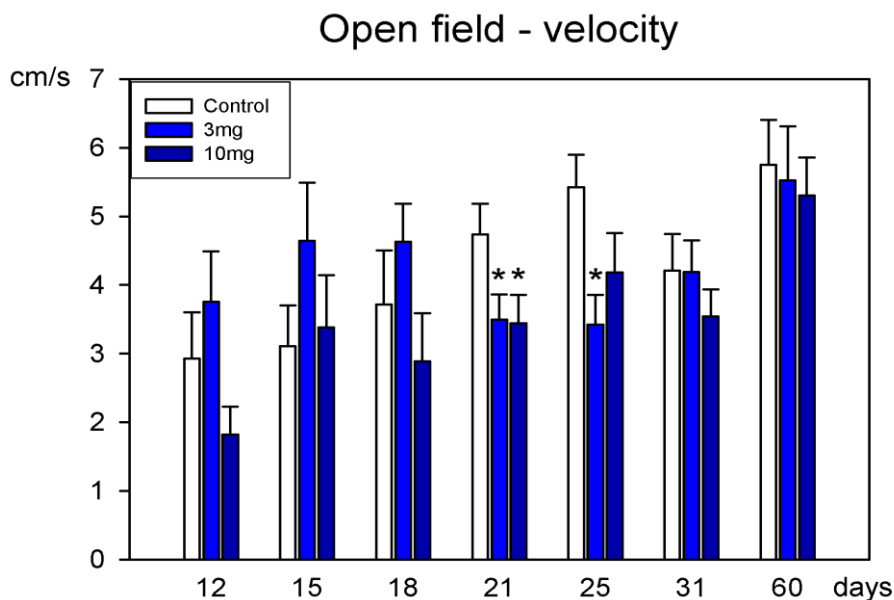
P18: v této věkové kategorii dosáhla kontrolní skupina rychlosti v průměru $3,716 \pm 0,787$ cm/s, skupina s dávkou 3 mg/kg $4,628 \pm 0,553$ cm/s a poslední skupina s dávkou 10 mg/kg $2,886 \pm 0,704$ cm/s. Stejně jako u mláďat ve věku P12 a P15 zde vidíme tendenci skupiny s dávkou 3 mg/kg k rychlejšímu pohybu oproti kontrolní skupině.

P21: kontrolní skupina měla průměrnou rychlost pohybu v Open fieldu $4,738 \pm 0,444$ cm/s, průměr skupiny s dávkou 3 mg/kg byl $3,495 \pm 0,367$ cm/s a průměr skupiny 10 mg/kg $3,443 \pm 0,415$ cm/s.

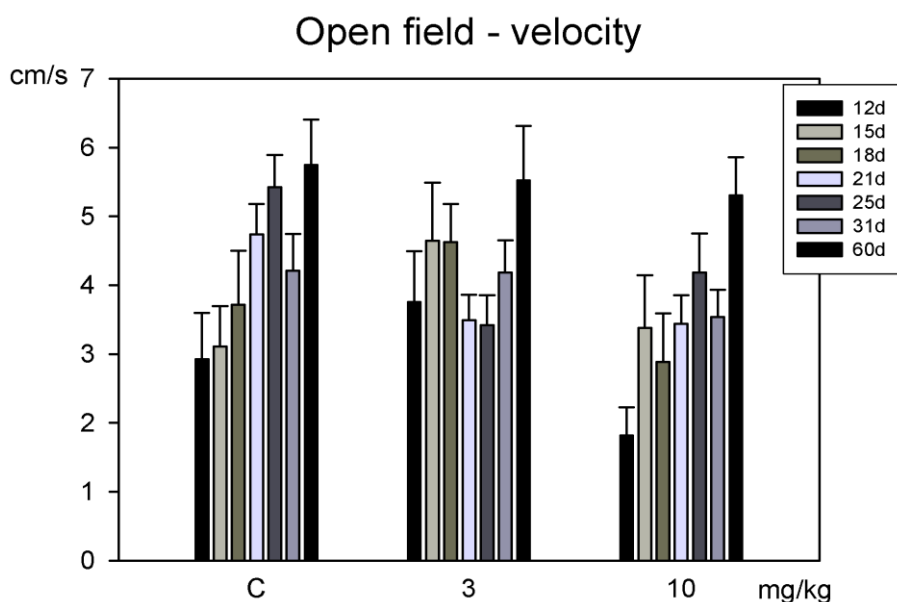
P25: kontrolní skupina dosáhla rychlosti $5,421 \pm 0,474$ cm/s, skupina s dávkou 3 mg/kg měla průměrnou rychlost $3,423 \pm 0,432$ cm/s a průměrná rychlost zvířat s dávkou 10 mg/kg byla $4,184 \pm 0,571$ cm/s.

P31: výsledky předposlední věkové kategorie jsou následující – kontroly $4,210 \pm 0,536$ cm/s, 3mg/kg $4,187 \pm 0,462$ cm/s a 10 mg/kg $3,540 \pm 0,395$ cm/s.

P60: průměrná rychlost kontrolních zvířat u 60denních zvířat je $5,749 \pm 0,655$ cm/s. Zvířata s dávkou 3 mg/kg se pohybovala rychlostí $5,523 \pm 0,791$ cm/s a zvířata s dávkou 10 mg/kg rychlostí $5,302 \pm 0,555$ cm/s. U této věkové kategorie zaznamenáváme obdobné výsledky mezi jednotlivými skupinami (kontroly, 3 mg/kg, 10 mg/kg).



Obrázek 5. Průměrná rychlost pohybu v testu Open field. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek. Hvězdičky značí statistický rozdíl proti kontrolám.



Obrázek 6. Průměrná rychlost pohybu v testu Open fieldu. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.1.2 Uběhnutá vzdálenost

Při srovnání skupin dle dávky vidíme u zvířat ve věku P21 a P25 významnou podobnost s grafem „velocity“. (obrázek 5) Stejně jako u průměrné rychlosti, nalézáme opět signifikantní rozdíl oproti kontrolám u mláďat ve věku P21 pro obě skupiny (s dávkou 3 mg/kg i 10 mg/kg) a ve věku P25 u mláďat s dávkou 3 mg/kg látky ve smyslu dosažení kratší vzdálenosti. (obrázek 7) Zajímavé

je, že uběhnutá vzdálenost mláďat od věku P12 až do P18 je téměř stabilní, bez očekávaného nárůstu, což je viditelné zejména u skupiny s dávkou 10 mg/kg, kde hodnota dosažené vzdálenosti osciluje kolem 500 cm. (obrázek 7, obrázek 8) Další zajímavostí je skokový nárůst vzdálenosti u kontrolní skupiny mezi věkem P18 a P21, který dosahuje přibližně 600 cm. (obrázek 7) I s ohledem na rychlost pohybu se, dle našich výsledků, jeví jako nejaktivnější mláďata kontrolní skupiny ve věku P25. Uběhnutá vzdálenost je zaznamenána v centimetrech.

P12: kontrolní mláďata dosáhla průměrné vzdálenosti $760,884 \pm 178,654$ cm, zaznamenaná vzdálenost skupiny s dávkou 3 mg/kg byla $933,021 \pm 187,202$ cm a skupiny s dávkou 10 mg/kg $518,927 \pm 113,951$ cm.

P15: mláďata této věkové kategorie dosáhla následujících výsledků – kontroly $678,996 \pm 95,457$ cm, 3 mg/kg $881,813 \pm 113,064$ cm a 10 mg/kg $504,505 \pm 117,972$ cm.

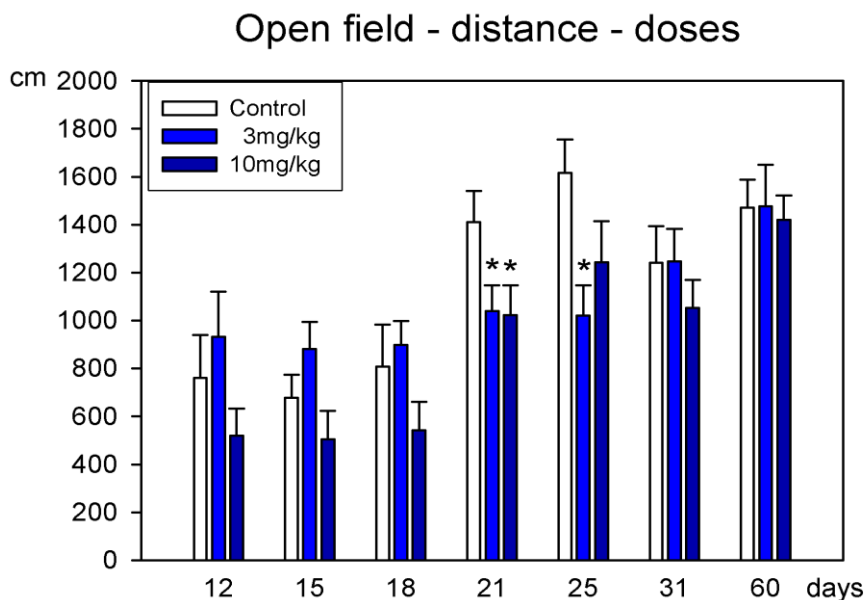
P18: kontroly zdolaly průměrnou vzdálenost $808,713 \pm 174,420$ cm, mláďata s dávkou 3 mg/kg $899,108 \pm 113,064$ cm a mláďata s dávkou 10 mg/kg uběhla $542,077 \pm 119,979$ cm.

P21: vzdálenost uběhnutá kontrolní skupinou byla $1410,433 \pm 130,84$ cm. Průměrné vzdálenosti skupin s aplikovanou látkou IEM 1460 byly nižší, a byl zde popsán signifikantní rozdíl, viz výše. Konkrétně zvířata s dávkou 3 mg/kg uběhla $1039,045 \pm 107,291$ cm a zvířata s dávkou 10 mg/kg $1023,186 \pm 123,221$ cm.

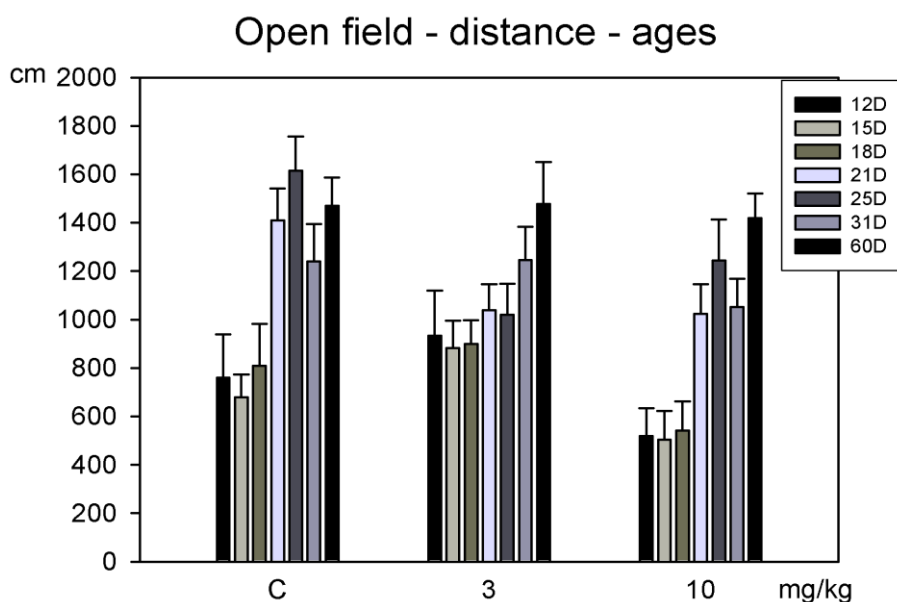
P25: naměřené průměrné hodnoty této věkové kategorie jsou následující – kontroly $1616,136 \pm 139,929$ cm, zvířata s dávkou 3 mg/kg $1020,710 \pm 127,307$ cm a poslední skupina s dávkou 10 mg/kg $1243,887 \pm 170,187$ cm. Signifikantní je rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou s dávkou 3 mg/kg, viz výše.

P31: kontrolní skupina uběhla $1240,496 \pm 154,149$ cm, skupina s dávkou 3 mg/kg $1246,832 \pm 136,593$ cm a skupina s dávkou 10 mg/kg $1052,548 \pm 116,843$ cm.

P60: kontrolní zvířata poslední měřené věkové kategorie dosáhla v průměru vzdálenosti $1470,107 \pm 117,721$ cm, skupina s dávkou 3 mg/kg $1477,815 \pm 172,517$ cm a poslední skupina s dávkou 10 mg/kg uběhla $1419,505 \pm 101,320$ cm.



Obrázek 7. Průměrná dosažená vzdálenost v testu Open field. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek. Hvězdičky značí statistický rozdíl proti kontrolám.



Obrázek 8. Průměrná dosažená vzdálenost v testu Open field. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.1.3 Počet návštěv středu Open fieldu

Při srovnání dle dávky jsme našli rozdíl u 18denních mláďat, kdy skupina s dávkou 10 mg/kg dosáhla signifikantně nižšího počtu návštěv středu Open fieldu s porovnáním s kontrolní skupinou i skupinou s dávkou 3 mg/kg. (obrázek 9) Od věku P15 do P25, kdy byla testovaná zvířata nejvíce aktivní, lze pozorovat postupný nárůst počtu návštěv středu arény. Průměrné hodnoty u mláďat ve

věku P12 jsou vyšší, což přikládáme faktu, že mláďata v tomto věku ještě nemají otevřené oči a jejich orientace v prostoru je horší. (obrázek 9) Při srovnání dle věku vidíme u všech skupin (kontroly, 3mg/kg, 10 mg/kg) výrazně nižší hodnoty u 15denních mláďat. U skupiny s dávkou 10 mg vidíme významně nižší počet návštěv středu OF u mláďat ve věku P18. (obrázek 10)

Jelikož se jedná o prostý počet, jsou následující uvedené hodnoty bezjednotkové.

P12: konkrétní hodnota průměru počtu návštěv středu u kontrolních mláďat je $11,100 \pm 2,121$. Mláďata s dávkou 3 mg/kg navštívila střed OF v průměru $15,222 \times \pm 3,737 \times$. Poslední skupina s dávkou 10 mg/kg dosáhla výsledku $8,600 \pm 1,939$.

