

UNIVERZITA KARLOVA
Fakulta tělesné výchovy a sportu

**Funkční testování po experimentálně vyvolané
fokální mozkové ischemii u laboratorního potkana**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Ivana Vyleťelová

Praha, 2017

Prohlašuji, že jsem závěrečnou diplomovou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne

.....

podpis diplomanta

Evidenční list

Souhlasím se zapůjčením své diplomové práce ke studijním účelům. Uživatel svým podpisem stvrzuje, že tuto diplomovou práci použil ke studiu a prohlašuje, že ji uvede mezi použitými prameny.

Jméno a příjmení:

Fakulta / katedra:

Datum vypůjčení:

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych tímto velmi poděkovala vedoucímu práce doc. MUDr. Jakubu Otáhalovi, Ph.D. za pomoc, ochotu a rady při odborném vedení. Mé poděkování dále patří RNDr. Nině Mikulecké, Ph.D. za umožnění zpracování dat na pracovišti Akademie věd České republiky, odborné školení a připomínkování interpretace výsledků. Rovněž děkuji Mgr. Janu Svobodovi za technickou pomoc a konzultování metodiky sběru dat.

Abstrakt

Název: Funkční testování po experimentálně vyvolané fokální mozkové ischemii u laboratorního potkana

Cíle: Cílem této diplomové práce je navrhnout a otestovat baterii motorických testů, které umožní efektivně posoudit motorický deficit, který vznikne po drobné ischemické lézi primární motorické kůry.

Metody: V experimentální studii bylo použito 16 potkaních samců kmene Long Evans z chovu Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Potkani byli náhodně rozděleni na experimentální a kontrolní skupinu. Ischemická léze byla indukována pomocí fototrombotického modelu pro docílení malého poškození v oblasti motorické kůry mozku. Zvířata byla testována za použití baterie pěti motorických testů – Reaching test, Bar holding test, Rotarod test, Ladder rung walking test a Open field test. Pro analýzu dat byl použit program Sigma Stat3.5®SPSS a Microsoft Excel 2010.

Výsledky: Výsledky testů ukázaly, že vzniklé drobné poškození motorické kůry u laboratorního potkana lze objektivně hodnotit pomocí Reaching testu, který se zaměřuje na úchop přední končetinou a jemnou motoriku. U testů hodnotících převážně lokomoci nebyl nalezen významný rozdíl mezi výkony experimentální a kontrolní skupiny. Podařilo se ověřit, že deficit se projevuje především na funkci horní končetiny. V průběhu času lze pozorovat zlepšení v Reaching testu z hlediska úspěšnosti a dochází k částečné obnově motoriky.

Klíčová slova: cévní mozková příhoda, neurologický deficit, funkční test

Abstract

Title: Functional assessment after experimentally induced focal cerebral ischemia in rat.

Objectives: The aim of this diploma thesis was to design and test a set of motor tests, which provide an effective assessment of motor deficit, which forms after small ischemic lesion of primary motor cortex.

Methods: Experiment was performed in 16 Long Evans rats from breeding in Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Czech Republic. Rats were divided into two groups (experimental and control). Ischemic lesion was induced by a photothrombotic stroke model to affect a small area – a motor cortex. For functional assessment we used five motor tests – Reaching test, Bar holding test, Rotarod test, Ladder rung walking test and Oper field test. For data analysis we used program Sigma Stat3.5®SPSS and Microsoft Excel 2010.

Results: Our findings demonstrate that a small lesion of motor cortex is objectively measurable by Reaching test, which focuses on grip and fine motor skills. Other tests assess mainly gross motor skills and there we did not find a significant difference between experimental and control group. Our findings show that functional deficit manifests mostly in function of upper limb. During the time of the experiment we can see an improvement and increasing success in Reaching test and partial recovery of motor skills.