P15: počet návštěv středu u kontrol byl $5,900 \pm 1,197$, u mláďat s dávkou 3 mg/kg $6,800 \pm 1,236$ a u mláďat s dávkou 10 mg/kg $4,200 \pm 0,929$.

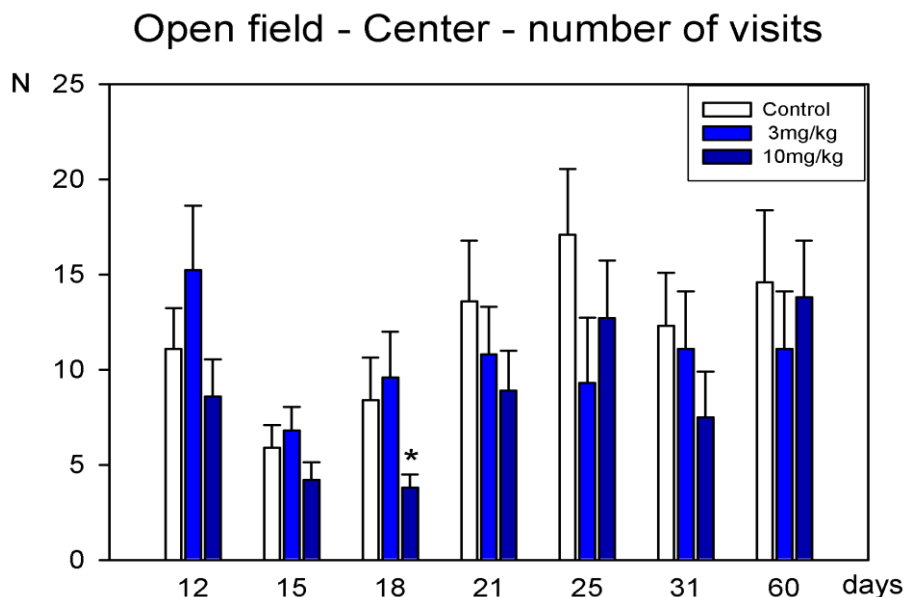
P18: průměrná hodnota u kontrolních mláďat je $8,400 \pm 2,424$. Mláďata s dávkou 3 mg/kg navštívila střed průměrně $9,600 \times \pm 2,381 \times$ a mláďata s dávkou 10 mg/kg $3,800 \times \pm 0,680 \times$.

P21: naměřený průměrný počet návštěv středu u kontrolní skupiny této věkové kategorie byl $13,600 \pm 3,177$, u skupiny s dávkou 3 mg/kg $10,800 \pm 2,498$ a u skupiny s dávkou 10 mg/kg $8,900 \pm 2,084$.

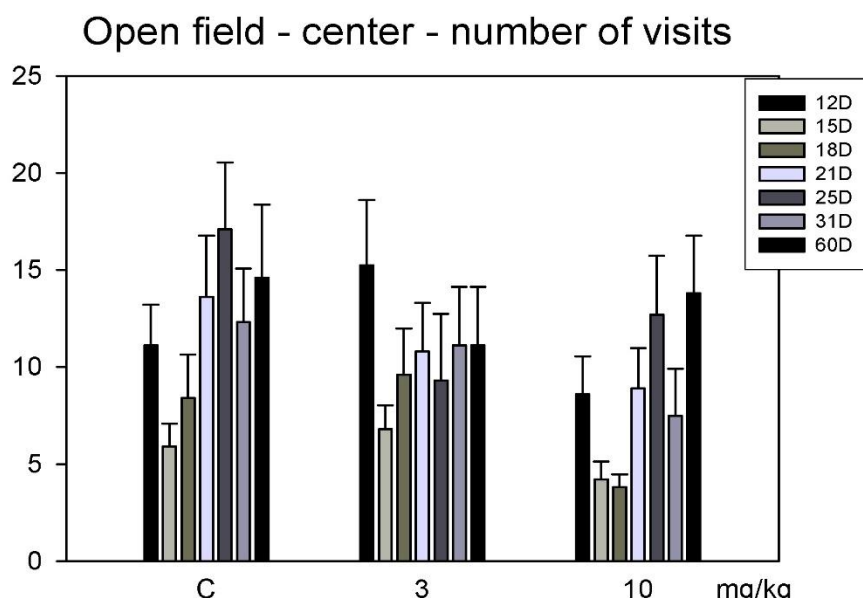
P25: kontrolní zvířata měla průměr $17,100 \pm 3,424$, zvířata s dávkou 3 mg/kg $9,300 \pm 3,439$ a poslední skupina s dávkou 10 mg/kg $12,700 \pm 3,030$.

P31: předposlední věková kategorie měla následující výsledky – kontroly $12,300 \pm 2,777$, zvířata s dávkou 3 mg/kg $11,100 \pm 3,020$ a zvířata s dávkou 10 mg/kg $7,500 \pm 2,400$.

P60: 60denní kontrolní zvířata navštívila střed OF v průměru $14,600 \times \pm 3,775 \times$. U skupiny s dávkou 3 mg/kg jsme naměřili výsledek $12,800 \pm 2,230$ a u skupiny s dávkou 10 mg/kg $13,800 \pm 2,969$.



Obrázek 9. Průměrný počet návštěv středu Open fieldu. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek. Hvězdičky značí statistický rozdíl.



Obrázek 10. Průměrný počet návštěv středu Open fieldu. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.1.4 Čas strávený ve středu Open fieldu

U mláďat ve věku P12 vidíme ve všech skupinách (kontroly, dávka 3 mg/kg, dávka 10 mg/kg) vyšší hodnoty a výrazné rozptyly, tj. vysoké střední chyby průměru, jež mohou opět značit horší orientaci v prostoru, kvůli nevyvinutému zrakovému systému. Od doby, kdy již zvířata vidí, se časy mezi jednotlivými věkovými kategoriemi příliš neliší, což ukazuje, že se zvířata přirozeně ve středu

Open fieldu příliš nezdržují a raději volí, pro ně bezpečnější, zónu po krajích arény. (obrázek 11, obrázek 12)

Ve věkové kategorii P15 nacházíme u skupiny s dávkou 3 mg/kg i 10 mg/kg signifikantně nižší výsledek, než u kontrolní skupiny, mláďata s aplikovanou látkou IEM 1460 tedy ve středu OF strávila kratší dobu, což může ukazovat na mírné snížení prahu úzkosti. U mláďat s dávkou 10 mg/kg vidíme obdobný výsledek i ve věku P18. V pozdějším věku již tento jev nepozorujeme. (obrázek 11) Čas strávený ve středu arény byl měřen v sekundách.

P12: kontrolní zvířata této věkové kategorie strávila ve středu OF v průměru $97,780 \text{ s} \pm 36,054 \text{ s}$. U mláďat s dávkou 3 mg/kg jsme naměřili průměrný čas $52,680 \text{ s} \pm 17,704 \text{ s}$, a u mláďat s dávkou 10 mg/kg $56,520 \text{ s} \pm 26,542 \text{ s}$. Jak bylo uvedeno výše, u této věkové kategorie byly naměřeny jednoznačně nejdelší časy a výsledky obsahují výrazné rozptyly.

P15: kontrolní zvířata se zdržovala ve středu arény v průměru $51,440 \text{ s} \pm 12,690 \text{ s}$, mláďata s aplikovanou látkou v dávce 3 mg/kg $24,860 \text{ s} \pm 7,867 \text{ s}$, a poslední skupina s dávkou 10 mg/kg $24,180 \text{ s} \pm 4,132 \text{ s}$.

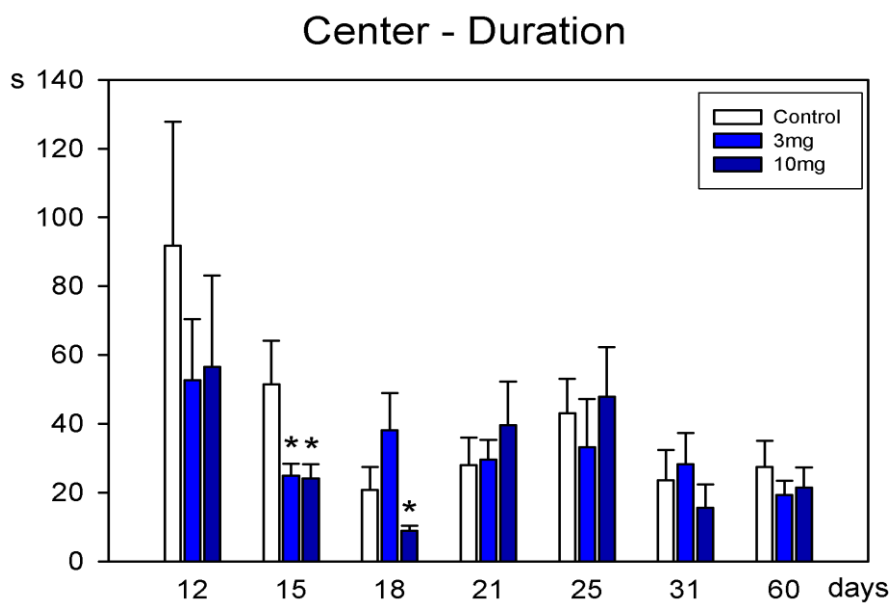
P18: hodnoty u 18denních mláďat jsou následující – kontroly $20,780 \text{ s} \pm 6,650 \text{ s}$, mláďata s dávkou 3 mg/kg $38,120 \text{ s} \pm 10,804 \text{ s}$, mláďata s dávkou 10 mg/kg $8,900 \text{ s} \pm 1,496 \text{ s}$.

P21: kontroly strávily ve středu OF v průměru $28,050 \text{ s} \pm 7,907 \text{ s}$. Zvířata s dávkou 3 mg/kg se ve středu arény zdržovala po dobu $29,580 \text{ s} \pm 5,670 \text{ s}$ a zvířata s dávkou 10 mg/kg $39,600 \text{ s} \pm 12,688 \text{ s}$.

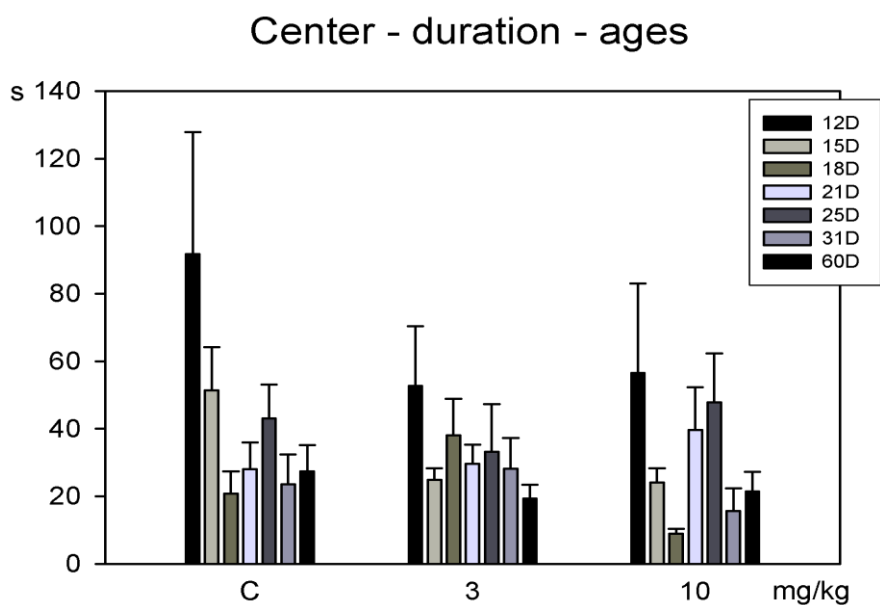
P25: u kontrolní skupiny jsme zaznamenali průměrný čas $43,050 \text{ s} \pm 10,022 \text{ s}$. Skupina zvířat s dávkou 3 mg/kg měla průměrný čas $33,160 \text{ s} \pm 14,113 \text{ s}$, a skupina s dávkou 10 mg/kg $47,880 \text{ s} \pm 14,396 \text{ s}$.

P31: kontrolní skupina strávila ve středu Open fieldu v průměru $23,600 \text{ s} \pm 8,811 \text{ s}$, skupina zvířat s dávkou 3 mg/kg tam strávila $28,240 \text{ s} \pm 9,059 \text{ s}$ a skupina s dávkou 10 mg/kg $15,620 \text{ s} \pm 6,758 \text{ s}$.

P60: u nejstarší testované věkové kategorie jsme zaznamenali tyto časy – kontroly 27,404 s ± 7,713 s, zvířata s dávkou 3 mg/kg 19,368 s ± 4,080 s, a zvířata s dávkou 10 mg/kg 21,408 s ± 5,915 s.



Obrázek 11. Průměrný čas, strávený ve středu Open fieldu. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek. Hvězdičky značí statistický rozdíl proti kontrolám.



Obrázek 12. Průměrný čas, strávený ve středu Open fieldu. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.2 Righting reflex

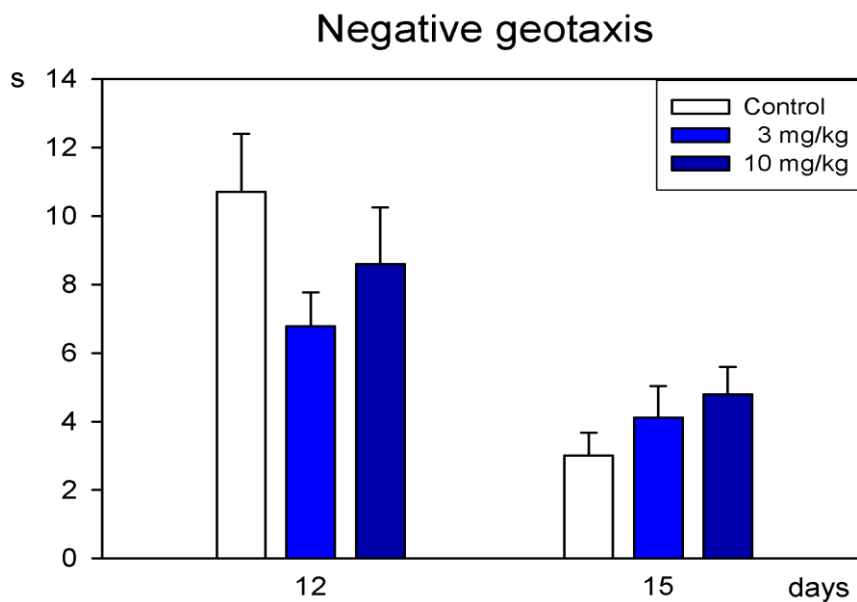
Při tomto testu bylo zvíře položeno v supinační poloze na podložku a měřili jsme čas, za který se otočilo do pronace, tedy ze zad na všechny čtyři končetiny. Všechna zvířata ve všech věkových skupinách, se otočila v intervalu 1 s. Starší zvířata měla tendenci se přetáčet ještě před uložením na podložku. Nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi zvířaty, kterým byla aplikována látka IEM 1460 a kontrolní skupinou.

4.3 Negativní geotaxe

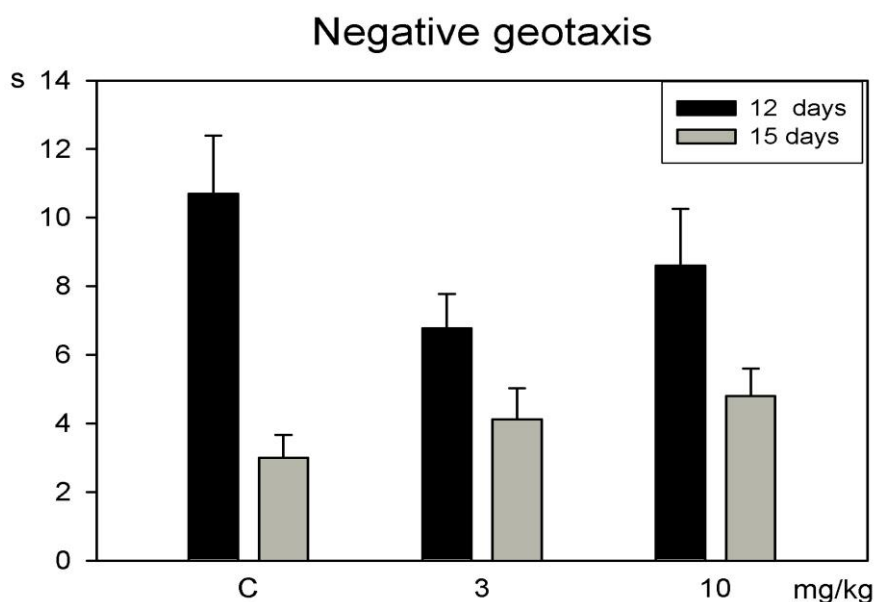
V tomto testu je zvíře uloženo na nakloněnou rovinu hlavou dolů a je měřena doba, za kterou se přetočí do polohy hlavou nahoru. Tento test jsme měřili pouze u mláďat ve věku P12 a P15, jelikož starší mláďata z nakloněné roviny utíkala a nebylo možné test provést. U testu negativní geotaxe nenacházíme žádný statisticky významný rozdíl v naměřených časech mezi kontrolní skupinou a skupinami s látkou IEM 1460. (obrázek 13) Při porovnání jednotlivých věkových kategorií se potvrdil předpoklad, že vzhledem k ontogenickému vývoji motorického, vestibulárního a dalších systémů, dochází se vzrůstajícím věkem k významnému zrychlování reakce. (obrázek 14)

P12: mláďata z kontrolní skupiny se přetočily v průměru za $10,700 \pm 1,693$ s. Mláďata s dávkou 3 mg/kg zvládla přetočení v průměru za 8.400 ± 1.851 s. Výsledky poslední skupiny s dávkou 10 mg/kg byly obdobné, zvířata dokončila test v průměru za 8.600 ± 1.655 s.

P15: V této věkové skupině se kontrolní mláďata přetočila v průměru za 3.000 ± 0.667 s. Mláďata s dávkou 3 mg/kg provedla otočku průměrně v čase 4.800 ± 0.800 s, a poslední skupina s dávkou 10 mg/kg v čase 5.900 ± 1.969 s. U 15denních zvířat můžeme, se zvyšující se dávkou látky IEM 1460, pozorovat tendenci ke zpomalování reakce při testu negativní geotaxe, signifikantní rozdíl však nenacházíme.



Obrázek 13. Rychlost otočení zvířat v testu negativní geotaxe. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek.



Obrázek 14. Rychlost otočení zvířat v testu negativní geotaxe. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.4 Horizontální hrazda

Horizontální hrazda neboli Bar holding test je test hodnotící zejména svalovou sílu předních končetin. Pro potkany je strach z výšky přirozený, předpokládáme tedy snahu udržet se co nejdéle.

Dalším předpokladem je, že čím je mládě starší, tím silnější bude jeho úchop a tedy i delší doba, po kterou se zvíře na hrazdě udrží.

Pro Bar holding test jsme stanovili horní časovou hranici 60 sekund a test jsme zařadili pro všechny testované věkové skupiny, tedy od P12 až po P60. Schopnost zvířat se vytáhnout na hrazdu se poprvé objevila u 18denních mláďat. Rovněž dosažení maximálního času 60 sekund jsme poprvé registrovali u mláďat ve věku P18. Dle výsledků vidíme, že nárůst času, po který se zvířata na hrazdě udrží, ustává ve věku P25 a ve věku P60 jsou časy zvířat srovnatelné s 15denními zvířaty. (obrázek 15, obrázek 16) Nejedná se ovšem o snížení svalové síly předních končetin či ztrátu obav z pádu. Důvodem je nedostatečná výška hrazdy a zvířata tudíž od určitého věku dosáhnout ocasem na podložku a pustí se. U tohoto testu nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami zvířat.

P12: kontrolní skupina se na hrazdě udržela v průměru $6,900 \text{ s} \pm 2,046$. Skupina s dávkou 3 mg/kg dosáhla výsledku v průměru $4,500 \text{ s} \pm 0,637$ s a skupina s dávkou 10 mg/kg $10,200 \text{ s} \pm 4,030$ s. Žádné ze zvířat ve věku P12 se na hrazdě neudrželo celou jednu minutu, ani nedokázalo na hrazdu vylézt.

P15: kontroly se na hrazdě udržely v průměru $10,400 \text{ s} \pm 3,357$ s, mláďata s dávkou 3 mg/kg $12,600 \text{ s} \pm 2,794$ s a mláďata s dávkou 10 mg/kg $8,000 \text{ s} \pm 2,616$ s. U 15denních mláďat jsme, stejně jako u 12denních, nezaznamenali žádné zvíře, jemuž se povedlo vylézt nahoru na hrazdu či udržet se na hrazdě celých 60 sekund.

P18: průměr kontrol byl $29,000 \text{ s} \pm 7,186$ s a v této skupině 4 mláďata z 10 dokázala vylézt nahoru na hrazdu, průměr mláďat s dávkou 3 mg/kg činil $21,600 \text{ s} \pm 5,883$ s a vylézt na hrazdu dokázala 2 mláďata, průměr poslední skupiny s dávkou 10 mg/kg byl $24,300 \text{ s} \pm 7,976$ s a na hrazdu vylezla opět 2 mláďata z 10.

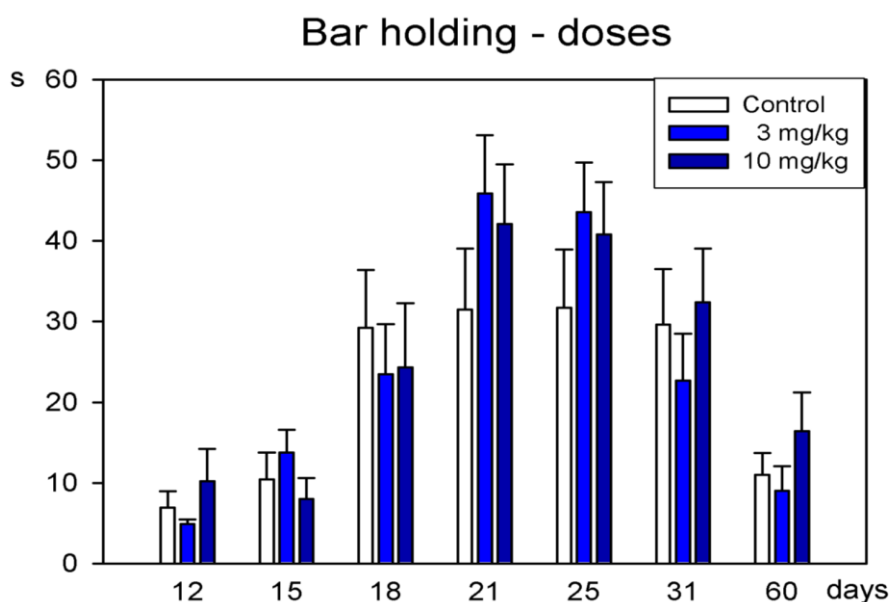
P21: kontrolní mláďata této věkové skupiny vydržela na hrazdě průměrně $31,500 \text{ s} \pm 7,566$ s, skupina s dávkou 3 mg/kg $42,200 \text{ s} \pm 7,438$ s a poslední skupina s dávkou 10 mg/kg měla průměrný čas $42,100 \text{ s} \pm 7,382$ s. Maximálního času dosáhla celkem polovina testovaných

mláďat, konkrétně 3 mláďata z kontrolní skupiny, 6 s dávkou 3 mg/kg a 6 s dávkou 10 mg/kg. Na hrazdu se zvládlo vyhoupnout pouze jedno mláďe a to ze skupiny s dávkou 10 mg/kg.

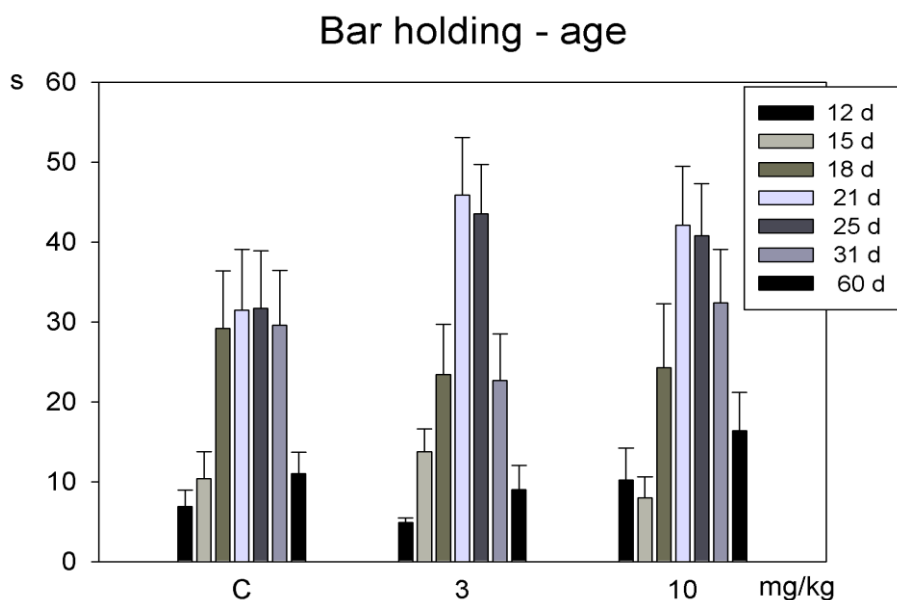
P25: průměr kontrol byl 31,700 s \pm 7,210 s, průměr skupiny s dávkou 3 mg/kg se rovnal 40,000 s \pm 6,564 a skupiny s dávkou 10 mg/kg 40,800 s \pm 6,492 s. Maximální čas 60 sekund byl započítán u třetiny mláďat, konkrétně u 3 z kontrolní skupiny, 4 ze skupiny s dávkou 3 mg/kg a 3 ze skupiny 10 mg/kg. Na hrazdu se dokázala vyhoupnout 4 mláďata (1 \times kontrola, 1 \times 3 mg/kg a 2 \times 10 mg/kg). V porovnání s věkem P21 se tedy po maximální čas udrželo méně zvířat, avšak schopnost dostat se nahoru na hrazdu jsme zaznamenali u vícera z nich.

P31: průměrný čas kontrolních zvířat byl 29,600 s \pm 6,879 s, průměr zvířat s dávkou 3 mg/kg čítal 20,800 s \pm 5,531 s a průměr poslední skupiny s dávkou 10 mg/kg 32,400 s \pm 6,667 s. Maximální čas byl započítán u 5 mláďat (2 \times kontrola, 1 \times 3mg/kg a 2 \times 10 mg/kg). Nahoru na hrazdu se dokázalo dostat jedno zvíře z kontrolní skupiny a jedno ze skupiny s dávkou 10 mg/kg.

P60: kontrolní zvířata se udržela na hrazdě průměrně 11,000 s \pm 2,708 s, zvířata s dávkou 3 mg/kg měla čas v průměru 8,200 s \pm 2,835 s a zvířata s dávkou 10 mg/kg 16,400 s \pm 4,815 s. Žádné zvíře z této věkové kategorie nedosáhlo maximálního času 60 sekund a pouze jedno zvíře s dávkou 10 mg/kg vylezlo nahoru na hrazdu.



Obrázek 15. Průměrný čas, po který se zvířata udržela na horizontální hrazdě. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek.