Keywords: stroke, neurological deficit, functional assessment

OBSAH

1 Úvod.....	9
2 Teoretické podklady	11
2.1 Cévní mozková příhoda	11
2.1.1 Základní rozdělení	11
2.1.2 Klinický obraz.....	12
2.1.3 Klasifikace dle postižené tepny	13
2.1.4 Diagnostika	14
2.1.5 Léčba.....	14
2.1.6 První pomoc při vzniku CMP	15
2.1.7 Období po akutní fázi	16
2.1.8 Prevence.....	16
2.1.9 CMP v ČR.....	16
2.2 Nervová regenerace a reorganizace po CMP.....	18
2.3 Reinervace u experimentálních modelů.....	20
2.4 Funkční poškození a testování experimentálních modelů	22
2.5 Experimentální modely CMP	24
2.6 Testování experimentálních modelů	26
3 Cíle práce	27
4 Experimentální přístup.....	28
4.1 Reaching test:.....	30
4.2 Rotarod test:	32
4.3 Bar holding test:.....	33
4.4 Ladder rung walking test:	34
4.5 Open field:	35
4.6 Vyvolání cévní mozkové příhody (CMP).....	36
4.7 Zpracování a statistické hodnocení dat	36
5 Výsledky	37
6 Diskuze	47
7 Závěr	53
8 Seznam použité literatury	54
Seznam grafů	63
Seznam obrázků.....	64
Přílohy.....	65

Seznam použitých zkratek

ACE – angiotenzin konvertující enzym

AVČR – Akademie věd České republiky

CMP – cévní mozková příhoda

CT – výpočetní tomografie

FAST – face, arm, speech, time

JIP – jednotka intenzivní péče

MCAo – middle cerebral artery occlusion

MCA – middle cerebral artery

MRI – magnetická nukleární rezonance

NPT – nonparetic forelimb training

OF – open field

RB – rose-bengal (belgálská červeň)

RT – reaching test

TIA – tranzitorní ischemická ataka

1 Úvod

Cévní mozková příhoda (dále CMP) je celosvětově páté nejčastější onemocnění způsobující smrt. Je to akutní onemocnění, které je mnohdy příčinou trvalé invalidity. CMP může být také příčinou demence, deprese či epilepsie. Vedle nákladů pro zdravotní pojišťovny a systém sociálního zabezpečení je péče o pacienty po CMP velmi náročná především pro rodiny postižených. Je tedy velkým zájmem celé společnosti zaměřit se na minimalizování vzniku CMP, tedy na prevenci, ale i na účinnou léčbu a terapii po prodělané CMP.

Nedílnou součástí medicíny je výzkum a vývoj nových vyšetřovacích a terapeutických postupů. Jednou z cest je získávání cenných poznatků pomocí experimentálních modelů, v tomto případě konkrétně modelů ischemické či hemoragické cévní mozkové příhody. Tyto modely vedou k lepšímu porozumění procesům, které způsobují poškození mozku či získání informací o účinnosti neuroprotektivních látek. Mezi nejčastěji využívané laboratorní zvíře patří laboratorní myš či potkan. Důvodů je více, ať už se jedná o množství známých údajů o těchto druhích z hlediska fyziologie či morfologie, rychlou dostupnost a vyšší počet mláďat v jednom vrhu či o podobnost cerebrovaskulární cirkulace s člověkem.

Jeden z nejčastějších důsledků CMP je hemiparéza horní končetiny, která je zároveň považována za jeden z nejvíce přetrvávajících a omezujících faktorů a velmi limituje kvalitu života. I z tohoto důvodu je potkan ideálním modelem, protože byla zjištěna veliká podobnost mezi hlodavci a člověkem z hlediska úchopu a jemné motoriky (Jones, 2013).

V minulých dvou letech jsem měla příležitost zúčastnit se jako fyzioterapeutka rekondičních pobytů pro lidi po prodělané CMP. Tyto pobyty pro mne byly velikou zkušeností, setkala jsem se s lidmi s rozličnými následky i příběhy, sdíleli se mnou svá přání a cíle, mezi které patřilo většinou obnovení plné soběstačnosti či řeči. Je přínosné uvědomit si důsledky, které léčba CMP přináší, jak ovlivňuje terapii a kvalitu života pacienta. Fyzioterapie se může jevit vzdálená preklinickému výzkumu s experimentálními modely, ovšem je to relativní. Vidím souvislost mezi fyzioterapií a touto prací, neboť v ordinacích či na lůžkách se setkáváme s pacienty po CMP a i

fyzioterapie se jako součást medicíny může podílet na rozvoji výzkumu v preklinických studiích.