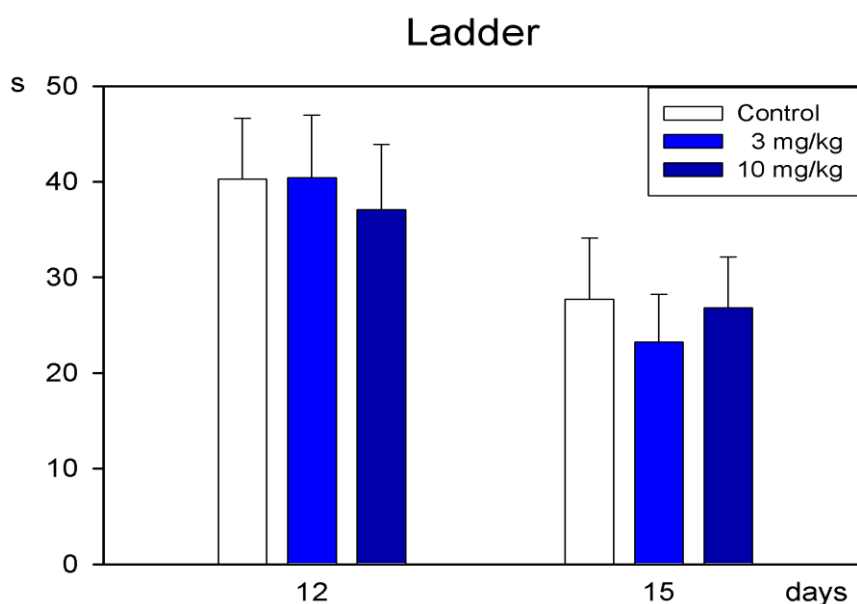
Obrázek 16. Průměrný čas, po který se zvířata udržela na horizontální hrazdě. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.5 Svislý žebřík

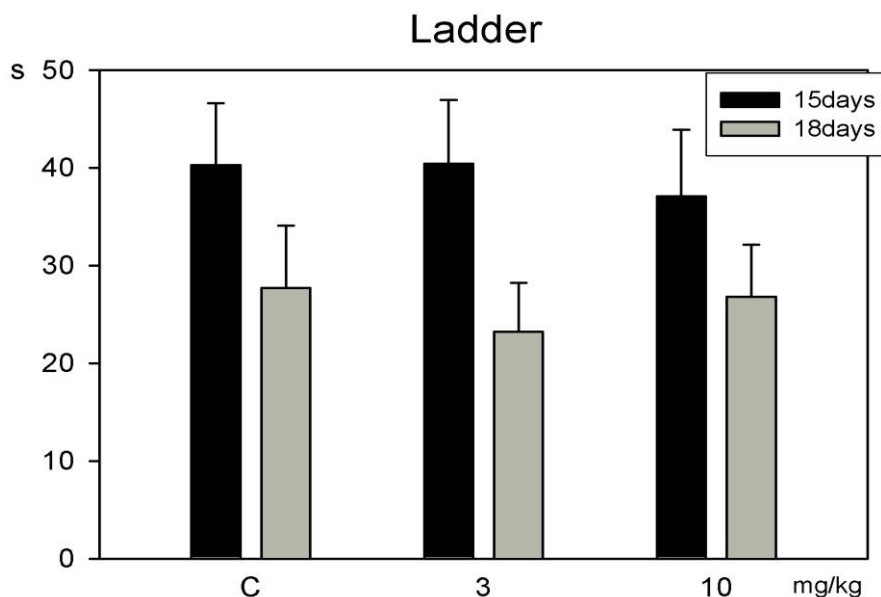
Tento test jsme zvolili pro mláďata ve věku P15 a P18. Časový limit byl opět stanoven na 60 sekund a u zvířat, jež v tomto limitu nedosáhly cíle, byl zaznamenán jako výsledek čas 60 s. U tohoto testu nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami zvířat (C, 3 mg/kg, 10 mg/kg). (obrázek 17) Při porovnání jednotlivých věkových kategorií registrujeme, stejně jako u testu negativní geotaxe, kratší výsledné časy mláďat ve věku P18 oproti mladším ve věku P15. Statisticky významný rozdíl jsme však vypočítali pouze u skupiny s dávkou 3 mg/kg. (obrázek 18)

P15: u 15denních mláďat jsou výsledky ve všech skupinách (C, 3 mg/kg, 10 mg/kg) srovnatelné. Velmi obdobný je i počet zvířat, jež v daném limitu nedosáhly horního konce žebříku (3 kontrolní mláďata, 3 mláďata s dávkou 3 mg/kg, 4 mláďata s dávkou 10 mg/kg). V tomto testu jsme tedy neprokázali žádný vliv aplikované látky na motoriku mláďat. Konkrétní hodnoty jsou následující – průměr časů, za který vylezla kontrolní zvířata k horní části svislého žebříku, byl $40,300 \text{ s} \pm 6,335 \text{ s}$, mláďata s dávkou 3 mg/kg zdolala žebřík v průměru za $37,800 \text{ s} \pm 6,411 \text{ s}$ a mláďata s dávkou 10 mg/kg za $37,100 \text{ s} \pm 6,808 \text{ s}$.

P18: pro 18denní zvířata platí pro tento test obdobné tvrzení jako pro zvířata ve věku P15. U obou skupin potřebovala v průměru nejdelší čas ke zdolání žebříku kontrolní skupina, avšak v porovnání s dalšími dvěma skupinami jsou rozdíly minimální a žádná hodnota tudíž není signifikantní. Kontrolní skupina dosáhla cíle v průměru za 27,700 s \pm 6,414 s, skupina s aplikovanou látkou v dávce 3 mg/kg vylezla na horní část v průměru za 21,100 s \pm 4,970 s a průměr skupiny s dávkou 10 mg/kg byl 26,800 s \pm 5,316 s. Je zajímavé, že v této věkové skupině se výrazně zredukoval počet zvířat, která zůstávala na žebříku déle než 60 s (pouze 1 mládě z kontrolní skupiny a 1 mládě ze skupiny s dávkou 10 mg/kg), na druhou stranu ovšem mláďata ze žebříku poměrně často padala (konkrétně 2 kontrolní mláďata, 4 mláďata ze skupiny s dávkou 3 mg/kg a 5 mláďat ze skupiny s dávkou 10 mg/kg), což můžeme hodnotit jako pokus o útěk, jenž jsme viděli i u testu negativní geotaxe, který jsme proto u 18denních zvířat nakonec vůbec nezařadili.



Obrázek 17. Čas, potřebný k překonání svislého žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek.



Obrázek 18. Čas, potřebný k překonání svislého žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.6 Pravidelný horizontální žebřík

Chůze či běh po horizontálním žebříku testuje koordinaci předních a zadních končetin a pro jeho zvládnutí je nutná zraková kontrola a aktivita kortikospinálních a rubrospinálních drah. Tyto dráhy dozrávají mezi 15. až 18. postnatálním dnem života potkana. (Cummings et al., 2007; Muir, 2000) To je důvod, proč jsme test zařadili u mláďat ve věku P21 a starších.

Jako první jsme zvolili variantu se shodným rozestupem příček v celé délce žebříku, tzv. pravidelný horizontální žebřík. Měřili jsme čas, za který mláďe 90 cm dlouhý žebřík překonalo a případné chyby, kterých se při přechodu dopustilo. Opět jsme stanovili maximální čas 60 s na splnění testu. Nezaznamenali jsme žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami zvířat (C, 3 mg/kg, 10 mg/kg) a to ani v časech potřebných pro překonání žebříku, ani v počtu provedených chyb. (obrázek 19, obrázek 20, obrázek 21, obrázek 22)

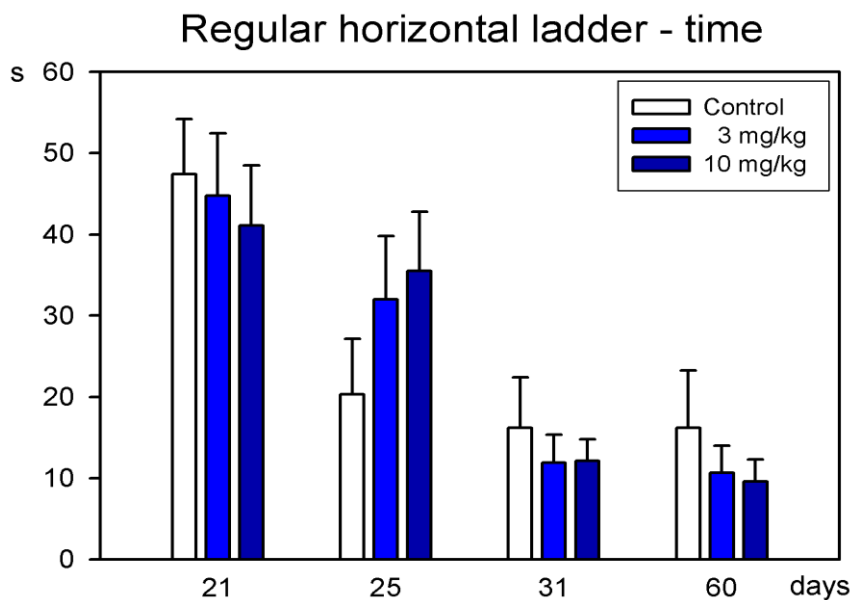
P21: kontrolní zvířata přešla žebřík v průměru za 47,400 s \pm 6,791 s a celkem 6 zvířatům z 10 byl započítán maximální čas 60 s, jelikož nedokázala žebřík v daném časovém limitu překonat. Průměrný počet chyb, jenž při přechodu žebříku zvířata z kontrolní skupiny udělala, byl 4,100 \pm 1,269. Skupině s dávkou 3 mg/kg trval přechod průměrně 46,300 s \pm 7,025 s a počet chyb byl 5,100 \pm 1,629. V této skupině shodně nezvládlo žebřík přejít v časovém limitu 6 mláďat. Průměrný čas poslední skupiny s dávkou 10 mg/kg byl 41,100 s \pm 7,405 s a počet chyb 5,300

$\pm 1,136$. Můžeme pozorovat tendenci k rychlejšímu přechodu žebříku a většímu počtu chyb s rostoucí dávkou látky IEM 1460, avšak jak bylo uvedeno výše, nebyly zaznamenány žádné signifikantní rozdíly.

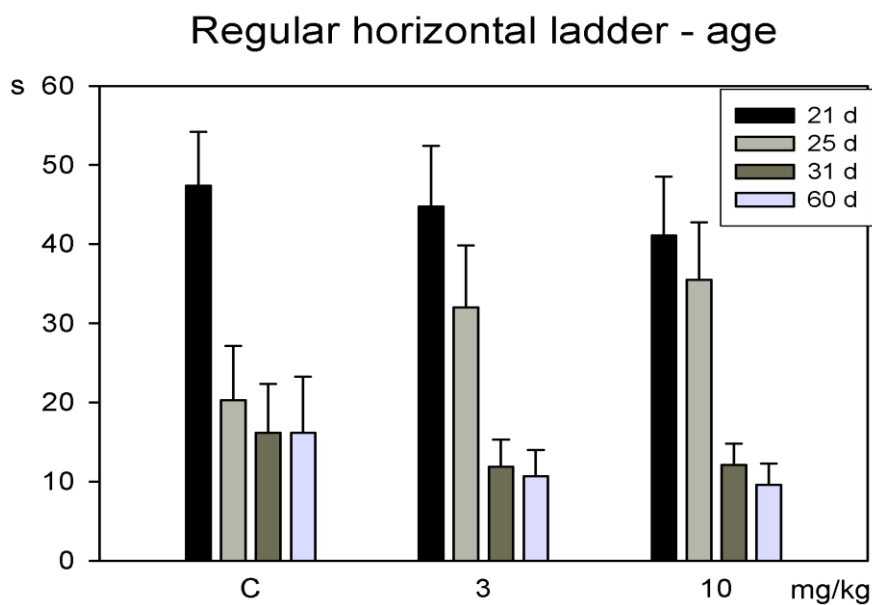
P25: průměrný čas překonání žebříku u kontrolní skupiny byl $20,300 \text{ s} \pm 6,843 \text{ s}$ a počet chyb $1,800 \pm 0,389$. Dvěma mláďatům z kontrolní skupiny byl započten maximální čas 60 s. Skupina s dávkou 3 mg/kg absolvovala tento test v průměru za $34,800 \text{ s} \pm 7,541 \text{ s}$, s počtem chyb $1,900 \pm 0,277$. Čtyřem mláďatům z této skupiny nestačil časový limit pro přejití žebříku. Poslední skupina s dávkou 10 mg/kg přešla žebřík v průměrném čase za $35,500 \text{ s} \pm 7,280 \text{ s}$ a udělala průměrně $2,400 \pm 0,718$ chyb. Z této skupiny byl započítán maximální čas 3 mláďatům.

P31: kontrolní zvířata zdolala žebřík v průměru za $16,200 \text{ s} \pm 6,173 \text{ s}$ a udělala při tom $1,100 \pm 0,348$ chyb. Zvířata s dávkou 3 mg/kg měla průměrný čas $16,700 \text{ s} \pm 5,708 \text{ s}$ a počet chyb $1,300 \pm 0,335$. A výsledky u poslední skupiny s dávkou 10 mg/kg byly $12,100 \text{ s} \pm 2,698 \text{ s}$ a $1,300 \pm 0,260$ chyb. U 31denních zvířat nedokončilo úkol v časovém limitu pouze 1 mláďe ze skupiny s dávkou 3 mg/kg.