Práce si klade za cíl navrhnout a otestovat sadu motorických testů, které umožní efektivně posoudit motorický deficit, který vznikne po drobné ischemické lézi primární motorické kůry. Cílem je také ověřit, zda-li se tento deficit v průběhu času zlepšuje a dochází tak k částečné obnově motoriky. Pro získání dat byly vybrány vhodné motorické testy dostatečně citlivé pro vyšetření funkčních deficitů. Pro zjištění behaviorálních projevů zvířat byl vybrán jeden test vhodný pro pozorování spontánní explorační aktivity zvířat.

Teoretická část je zaměřena na informace o CMP - základní rozdělení, etiologii, diagnostiku, léčbu a prevenci. Dále shrnuje některé z poznatků o nervové reinervaci a v dalších kapitolách jsou popsány základní experimentální modely a motorické a behaviorální testy. Výzkumná část se zaměřuje na třítydenní experiment a analýzu dat u provedených testů.

2 Teoretické podklady

2.1 Cévní mozková příhoda

Cévní mozkovou příhodu ročně prodělá přibližně 800 000 lidí (Mozzafarian, 2016). V České republice představují cévní mozkové příhody druhou nejčastější příčinu smrti. Ročně zde postihne více než 30 000 lidí. CMP (též iktus, mozková mrtvice nebo mozkový infarkt) je náhle se rozvíjející postižení určité oblasti mozkové tkáně vzniklé v důsledku poruchy krevního zásobení mozku, kdy dochází k úmrtí nervových buněk. K této poruše může dojít buď na podkladě tepenného uzávěru (tzv. ischemická CMP), nebo na podkladě krvácení z mozkové cévy (tzv. hemoragická CMP), případně se může jednat o tranzitorní ischemickou ataku (TIA). Jedním z nejdůležitějších diagnostických úkolů je rozlišit ischemickou a hemoragickou cévní mozkovou příhodou, protože léčba je v obou případech odlišná a nevhodný terapeutický přístup může být pro nemocného fatální. Cévní mozková příhoda je akutní stav, vyžaduje neodkladnou lékařskou pomoc (Ambler, 2006).

2.1.1 Základní rozdělení

Ischemická cévní mozková příhoda

Ischemická cévní mozková příhoda je nejčastějším typem CMP. Vzniká na podkladě trombózy nebo embolie. Trombóza může být žilního (vzniká venostáza) nebo tepenného (vzniká ischemie) typu. Trombus je krevní sraženina, která je přichycena ke stěně cévy a tím snižuje její průsvit, je to proces doprovázející aterosklerózu. Embolie vzniká utržením trombu v cévním řečišti, kdy je sraženina vmetena do užší cévy. V případě odtržení žilního trombu vzniká plicní embolie, embolus je přes pravou síň vmeten do plicnice. V případě otevřeného foramen ovale putuje embolus levou síní do tepenného oběhu a může se dostat i do užší mozkové tepny. Tepenný uzávěr vzniká často na základě srdeční vady, např. fibrilace síní, kdy může dojít k embolizaci z levé síně do tepenného oběhu a opět se může dostat do mozkové tepny. Další možné příčiny mohou být: disekce krční tepny, trombofilní stavy nebo útlak cévních struktur při nitrolební expanzi (Ambler, 2006).

Hemoragická cévní mozková příhoda

Hemoragická cévní mozková příhoda je způsobena rupturou cévy v dané oblasti. Hemoragická CMP je způsobena většinou vysokým krevním tlakem. Následky bývají závažnější, příznaky se rozvíjejí rychleji a stupeň postižení je větší. Společně s projevy CMP se totiž v lebeční dutině zvyšuje nitrolební tlak, který se podílí na rychlém rozvoji příznaků i jejich závažnosti. V extrémních případech může dojít k mozkovému otoku, útlaku centra pro dýchání a srdeční činnost a tak i ke smrti postiženého (Ambler, 2006).