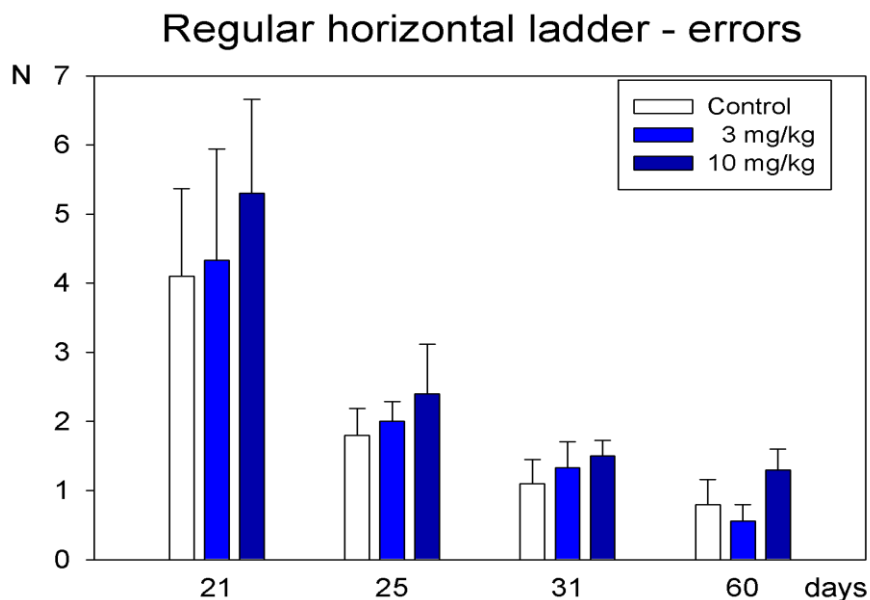
P60: průměrný čas kontrolních zvířat byl $16,200 \text{ s} \pm 7,080 \text{ s}$ a počet chyb, jenž udělala při plnění úkolu, byl $0,800 \pm 0,359$. Skupina 3 mg/kg přešla žebřík v průměru za $13,900 \text{ s} \pm 4,406 \text{ s}$, s počtem chyb $0,600 \pm 0,221$. Průměrný čas poslední skupiny s dávkou 10 mg/kg byl $9,600 \text{ s} \pm 2,696 \text{ s}$ a počet chyb $1,300 \pm 0,300$. Všechna zvířata ve věku P60 zvládla horizontální pravidelný žebřík překonat v časech kratších než 60 s. V této věkové kategorii můžeme opět u zvířat s aplikovanou látkou IEM 1460 (především s dávkou 10 mg/kg) sledovat tendenci přejít žebřík v rychlejších časech, avšak s větším počtem chyb.



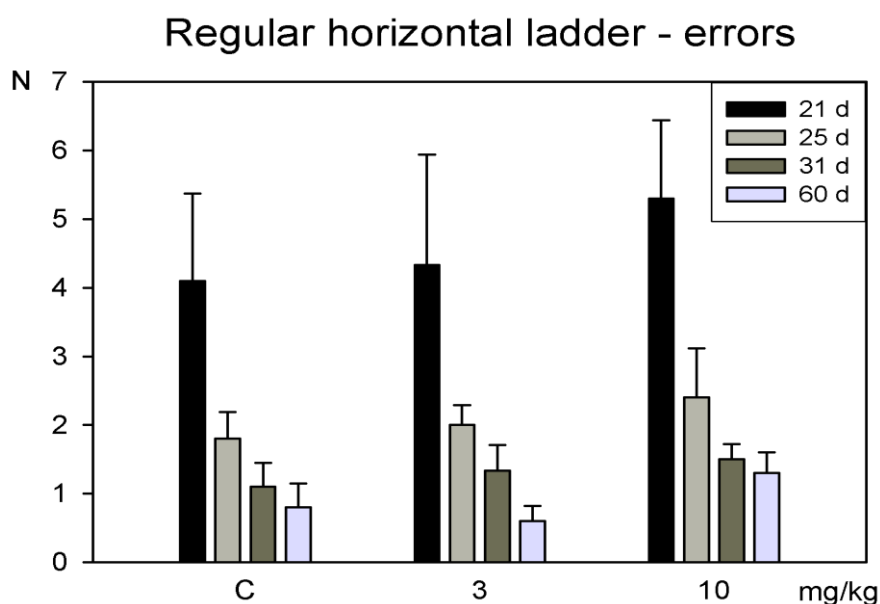
Obrázek 19. Čas potřebný k překonání pravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek.



Obrázek 20. Čas potřebný k překonání pravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.



Obrázek 21. Počet chyb vykonaných při překonávání pravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek.



Obrázek 22. Počet chyb vykonaných při překonávání pravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

4.7 Nepravidelný horizontální žebřík

Tento test jsme zařadili u stejných věkových skupin jako žebřík pravidelný. Provedení a časový limit pro splnění testu bylo shodné. U nepravidelného žebříku jsme rovněž nezaznamenali žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami zvířat (C, 3 mg/kg, 10 mg/kg) a to ani

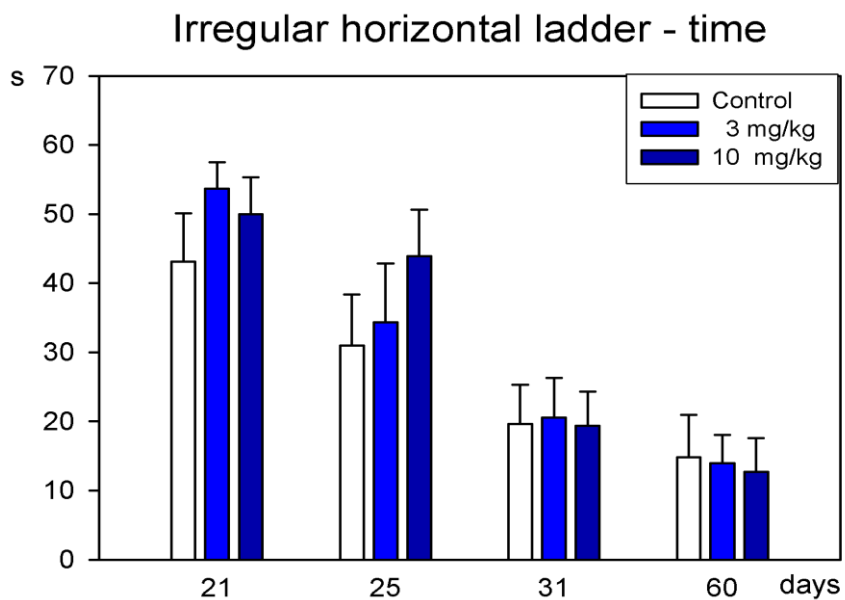
v časech potřebných pro překonání žebříku, ani v počtu provedených chyb. (obrázek 23, obrázek 24, obrázek 25, obrázek 26)

P21: kontrolní skupina zvládla přechod nepravidelného žebříku v průměru za $43,100 \text{ s} \pm 7,031 \text{ s}$, s $2,000 \pm 0,632$ chybami. 6 mláďat z 10 nepřešlo celý žebřík v časovém limitu a byla jim započítána hodnota 60 sekund. Skupina mláďat s dávkou 3 mg/kg přešla žebřík průměrně za $54,300 \text{ s} \pm 3,490 \text{ s}$ a při přechodu udělala v průměru $2,000 \pm 0,577$ chyb. Za stanovený časový limit test nedokončilo dokonce 7 mláďat. Průměrná doba přechodu skupiny s dávkou 10 mg/kg byla $50,000 \text{ s} \pm 5,331 \text{ s}$, s počtem chyb $3,500 \pm 0,980$. V časovém limitu žebřík nepřešlo 5 mláďat z této skupiny.

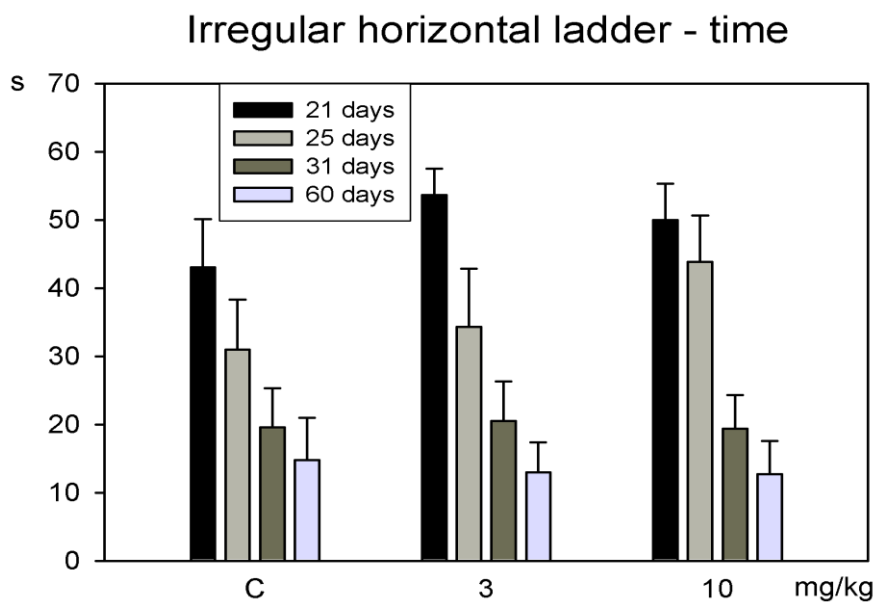
P25: průměrné doba zdolání žebříku u kontrolní skupiny byla $31,000 \text{ s} \pm 7,355 \text{ s}$ a počet chyb $1,300 \pm 0,473$. Přejít žebřík za 60 s nestihla 2 mláďata. Skupina s dávkou 3 mg/kg přešla žebřík v průměru za $36,900 \text{ s} \pm 8,052 \text{ s}$ a udělala $0,600 \pm 0,267$ chyb. Maximální čas byl započítán 5 mláďatům. Poslední skupina s dávkou 10 mg/kg měla průměrný čas $43,900 \text{ s} \pm 6,742 \text{ s}$, s počtem chyb $2,100 \pm 0,623$. Úkol v časovém limitu nedokončilo rovněž 5 mláďat.

P31: kontrolní skupina ve věku 31 dní zvládla přechod žebříku v průměru za $19,100 \text{ s} \pm 5,706 \text{ s}$, s počtem chyb $1,100 \pm 0,348$. Skupina zvířat s dávkou 3 mg/kg přešla žebřík v průměrném čase $24,500 \text{ s} \pm 6,495 \text{ s}$ a při přechodu udělala $0,700 \pm 0,153$ chyb. Poslední skupina přešla žebřík v průměru za $19,400 \text{ s} \pm 4,915 \text{ s}$ a udělala $1,300 \pm 0,260$ chyb. V této věkové kategorii nedokončila úkol ve stanoveném čase 60 sekund dvě zvířata ze skupiny s dávkou 3 mg/kg.

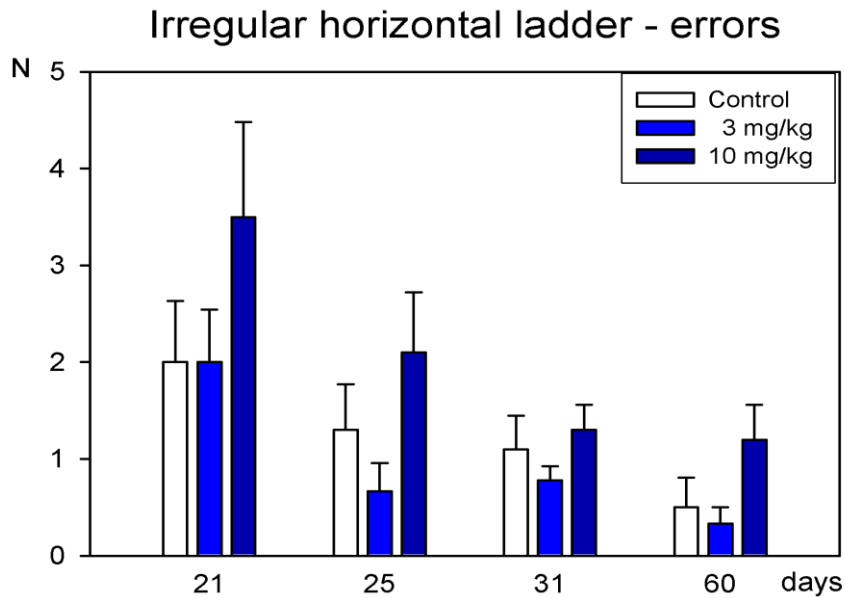
P60: průměrný čas překonání žebříku u kontrolních zvířat byl $14,800 \text{ s} \pm 6,195 \text{ s}$ a počet chyb $0,500 \pm 0,307$. Průměrný čas skupiny s dávkou 3 mg/kg byl $14,000 \text{ s} \pm 4,047 \text{ s}$ a počet chyb $0,300 \pm 0,153$. Poslední skupiny s dávkou 10 mg/kg zvládla přechod nepravidelného žebříku v průměru za $12,700 \text{ s} \pm 4,876 \text{ s}$, s počtem chyb $1,200 \pm 0,359$. Všechna zvířata z této věkové skupiny stihla úkol ve stanoveném čase, žádnému tedy nebyl započten maximální čas 60 sekund.



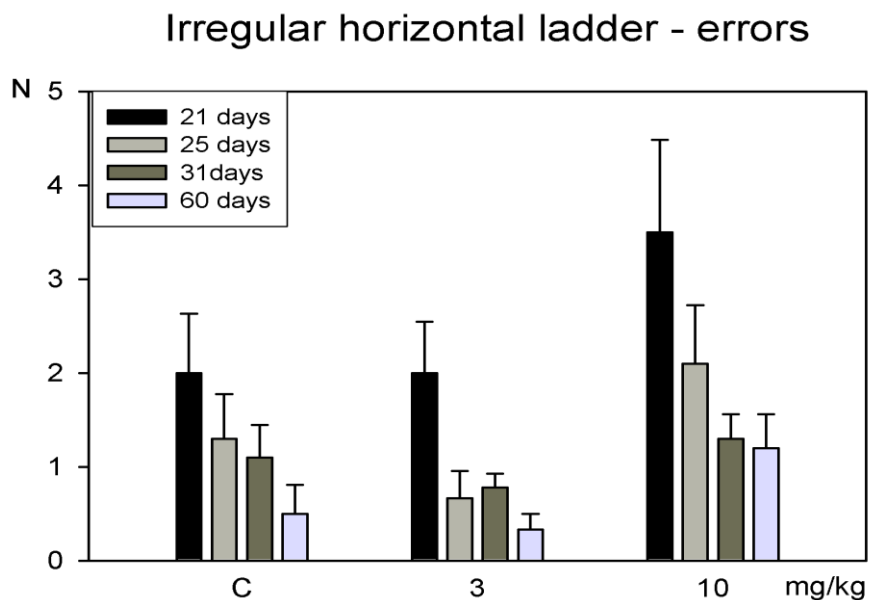
Obrázek 23. Čas potřebný k překonání nepravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek.



Obrázek 24. Čas potřebný k překonání nepravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.