Tranzitorní ischemická ataka (TIA)

TIA se liší od klasické CMP tím, že krevní zásobení je přerušeno pouze krátkodobě. I tato příhoda vyžaduje okamžité lékařské vyšetření a intervenci, protože je obvykle předzvěstí budoucí příhody. Může se projevovat rychle rozvinutými klinickými známkami ložiskového mozkového postižení nebo poruchami vizu, které typicky trvají méně než 1 hodinu, maximálně však 24 hodin (Nevšimalová, 2002).

2.1.2 Klinický obraz

Při vzniku CMP můžeme sledovat některé z následujících příznaků: hemiplegie (slabost až ochrnutí poloviny těla), hemihypestézie (porucha citlivost poloviny těla), afázie (porucha řeči), hemianopsie či jiná porucha vidění, vertigo, další neurologické příznaky dle lokalizace postižení (Ambler, 2006).

U krvácení z cév probíhajících v mozkových obalech se typicky objevuje náhlá silná bolest hlavy s příznaky podráždění mozkových plen (meningeální příznaky – příznak opozice šíje). Při rozsáhlém poškození může všech typů CMP dojít k rychlému vzniku bezvědomí pacienta.

2.1.3 Klasifikace dle postižené tepny

- a. cerebri anterior – hemiparéza s převahou na dolní končetině
 - vlevo – transkortikální motorická afázie, poruchy chování – apatie, abulie nebo ztráta zábran
 - vpravo – motorický nebo prostorový neglect, poruchy chování
- a. cerebri media – hemiparéza až hemiplegie, centrální postižení lícního nervu, hemisenzitivní defekty, poruchy zorného pole a pohledové obrny ke druhé straně
 - léze v oblasti dominance řeči vede k afázii, apraxii, agnózii, léze druhostranná vede k poruše prostorového vnímání
 - uzávěr hlavní horní přední větve – postižení frontálního laloku, faciobrachiálně zvýrazněná hemiparéza, motorická afázie a apraxie
 - uzávěr hlavní dolní zadní větve – převážně senzitivní deficit
 - uzávěr hlavního kmene – postižení basálních ganglií, capsuly interny, hemiparéza až plegie a poruchy citlivosti poloviny těla
 - uzávěry lentikostriálních arterií – vedou k lakunárním infarktům s postižením basálních ganglií a capsuly interny, případně s extrapyramidovými motorickými projevy
- a. cerebri posterior
 - uzávěr segmentu před a.communicans posterior – senzomotorická hemiparéza a hemianopsie na dolní končetině
 - uzávěr segmentu za a. communicans posterior
 - vlevo: hemianopsie, neuropsychologický deficit (alexie, konstrukční apraxie, agrafie, akalkulie), senzorická afázie
 - vpravo: porucha prostorového vnímání, vizuální neglect syndrom doleva, prosopagnosie (obličejová slepota)
- a. basilaris – v klinickém obrazu jsou různorodé kombinace postižení mozkového kmene (dysfonie, obrna měkkého patra, škytavka, porucha algické a termické citlivosti obličeje, tinitus, parézy horizontálního či vertikálního pohledu), mozečku, talamu, temporálního a okcipitálního laloku (Lukáš, 2014, Ambler, 2006).

2.1.4 Diagnostika

Při vzniku příznaků CMP je nutná neodkladná hospitalizace na iktové jednotce se zajištěním jednotky intenzivní péče (JIP). Léčba se rozlišuje podle toho, o který typ CMP se jedná a zároveň je velmi zásadní časový údaj o vzniku ložiskové symptomatiky. Ihned po přijetí má být provedena počítačová tomografie (CT) nebo magnetická nukleární rezonance (MRI). Neurologické vyšetření není pro jednotlivé typy CMP specifické (Kalita, 2006).