Obrázek 25. Počet chyb vykonaných při překonávání nepravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek.



Obrázek 26. Počet chyb vykonaných při překonávání nepravidelného horizontálního žebříku. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 na jednotlivé věkové kategorie.

V obou testech horizontálních žebříků vidíme předpokládaný, s věkem se snižující čas, potřebný pro překonání žebříku i snižující se počet provedených chyb. Zajímavé je, že při porovnání času potřebného pro překonání žebříku pravidelného a nepravidelného, nacházíme u většiny zvířat delší časy u žebříku nepravidelného, přestože tato varianta následovala vždy až po přechodu žebříku pravidelného a očekávali bychom tedy určitou adaptaci zvířat a kratší výsledné časy. Na druhou

stranu průměrné hodnoty počtu chyb jsou u nepravidelného žebříku u všech zvířat nižší, než u žebříku pravidelného, což pro určitou adaptaci svědčí.

4.8 Chůze na rotarodu

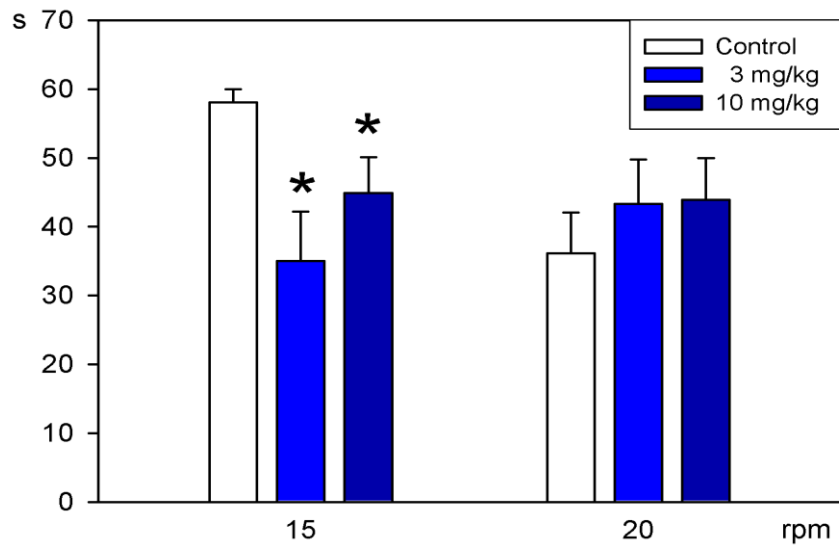
Tento test jsme zařadili pouze u poslední věkové skupiny, tedy 60denních zvířat. Každé zvíře absolvovalo test ve dvou variantách – při rychlosti 15 otáček/min a 20 otáček/min. Měřili jsme čas, jak dlouho se zvíře na rotujícím válci udrží. Stejně jako v předchozích testech jsme stanovili maximální čas testování 60 sekund.

15 otáček/min: zvířata z kontrolní skupiny se na válci udržela v průměru 58,100 s \pm 1,900 s. 9 z 10 zvířat dosáhlo maximálního času 60 vteřin. Průměrný výsledek skupiny s dávkou 3 mg/kg byl 35,000 s \pm 7,205 s a celou minutu se na válci udržela 4 zvířata. Poslední skupina s dávkou 10 mg/kg se udržela v průměru 44,900 s \pm 5,223 s, maximálního času dosáhla rovněž 4 zvířata. Signifikantní rozdíl oproti kontrolám jsme tedy našli u obou skupin mláďat s dávkami IEM 1460. (obrázek 27)

20 otáček/min: Při chůzi na rotarodu s rychlostí 20 otáček/min jsme mezi jednotlivými skupinami nezaznamenali žádný signifikantní rozdíl. Průměr kontrolní skupiny byl 36,100 s \pm 5,988 s. Maximálního času dosáhla pouze 3 zvířata. Skupina s dávkou 3 mg/kg se na válci udržela v průměru 43,300 s \pm 6,446 s. Maximální čas byl započten 4 zvířatům. Průměrný čas skupiny s dávkou 10 mg/kg byl 43,900 s \pm 6,056 s a celou minutu se udrželo na válci 5 zvířat z 10.

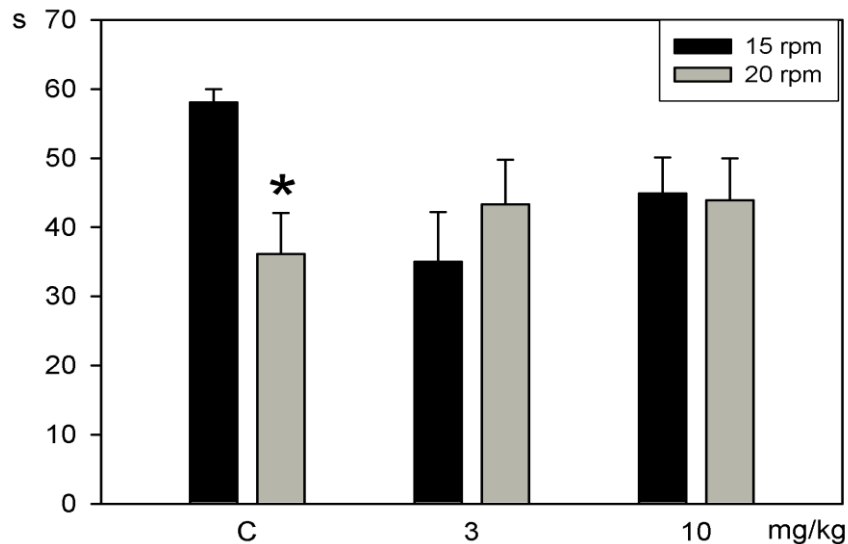
Při srovnání skupin dle dávky vidíme u kontrolní skupiny signifikantní rozdíl mezi dosaženým výsledkem při rychlosti 15 otáček/ min a 20 otáček/min. (Obrázek 28) Důvodem dosažení kratších časů při rychlosti 20 otáček/min může být i fakt, že zvířata byla na přístroj umístěna již podruhé a jejich obava z pádu nemusela být tak výrazná, jako při prvním testu.

Rotorod - 25-day-old rats



Obrázek 27. Průměrný čas, po který zvířata vydržela chodit na rotorodu. Zpracování grafu – efekt látky IEM 1460 dle aplikovaných dávek. Osa x – rychlost otáček. Osa y - dosažený čas. Hvězdičky značí signifikantní rozdíl proti kontrolám.

Rotorod - 25-day-old rats



Obrázek 28. Průměrný čas, po který zvířata vydržela chodit na rotorodu. Zpracování grafu - dle rychlosti otáček. Osa x – aplikovaná dávka. Osa y – dosažený čas. Hvězdičky značí signifikantní rozdíl mezi dvěma rychlostmi otáček.

5 DISKUZE

Látka IEM 1460 je selektivní blokátor AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} ionty. Na kanály, které Ca^{2+} nepropouštějí, se tato látka neváže. To znamená, že kalciové proudy přes kanály typu AMPA jsou blokovány látkou IEM 1460 s výjimkou případů, kdy příslušné kanály obsahují podjednotku GluA2 editovanou v tzv. Q/R místě. V takovém případě je neutrální glutamin (Q) vyměněn za kladně nabitý arginin (R), což omezí transport dvojmocného iontu a činí tak příslušné kanály nepropustné pro Ca^{2+} . (Bowie, 2008; Kew, Kemp, 2005; Schlesinger et al., 2005; Szczurowska a Mareš, 2013)

Prozatím je látka IEM 1460 používána pouze pro výzkumné účely a není určena k diagnostice či terapii pacientů. Dle několika autorů je blokáda AMPA receptorů slibnou farmakologickou strategií neuroprotektce při degenerativních onemocněních nervového systému a akutní léčbě mozkové příhody. (Buldakova, 1999; Magazanik, 1997; Schlesinger et al., 2005) AMPA receptory propustné pro Ca^{2+} ionty v centrálních glutamátergních synapsích jsou zvláště zajímavé vzhledem k jejich jedinečným biofyzikálním a signalizačním vlastnostem, které přispívají k synaptické plasticitě a jejich rolích v mnoha neuropatologiích. (Guire et al., 2008) V posledních letech jsou AMPA receptory a jejich blokace často zmiňovány i v souvislosti s ovlivněním různých typů bolesti (např. chronická viscerální, neuropatická). (Chen et al., 2013, Liu et al., 2015; Kopach et al., 2016)

Dosavadní studie, zabývající se látkou IEM 1460 jako možným věkově specifickým antikonvulzivem, byly provedeny na Ruské akademii věd a na Akademii věd ČR. Dle výsledků studie, publikované roku 2008, vede aplikace látky IEM 1460 v dávkách 1,0 – 3,0 mg/kg k pěti až osminásobnému snížení incidence kainátem a nikotinem indukovaných tonicko-klonických záchvatů a téměř k eliminaci úmrtnosti potkanů v důsledku tonicko-klonických záchvatů. (Gmiro et al., 2008)

Tato práce navazuje zejména na poznatky Szczurowské a Mareše zabývajících se antagonistickým působením látky IEM 1460 na AMPA receptory za účelem léčby epilepsie, tedy účinkem antikonvulzivním, a na poznatky Soukupové, která se zabývala možnými krátkodobými účinky této látky na motoriku laboratorních potkanů (Soukupová, 2016; Szczurowska a Mareš, 2015)

Szczurowska a Mareš zkoumali možný antikonvulzivní účinek látky IEM 1460 u vyvíjejících se potkanů pomocí dvou modelů epileptických záchvatů. Šlo o záchvaty vyvolané látkou pentylenetetrazol (PTZ) a o záchvaty indukované kortikální stimulací - epileptickými následnými výboji u potkanů ve věku P12, P18 a P25. Zjistili, že aplikace látky IEM 1460 v dávce 20 mg/kg před podáním látky PTZ vedla ke zpožděnému nástupu PTZ-indukovaných klonických záchvatů ve všech třech zkoumaných věkových kategoriích. Tento výsledek značí, že blokáda AMPA receptorů propustných pro Ca^{2+} byla dostatečná a došlo k zábraně šíření epileptické aktivity do motorického

systemu potkana. Generalizované tonicko-klonické záchvaty rovněž indukované látkou PTZ byly potlačeny pouze u potkanů ve věku P18 a P25 dávkami 10 a 20 mg/kg. Po opakovaných stimulacích u kontrolních 12denních zvířat se trvání kortikálních následných výbojů postupně zvyšovalo. Dávka 10 mg/kg prodloužení následných výbojů zcela blokovala a dávka 20 mg/kg ho částečně potlačila. IEM 1460 mělo u potkaních mláďat ve věku P18 a P25 naopak lehký prokonvulzivní účinek, tj. trvání následných výbojů se s opakovanou stimulací prodlužovaly. Dle autorů lze vyvodit, že účinek látky IEM 1460 je závislý na modelu použitých záchvatů, jejich iktogenní struktuře a rovněž na vývojových změnách ve složení podjednotek AMPA receptorů. (Szczurowska a Mareš, 2015)

V návaznosti na práci Szczurowske a Mareše, zkoumala Soukupová ve své diplomové práci krátkodobý účinek látky IEM 1460 na motoriku potkana. Látka byla zvířatům aplikována 30 minut před provedením motorických testů. Soukupová zvolila totožné věkové kategorie (P12, P18, P25) a tytéž dávky (10 mg/kg a 20 mg/kg) jako Szczurowska a Mareš. Z jejich výsledků vyplývá, že látka IEM 1460 má vliv na změny v motorice laboratorního potkana. Nejvíce změn bylo zaznamenáno u mláďat ve věku P12 s dávkou 20 mg/kg a ve věku P25 s dávkou 10 i 20 mg/kg. Avšak dlouhodobé účinky látky hodnoceny nebyly. (Soukupová, 2016) Jelikož se látka IEM 1460 váže pouze na needitované GluA2 podjednotky a se zvyšujícím se věkem přibývá podjednotek editovaných, napovídá ovlivnění motoriky testovaných zvířat složení jejich receptorů. (Maganazik et al., 1997) Předpoklad, že vliv látky IEM 1460 na motoriku potkana s věkem klesá, nebyl však plně potvrzen, jelikož výsledky ukazovaly na účinek látky na motoriku u 12denních a 25denních zvířat, nikoliv u 18denních. Vliv na mláďata ve věku P18 by měl být dle tohoto předpokladu větší, než ve věku P25, což se nepotvrdilo. To může souviset s časově odlišným vyžíváním jednotlivých struktur CNS. Nebyla potvrzena ani hypotéza, že s rostoucí dávkou aplikované látky poroste rovněž její účinek na motoriku. Bylo však prokázáno, že látka IEM 1460 má odlišný vliv na jednotlivé struktury mozku. (Soukupová, 2016) Toto tvrzení je ve shodě s výsledky studie Buldakove et al., ve které vědci zkoumali složení AMPA receptorů u potkanů ve věku P11 až P24. V této práci vědci zaznamenali nižší citlivost pyramidových buněk k blokádě látkou IEM 1460 oproti buňkám nepyramidovým, z čehož je možné vyvodit, že motorika bude po podání této látky ovlivněna méně, než ostatní funkce mozku. V publikovaném článku však není popsáno porovnání reakcí zvířat v jednotlivých věkových skupinách. (Buldakova et al., 1999)

Tato práce je pokračováním hodnocení možného vlivu látky IEM 1460 na motoriku potkana, avšak s tím rozdílem, že byl hodnocen dlouhodobější vliv látky. Bylo tedy zvoleno více věkových kategorií a motorické testy neprobíhaly v brzké době po aplikaci látky, nýbrž látka byla aplikována v pěti po sobě následujících dnech (P7 – P11) a testování probíhalo od věku P12 až po P60, tedy až

do období rané dospělosti zvířat. Dalším rozdílem jsou hladiny dávek. Pro tuto práci byly zvoleny dávky 3 mg/kg a 10 mg/kg látky IEM 1460.

Výsledné naměřené hodnoty v rámci testu Open field ukazují, že látka IEM 1460 má vliv na některé aspekty spontánní lokomoce. Zaznamenali jsme několik signifikantních rozdílů mezi kontrolními zvířaty a zvířaty, kterým byla aplikována látka IEM 1460. Při hodnocení průměrné rychlosti pohybu v OF lze dle výsledků konstatovat, že ve věku od P21 do P60 všechna zvířata s látkou IEM 1460 dosahovala nižší průměrné rychlosti oproti kontrolní skupině. Statisticky významné rozdíly jsme však zaznamenali pouze u 21denních mláďat (dávka 3 mg/kg i 10 mg/kg) a 25denních mláďat (pouze dávka 3 mg/kg). Ve věku P31 a P60 jsou již výsledky srovnatelné a lze pozorovat pouze určitou tendenci k pomalejší lokomoci. Při hodnocení uběhnuté vzdálenosti jsme zaznamenali obdobné výsledky. Ve věku P21 a P25 jsou naměřené hodnoty skupin s látkou IEM 1460 nižší oproti kontrolám, což značí kratší uběhnutou vzdálenost. Signifikantní rozdíly jsme zaznamenali ve stejných skupinách (21denní mláďata s dávkou 3 mg/kg i 10 mg/kg a 25denní mláďata s dávkou 3 mg/kg). U 31 a 60denních zvířat dosahovala nižších průměrných hodnot pouze skupina s dávkou 10 mg/kg, avšak rozdíly naměřených hodnot v těchto věkových kategoriích u všech skupin (C, 3 mg/kg, 10 mg/kg) byly minimální. U mladších zvířat nebyly mezi jednotlivými výsledky nalezeny žádné tendence ani statisticky významné rozdíly. Vzhledem k výsledkům rychlosti pohybu a uběhnuté vzdálenosti se jako nejvíce aktivní jeví kontrolní mláďata ve věku P25, což odpovídá vývojovému období, fyziologickému ontogenetickému vývoji, kdy je mládě nejvíce hravé a prozkoumává okolí. Třetím hodnoceným aspektem spontánní lokomoce v rámci testu OF byl počet návštěv středu OF. V tomto testu jsme u mláďat od věku P15 do P25 zaznamenali postupný nárůst počtu návštěv středu OF, což opět souvisí se zvýšenou pohybovou aktivitou v daném věku. Jediný statisticky významný rozdíl, který byl z výsledků tohoto testu vypočítán, je u 18denních mláďat s dávkou 10 mg/kg, u kterých byl počet návštěv středu OF signifikantně nižší. Tento výsledek může značit zvýšenou úzkost mláďat v tomto věku po aplikaci látky IEM 1460, jelikož však byl tento výsledek zaznamenán pouze u jedné skupiny zvířat, není toto tvrzení dostatečně podloženo. Posledním hodnoceným aspektem spontánní lokomoce byl čas, který zvířata strávila ve středu OF. Největších hodnot, tedy nejdelšího stráveného času ve středu arény, dosáhla mláďata ve věku P12. Jak bylo uvedeno výše, je tento jev nejspíš způsoben faktem, že mláďata v tomto věku nemají rozlepená víčka a jejich orientace je tudíž významně horší než u starších zvířat. V porovnání dle věkových kategorií byly ve věku P15 až P60 naměřené hodnoty výrazně nižší a mezi sebou srovnatelné, což potvrzuje předpoklad, že zvířata mají přirozeně tendenci pohybovat se po krajích, kde se cítí bezpečněji. Signifikantní rozdíly u tohoto testu byly nalezeny u 15denních mláďat s dávkou 3 mg/kg i 10 mg/kg a 18denních mláďat s dávkou 10 mg/kg, která se, v porovnání s kontrolní skupinou,

zdržovala ve středu arény podstatně kratší dobu. Tyto výsledky opět podporují tvrzení, že látka IEM 1460 může u mláďat v tomto věku mírně zvyšovat anxieta. Vzhledem k předloženým výsledkům se nám první nulovou hypotézu nepodařilo zcela vyvrátit. Náš předpoklad, že látka IEM 1460 neovlivní spontánní lokomoci laboratorního potkana, platí pouze u některých věkových skupin. Dle našich výsledků lze říci, že látka IEM 1460 nemá vliv na spontánní lokomoci u 31 a 60denních zvířat, kde nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi zvířaty, kterým byla aplikována látka IEM 1460 a kontrolní skupinou zvířat. Naopak ve věkových kategoriích P21 a P25 jsme u zvířat s látkou IEM 1460 našli signifikantní rozdíly v průměrné rychlosti pohybu a uběhnuté vzdálenosti při spontánní lokomoci. U ostatních věkových kategorií (P12, P15 a P18) nejsou výsledky jednoznačné.

Dále nás zajímalo, zda má látka IEM 1460 vliv na motorickou výkonnost. Jedná se o tzv. provokovanou motoriku, kterou jsme hodnotili pomocí sady motorických testů. Díky znalosti fyziologického ontogenetického vývoje jsme očekávali určitý motorický projev v daném věkovém období. Při hodnocení righting reflexu nebyl mezi jednotlivými skupinami nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Rovněž při hodnocení testu negativní geotaxe v závislosti na dávce jsme u zvířat, kterým byla aplikována látka IEM 1460, nezaznamenali žádné statisticky významné změny oproti kontrolní skupině. Dle naměřených hodnot lze pouze sledovat určitou tendenci ke zpomalování reakce se zvyšující se dávkou. Signifikantní rozdíl byl zaznamenán pouze při hodnocení dle věku, který potvrzuje předpoklad, že se zvyšujícím se věkem dochází ke zrychlování reakce. U testu horizontální hrazdy, neboli Bar holding testu, nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami (C, 3 mg/kg a 10 mg/kg). U tohoto testu jsme od věku P12 pozorovali pozvolný nárůst času, po který se zvířata na hrazdě udržela, který ustal u 25denních zvířat zřejmě z důvodu nedostatečné výšky hrazdy, viz výše. Jelikož tento test hodnotí zejména sílu předních končetin, lze konstatovat, že látka IEM 1460 nemá na sílu předních končetin žádný vliv. Další v pořadí následoval test na svislém žebříku, u kterého jsme opět nezaznamenali signifikantní rozdíly mezi zvířaty, jimž byla aplikována látka IEM 1460 a kontrolami. Dle výsledků platí, že starší zvířata dokončila test v rychlejších časech. U testu chůze po horizontálním žebříku jsme zvolili dvě varianty – pravidelný a nepravidelný horizontální žebřík a ani u jednoho nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami. V obou testech se potvrdil náš předpoklad, že s věkem dochází k postupnému zkracování času, potřebného pro překonání žebříku, a zároveň se snižuje počet provedených chyb. Posledním testem pro hodnocení motorické výkonnosti, jež byl v této práci zařazen, je test chůze na rotarodu. Z důvodu vysokých nároků na koordinaci pohybu jsme tento využili pouze u 60denních zvířat. Srovnání lze tedy udělat pouze mezi dvěma variantami testu, které jsme využili, a to chůzi na rotarodu při rychlosti 15 otáček/min a 20 otáček/min. U testu při rychlosti 15 otáček/min nalézáme statisticky významné změny motorické výkonnosti, ve smyslu

kratších dosažených časů, u obou skupin s látkou IEM 1460 oproti kontrolní skupině. U druhé varianty (20 otáček/min) nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl.

Shrnutí těchto výsledků ukazuje, že látka IEM 1460 nemá při provedení většiny námi zvolených testů žádný vliv na motorickou výkonnost testovaných zvířat. Odlišné jsou však výsledky u testu chůze na rotarodu, kvůli nimž nelze jednoznačně potvrdit naši druhou alternativní hypotézu, že látka IEM 1460 neovlivní motorickou výkonnost testovaných zvířat. Je možné, že vliv látky IEM 1460 se projeví pouze při koordinačně náročných situacích, jakou je právě chůze na rotarodu. Toto tvrzení však není dostatečně podloženo, proti němu mluví rozdílný výsledek testů se dvěma rychlostmi otáčení a k jeho prokázání by byla potřeba dalších testů.

Vzhledem k výše uvedeným výsledkům potvrzujeme třetí alternativní hypotézu, která říká, že účinek látky IEM 1460 na motoriku není výraznější u mladších zvířat. Tuto hypotézu jsme stanovili v závislosti na předešlých studiích, ve kterých nebyl potvrzen předpoklad, že vliv látky IEM 1460 s věkem klesá. (Soukupová, 2016; Szczurowska a Mareš, 2015) Tento předpoklad pramení z poznatku Maganazika et al., který ve své studii říká, že v raných stádiích vývoje převládá zastoupení needitovaných GluA2 podjednotek, na které se látka IEM 1460 váže. (Maganazik et al., 1997) Soukupová sice ve své práci zaznamenala největší vliv látky na motoriku 12denních mláďat, avšak vliv na mláďata ve věku P18 byl menší než ve věku P25, což předpoklad, že se zvyšujícím se věkem účinek látky klesá, nepotvrdilo. K obdobným výsledkům došli i Szczurowska a Mareš. (Soukupová, 2016; Szczurowska a Mareš, 2015) V této práci byl pozorován největší účinek látky na spontánní lokomoci u mláďat ve věku P18 – P25. U 31denních a 60denních zvířat byl účinek látky na spontánní lokomoci i motorickou výkonnost minimální, s výjimkou testu chůze na rotarodu. U nejnižších věkových kategorií (P12 a P15) se dle výsledků lze přiklonit k tvrzení, že látka IEM 1460 neovlivňuje zásadním způsobem motoriku těchto mláďat. Tento výsledek se liší od již zmíněného výsledku Soukupové (2016), která ve své práci zaznamenala největší vliv látky na motoriku právě u 12denních zvířat. Důvodem rozdílného výsledku však může být fakt, že mláďata nejvíce ovlivnila dávka 20 mg/kg, která v tomto výzkumu nebyla aplikována u žádné skupiny zvířat.

Přestože bylo nalezeno několik statisticky významných rozdílů mezi motorikou zvířat, jimž byla aplikována látka IEM 1460 a kontrolní skupinou, a nepodařilo se nám tedy jednoznačně prokázat, že látka IEM 1460 nemá žádné negativní účinky na motoriku, nebyly nalezeny natolik významné odchylky, jež by látku IEM 1460 vyřadily z preklinických studií. Dle našeho názoru je tato látka, s již prokázanými antikonvulzivním efektem, vhodným kandidátem pro další studie hodnotící účinky látky na různé systémy organismu.

6 ZÁVĚR

Smyslem této práce bylo zhodnotit efekt potenciálního věkově specifického antikonvulziva, látky IEM 1460, na motoriku laboratorního potkana. Pro testování spontánní lokomoce byl využit test Open field, kde bylo hodnoceno několik aspektů spontánní hybnosti, a pro hodnocení motorické výkonnosti byla vybrána řada specifických motorických testů, které byly zvoleny s ohledem na věk zvířete a technické možnosti laboratoře. Pro výzkum bylo použito 30 laboratorních potkanů, jimž byla opakovaně intraperitoneálně aplikována látka IEM 1460 v objemu 3 nebo 10 mg/kg hmotnosti a kteří byli od 12. postnatálního dne života opakovaně testováni pomocí vybraných motorických testů. Jejich výsledky byly porovnávány s kontrolní skupinou, které byl aplikován fyziologický roztok. Díky opakovaným testováním jednotlivých zvířat od 12. až do 60. postnatálního dne života (každé zvíře bylo testováno celkem 7×), lze hodnotit i dlouhodobý vliv látky na motoriku zvířete.

Přestože byl u několika zvolených testů zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami (C, 3 mg/kg, 10 mg/kg) a nebylo možné jednoznačně potvrdit všechny stanovené alternativní hypotézy, žádné výsledky nebyly natolik významné, aby značily hrubé porušení motoriky. Látka IEM 1460 je tedy vhodným kandidátem pro další výzkum.

7 SEZNAM ZKRATEK

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-izoxazol propionová kyselina
AP	akční potenciál
ATD	amino-terminální doména
CNS	centrální nervový systém
CTD	intracelulární karboxyl-terminální doména
EEG	elektroencefalografie
EMG	elektromyografie
EPSP	excitační postsynaptický potenciál
GABA	gamma-aminobutyrová kyselina
GluR	glutamátový receptor
IEM 1460	1-trimethylammonio-5-(1-adamantin-methylammonio-pentan) dibromid
iGluR	ionotropní glutamátový receptor
IPSP	inhibiční postsynaptický potenciál
LBD	ligand vázající doména receptoru
LTD	dlouhodobá (long-term) deprese
LTP	dlouhodobá (long-term) potenciace
M1, M3, M4	membránu překlenující segmenty receptoru
M2	„navracející se smyčka“ (reentry) v receptoru
mGluR	metabotropní glutamátový receptor
NMDA	N-methyl-D-aspartát
OF	Open field
PTZ	pentylenetetrazol
Q	glutamin
R	arginin
RNA	ribonukleová kyselina
TMD	transmembránová doména

8 SEZNAM LITERATURY

- ALTMAN, J. a K. SUDARSHAN. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal behavior*. 1975, 23(4), 896-920. ISSN 0003-3472.
- AMBLER, Z. *Základy neurologie: [učebnice pro lékařské fakulty]*. 7. vyd. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-807-2627-073.
- ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2003, 27(1), 3-18. DOI: 10.1016/S0149-7634(03)00005-8. ISSN 01497634.
- BOLSHAKOV, K.V., K.H. KIM, N.N. POTAPJEVA, V.E. GMIRO, D.B. TIKHONOV, P.N. USHERWOOD, I.R. MELLOR a L.G. MAGAZANIK. Design of antagonists for NMDA and AMPA receptors. *Neuro-pharmacology*. 2005, 49(2), 144—155. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2005.02.007. ISSN 0028-3908.
- BOROWICZ, K.K. a M. BANACH. Effect of IEM 1460 - a selective antagonist of GluR2 lacking AMPA receptors - on the action of conventional antiepileptic drugs against maximal electroshock mice. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2007, 1(1), 39-40. ISSN 1898-7516.
- BOWIE, D. Iontropic glutamate receptors & CNS disorders. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*. 2008, 7(2), 129-43. DOI: 10.2174/187152708784083821. ISSN 18715273.
- BROCARD, F., L. VINAY a F. CLARAC. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. *Developmental Brain Research*. 1999, 117(1), 81-89. DOI: 10.1016/S0165-3806(99)00101-7. ISSN 01653806.
- BROOKS S.P. a S.B. DUNNETT. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2009, 10(7), 519-29. DOI: 10.1038/nrn2652. ISSN 14710048.
- BROWNE, T.R. a G.L. HOLMES. *Handbook of epilepsy*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, c2008. ISBN 07-817-7397-0.
- BULDAKOVA, S.L., V.S. VOROBEV, I.N. SHARONOVA, M.V. SAMOILOVA a L.G. MAGAZANIK. Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460. *Brain Research*. 1999, 846(1), 52-58. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01970-8. ISSN 00068993.
- BULDAKOVA, S.L., K.K. Kim, D.B. TIKHONOV a L.G. MAGAZANIK. Selective blockade of Ca²⁺ permeable AMPA receptors in CA1 area of rat hippocampus. *Neuroscience*. 2007, 111, 88—99. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.09.005. ISSN: 0306-4522
- CALAMANDREI, G. Ethological and methodological considerations in the use of newborn rodents in biomedical research. *Annali dell'Istituto superiore di sanita*. 2004, 40, 195-200.
- CLANCY, B., R.B. DARLINGTON a B.L. FINLAY. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience*. 2001, 105(1), 7-17. DOI: 10.1016/S0306-4522(01)00171-3. ISSN 03064522.