2.1.5 Léčba

Léčba akutního ischemického iktu

Zásadním bodem anamnesy je časový údaj, kdy byl pacient naposledy bez obtíží. Např. pacient, který se probudí ráno s již rozvinutými příznaky a který byl bez obtíží večer před spaním, bude nejspíše již mimo terapeutické okno pro trombolytickou léčbu. Cílem léčby je co nejrychlejší obnova krevního průtoku v postižené oblasti mozku a ochrana tkáně přiléhající k postižené oblasti, aby byla zachována funkce i přes snížené prokrvení. Do 4,5 hodin od vzniku CMP se zahajuje celotělová nitrožilní trombolýza, do 6 hodin od vzniku CMP intraarteriální trombolýza. Do 8 hodin od vzniku CMP se provádí angioplastika - mechanické zprůchodnění příslušné tepny, spojené s odstraněním blokujícího aterosklerotického plátu. Pokud není možno pacienta léčit podáním trombolytické terapie, přistupuje se k antiagregační léčbě, podání ACE inhibitorů a statinů (Kalita, 2006).

Léčba akutního hemoragického iktu

U CMP vzniklé po krvácení je nutné identifikovat zdroj krvácení, poté je zásadní snížení nitrolebního tlaku a předcházení komplikacím v podobě dalších iktů. Neurochirurgická léčba je používána u krvácení do oblasti mozečku a u krvácení do povrchových oblastí mozku, někdy je pro rekonstrukci cévy nutná kraniotomie (Kalita, 2006).

2.1.6 První pomoc při vzniku CMP

Při vzniku CMP je klíčová každá minuta a proto se celosvětově šíří informace, jak rozeznat příznaky a jak člověku co nejlépe a nejrychleji pomoci. Je nezbytné okamžitě vyhledat lékařskou pomoc, čím dříve, tím spíše se minimalizuje nervové poškození. Existuje zkratka „FAST“ (obr. 1) pro lepší zapamatování varovných signálů.



Obrázek 1 Mezinárodní zkratka FAST, která pomáhá rozpoznat příznaky CMP (American Heart Association 2017)

Zkratka FAST byla vytvořena v USA a jednotlivá slova ve volném překladu vyjadřují následující fakta:

- Face (obličej) – viditelný spadlý koutek úst.
- Arms (paže) – slabost jedné končetiny, pokles, neschopnost zvednout paži či asymetrické zvednutí paží.
- Speech (řeč) – nezřetelná či jinak neobvyklá řeč, neschopnost opakovat věty.
- Time (čas) – při sebemenším podezření zavolat záchrannou službu a zaznamenat čas vzniku symptomů.

Další možné patrné symptomy: slabost celé poloviny těla, rozostřený zrak či šero postihující jedno oko, silná bolest hlavy bez zjevné příčiny, závratě a poruchy rovnováhy. Rizikové faktory pro vznik CMP: již prodělaný iktus, vysoký krevní tlak, kouření, diabetes, srdeční choroby (Stroke: First Aid, 2014).

2.1.7 Období po akutní fázi

CMP je život měnící událost, která má na člověka a jeho okolí jak fyzický, tak psychický dopad. Po stabilizaci stavu v akutní fázi začíná rehabilitace s cílem co největší funkční obnovy postiženého. Rehabilitace zahrnuje logopedii, fyzioterapii, ergoterapii, docházení do různých skupin, zapojení rodiny. Ideálem je zlepšení či obnova srozumitelné řeči, samostatnost a soběstačnost, zlepšení koordinace, vykonávání běžných denních aktivit a pozitivní psychologický účinek (Winstein, 2016). Fyzioterapie se rozděluje podle stadia léčby CMP a přizpůsobuje se daným možnostem, ale i cílům pacienta. Zahrnuje polohování, pasivní pohyby, nácvik pohybů na lůžku, posazování, trénink rovnováhy, vstávání, chůzi. V dalších fázích se fyzioterapie zaměřuje na jemnější izolované pohyby, úchopy, potlačování patologických pohybových vzorů, nácvik správných stereotypů. Mezi speciální metodiky, které se používají v léčbě CMP, patří převážně proprioceptivní neuromuskulární facilitace (PNF), Vojtova reflexní lokomoce, Bobath concept (Kolář, 2009) a další metody, rovněž se využívá robotika či virtuální realita (Poli, 2013).