- CLARAC, F., L. VINAY, J.R. CAZALET, J.C. FADY a M. JAMON. 1998. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews*. 28(1-2), 35-43. DOI: 10.1016/S0165-0173(98)00024-1. ISSN 01650173.
- CLARAC, F., F. BROCARD a L. VINAY. The maturation of locomotor networks. *Progress in Brain Research*. 2004, 143, 57-66. ISSN 0079-6123.
- CLARKE, K.A. Differential fore- and hindpaw force transmission in the walking rat. *Physiology and Behavior*. 1995, 58(3), 415 - 419. DOI: 10.1016/0031-9384(95)00072-Q. ISSN 00319384.
- CUMMINGS, B. J., Ch. ENGESSER-CESAR, G. CADENA a A. J. ANDERSON. Research report: Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behavioural Brain Research*. 2007, 177(2), 232-241. DOI: 10.1016/j.bbr.2006.11.042. ISSN 01664328.
- FIEST, K M., K. M. SAURO, S. WIEBE, et al. Prevalence and incidence of epilepsy. *Neurology*. 2017. 88(3):296-303. DOI: 10.1212/WNL.0000000000003509.
- GANONG, W.F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd. Praha: Galen, c2005. ISBN 80-726-2311-7.
- GATES, H., A. MALLON a S.D.M. BROWN. High-throughput mouse phenotyping. *Methods*. 2011, 53(4), 394-404. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.12.017. ISSN 10462023.
- GEISLER, H.C., J. WESTERGA a A. GRAMSBERGEN. Development of posture in the rat. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 1993, 53(4), 517-523. ISSN 0065-1400.
- GEISLER, H., I. VAN DER FITS a A. GRAMSBERGEN. The effects of early vestibular deprivation on the motor development in the rat. *Behavioural Brain Research*. 86, 1, 89-96, June 1, 1997. ISSN: 01664328.
- GMIRO, V.E., S.E. SERDYUK a O.M. EFREMOV. Peripheral and central routes of administration of quaternary ammonium compound IEM-1460 are equally potent in reducing the severity of nicotine-induced seizures in mice. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2008, 146(1), 18-21. ISSN 1573-8221
- GRAMSBERGEN, A. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development?. *Neuroscience*. 1998, 22(4), 547-553. DOI: 10.1016/s0149-7634(97)00043-2.
- GUIRE, E.S., M.C. OH, T.R. SODERLING a V.A. DERKACH. Recruitment of calcium-permeable AMPA receptors during synaptic potentiation is regulated by CaM-kinase I. *The Journal Of Neuroscience: The Official Journal Of The Society For Neuroscience*. 2008, 28(23), 6000-9. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0384-08.2008. ISSN 15292401
- HSU, Ch., T. WANG, S.T. HOU, T. CHIN a Y. CHANG. Quantitative study of the developmental changes in calcium-permeable AMPA receptor-expressing neurons in the rat somatosensory cortex. *The Journal of Comparative Neurology*. 2010, 518(1), 75-91. DOI: 10.1002/cne.22211. ISSN 00219967.

- CHEN, S.R., H.Z. ZHOU, H.S. BYUN a H.L. PAN. Nerve injury increases GluA2-lacking AMPA receptor prevalence in spinal cords: functional significance and signaling mechanisms. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 2013, 347(3), 765-72. DOI: 10.1124/jpet.113.208363. ISSN 15210103.
- JAMON, M. The early development of motor control in neonate rat. *Comptes Rendus Palevol*. 2006, 5(3-4), 657-666. ISSN 1631-0683.
- JIANG, J., V. SUPPIRAMANIAM a M.W. WOOTEN. Posttranslational Modifications and Receptor-Associated Proteins in AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Neurosignals*. 2007 (15), 266-282. DOI: 10.1159/000105517. ISSN: 1424-8638
- KEW, J.N.C. a J.A. KEMP. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology*. 2005, 179(1), 4-29. DOI: 10.1007/s00213-005-2200-z. ISSN 00333158.
- KITTNAR, O. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- KLECKNER, N.W. a R. DINGLELINE. Requirement for Glycine in Activation of NMDA Receptors Expressed in Xenopus Oocytes. *Science*. 1988, 241(4867), 835-837. ISSN 00368075.
- KOMÁREK, Vladimír. Věkově vázané epileptické syndromy u dětí. *Pediatric pro praxi*. 2004, 2004(5), 233-235. ISSN 1803-5264.
- KOMÁREK, V., P. URBAN, P. BOČAN, I. REKTOR. Epilepsie. In: JEDLIČKA, Pavel a Otakar KELLER. *Speciální neurologie*. Praha: Galén, 2005.143 – 172 s. ISBN 80-726-2312-5.
- KOPACH, O., V. KROTOV, J. GONCHARENKO a N. VOITENKO. Inhibition of Spinal Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors with Dicationic Compounds Alleviates Persistent Inflammatory Pain without Adverse Effects. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2016;10:50. doi:10.3389/fncel.2016.00050.
- KRÁLÍČEK, Petr. *Úvod do speciální neurofyziologie*. 3., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Galén, c2011. ISBN 978-80-7262-618-2.
- KUMAR, S.S., A. BACCI, V. KHARAZIA a J. R. HUGUENARD. A Developmental Switch of AMPA Receptor Subunits in Neocortical Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*. 2002, 22(8), 3005-3015. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03005.2002>. ISSN 1529-2401.
- LELARD, T., M. JAMON, J. GASC a P. VIDAL. Postural development in rats. *Experimental Neurology*. 2006, 202(1), 112-124. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.05.018. ISSN 00144886
- LILLIU, V., R. PERNAS-ALONSO, R. DIAZ TRELLES, U. DI PORZIO, A. ZUDDAS a C. PERRONE-CAPANO. Ontogeny of AMPA receptor gene expression in the developing rat midbrain and striatum. *Molecular Brain Research*. 2001, 96(1-2), 133-141. DOI: 10.1016/S0169-328X(01)00280-7. ISSN 0169328x.

- LIU, S.B., M.M. ZHANG, L.F. CHENG, J. SHI, J.S. LU a M. ZHUO. Long-term upregulation of cortical glutamatergic AMPA receptors in a mouse model of chronic visceral pain. *Molecular Brain*. 2015, 8(1), 76. DOI: 10.1186/s13041-015-0169-z. ISSN 17566606.
- MADDEN, D. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2002, 3(2), 91-101. DOI: 10.1038/nrn725. ISSN 1471003X.
- MAGAZANIK, L.G., S.L. BULDAKOVA, M.V. SAMOILOVA, V.E. GMIRO, I.R. MELLOR a P.N. USHERWOOD. Block of open channels of recombinant AMPA receptors and native AMPA/kainate receptors by adamantane derivatives. *The Journal Of Physiology*. 1997, 505 (Pt 3), 655-63. ISSN 00223751.
- MCCUTCHEON, J.E. Age Matters. *European Journal of Neuroscience*. 2009, 29(5), 997-1014. DOI:10.1111/j.1460-9568.2009.06648.x. ISSN 1460-9568
- MENDEZ-GALLARDO, V., M.E. ROBERTO, S.D. KAUER a M.R. BRUMLEY. Posture effects on spontaneous limb movements, alternated stepping, and the leg extension response in neonatal rats. *Physiology*. 2016, 155, 122-130. DOI: 10.1016/j.physbeh.2015.12.001. ISSN 00319384.
- MUIR, G. D. Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. *Brain Research Bulletin*, 2000, 53(5), 719-726. DOI: 10.1016/S0361-9230(00)00404-4. ISSN 03619230.
- NEVŠÍMALOVÁ, S. Epilepsie. In: NEVŠÍMALOVÁ, Soňa, Jiří TICHÝ a Evžen RŮŽIČKA. *Neurologie*. Praha: Galén, c2002. 217 – 226 s. ISBN 80-726-2160-2.
- NAKAGAWA, T., Y. CHENG, E. RAMM, M. SHENG a T. WALZ. Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes. *Nature*. 2005, 433(7025), 545-549. DOI: 10.1038/nature03328. ISSN 00280836.
- OBRADOVIC, Z., S. PANTOVIC, V. ILIC, N. JORGOVANOVIC, M. COLIC, O. GAJOVIC, J. STOJANOVIC a M. ROSIC. The spectral analysis of motion: An "open field" activity test example. *Acta veterinaria*. 2013, 63(5-6), 631-642. DOI: 10.2298/AVB1306631O. ISSN 0567-8315.
- PANDIS, C., E. SOTIRIOU, E. KOUVARAS, E. ASPRODINI, C. PAPTAEODOROPOULOS a F. ANGELATOU. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. *Neuroscience*. 2006, 140(1), 163-175. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.02.003. ISSN 03064522.
- ROKYTA, R. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-802-4748-672.
- RONCA, A., B. FRITZSCH, L.L. BRUCE a J.R. ALBERTS. Orbital spaceflight during pregnancy shapes function of mammalian vestibular system. *Behavioral Neuroscience*. 2008, 122(1), 224-232. <http://dx.doi.org/10.1037/0735-7044.122.1.224>
- SEMPLE, B. D. et al. Brain Development in Rodents and Humans: Identifying Benchmarks of Maturation and Vulnerability to Injury across Species. *Progress in neurobiology*. 2013. ISSN: 0301-0082

- SHORVON, S. D., Emilio PERUCCA, Jerome ENGEL a Patrick ADJEI. *The treatment of epilepsy*. 2016. ISBN 9781118936993.
- SHRINER, A., F. R. DREVER, a G. A. METZ. The development of skilled walking in the rat. *Behavioural brain research*. 2009, 205(2), 426-435. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.07.029. ISSN 01664328.
- SCHLESINGER, F., D. TAMMENA, K. KRAMPFL a J. BUFLER. Two mechanisms of action of the adamantane derivative IEM-1460 at human AMPA-type glutamate receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2005, 145(5), 656-663. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706233. ISSN 00071188.
- SINGER, S.S. a W. M. ZAWADA. *Epilepsy. Magill 19s Medical Guide (Online Edition)*. 2013.
- SOBOLEVSKY, A.I., M.P. ROSCONI a E. GOUAUX. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*. 2009, 462(7274), 745-756. DOI: 10.1038/nature08624. ISSN 0028-0836.
- SOUKUPOVÁ, A. Ovlivnění motoriky mláďat laboratorního potkana specifickým antagonistou AMPA receptorů / Andrea Soukupová; vedoucí práce Pavel Mareš; oponent práce Karel Valeš. 2016.
- STANDLEY, S., G. TOCCO, M. TOURIGNY, G. MASSICOTTE, R.F. THOMPSON a M. BAUDRY. Developmental changes in α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor properties and expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*. 1995, 67(4), 881-892. DOI: 10.1016/0306-4522(95)00075-T. ISSN 03064522.
- SZCZUROWSKA, E. a P. MAREŠ. NMDA and AMPA receptors: development and status epilepticus. *Physiological research*. 2013, 62(1), 21-38. ISSN 1802-9973.
- SZCZUROWSKA, E. a P. MAREŠ. An antagonist of calcium permeable AMPA receptors, IEM1460: Anticonvulsant action in immature rats? *Epilepsy Research*. 2015, 109, 106-113. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2014.10.020. ISSN 09201211.
- VALEŠ K., Š. KUBÍK. Behaviorální metody v neurovědách. *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů : Portál 2. Lékařské fakulty*. 2011. Dostupný z WWW: <<http://mefanet-motol.cuni.cz/clanky.php?aid=1724>>.
- VELÍŠEK, L. *Kapitoly z moderní neurofyziologie a epileptologie*. Praha: Karolinum, 1992. ISBN 978-807-0665-954.
- VINAY, L., F. BEN-MABROUK, F. BROCARD, F. CLARAC, C. JEAN-XAVIER, E. PEARLSTEIN a J. PFLIEGER. Perinatal Development of the Motor Systems Involved in Postural Control. *Neural Plasticity*. 2005, 12(2-3), 131-139. DOI: 10.1155/NP.2005.131. ISSN 2090-5904.
- WHISHAW, I. Q. *The Behavior of the Laboratory Rat a Handbook with Tests*. New York: Oxford University Press, 2004. ISBN 01-980-3684-1.

WOOD, S. L., B.K. BEYER a G.D. CAPPON. Species comparison of postnatal CNS development: functional measures. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 2003, 68, 391-407.

WOODWORTH, K.N., M.R. GRAFE, J. PALMATEER a J. SWIDE. Short- and long-term behavioral effects of exposure to 21%, 40% and 100% oxygen after perinatal hypoxia-ischemia in the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011, 29(6), 629 - 638. DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2011.05.001. ISSN 07365748.