2.1.8 Prevence

Pro prevenci CMP platí obecná pravidla zdravého životního stylu: zdravé stravování, udržování normální váhy, pravidelné cvičení, vyvarovat se kouření a alkoholu, kontrola krevního tlaku, glykémie, pravidelný spánek, dodržování farmakologické terapie (Feigin, 2007).

2.1.9 CMP v ČR

Přestože ČR stále patří k zemím s vyšší úmrtností na CMP než ve většině rozvinutých zemích, křivka ukazující letalitu z důvodu CMP má od začátku devadesátých let klesající charakter. Tento pokles se dostavil v porovnání s USA a západními státy Evropy zhruba o 30 let později, měl ale rychlejší spád. Příčina bude v primární i sekundární prevenci CMP, která zahrnuje převážně kontrolu hypertenze, léčbu fibrilace síní a antiagregační léčbu, i když prevalence CMP jako taková se nesnížila. Možným důvodem je stárnutí populace a přesnější diagnostika. Recidivy, kterým se snaží předcházet sekundární prevence, představují až čtvrtinový podíl v

celkovém počtu vzniklých CMP. Rekurence je nejvyšší v několika prvních týdnech a riziko vzniku další CMP tvoří až 10-15% (Bruthans, 2009).

Pokles mortality lze obecně vysvětlit několika příčinami. První je zlepšení primární i sekundární prevence CMP (pokles výše krevního tlaku, účinně léčená hypertenze). Dalším vysvětlením je pokles letality onemocnění v důsledku účinnější léčby, které je dáno především výrazným zlepšením diagnostiky a pokroky intenzivní péče než vlivem kvalitativní změny léčby. Podle starších studií až 30 % pacientů umíralo po CMP do jednoho roku, průměrnou dobu přežití bylo 4–5 let. Téměř polovina přeživších nebyla soběstačná při běžných denních aktivitách a tak byla závislá na pomoci druhých lidí. Situace se oproti dřívějším letům změnila k lepšímu, s pokrokem v oblasti prevence a léčby CMP je letalita nižší, stejně tak doba přežití a míra potřeby dopomoci je příznivější, než uvádějí starší studie. Obecně lze konstatovat, že ačkoliv se incidence a prevalence CMP významně nezvýšila, letalita a mortalita výrazně klesla, přesto jsou ale čísla stále velmi vysoká (Zvolský, 2012).

2.2 Nervová regenerace a reorganizace po CMP

Ischemická cévní mozková příhoda je charakterizována gradientem sníženého průtoku krve – jádrem s význačným snížením průtoku a poškozením tkání a penumbrou, kde průtok krve a degenerativní reakce nejsou tolik extrémní (Heiss, 2012). Ztráta dodávky krve zahajuje kaskádu metabolické poruchy, mitochondriálního kolapsu, oxidačního stresu a zánětu, která, pokud není rychle zvrácena, vede k nevratnému poškození (Doyle, 2008).

Po proběhlé CMP obvykle probíhá určité spontánní funkční zlepšení. CMP podněcuje regenerační odpovědi v podobě reorganizace mezi přeživšími neurony. Zvažují se dva mechanismy, které tomu přispívají – jeden je, že některé oblasti jsou jen dočasně poškozené co se týče nervové aktivity, metabolismu a krevního oběhu – tyto oblasti jsou přímo spojené s poškozenou tkání. Druhý mechanismus je, že přeživší neurony reorganizují své propojení tak, že se podpoří částečná obnova funkce, případně kompenzační náhrada ztracené funkce. Jsou to vzájemně propojené mechanismy. Nicméně i přesto přechází většina akutních postižení do chronicity. Nervová reorganizace po CMP je iniciována buněčnými reakcemi na degeneraci. Axony a synapse postižených neuronů degenerují v dalších oblastech mozku, což podněcuje regenerační reakce a nové spoje mezi přeživšími neurony (Doyle, 2008). V těchto nových spojích se skrývá velký potenciál pro variabilitu v nových vzorech a funkční přínos (Jones, 2015).

V dozrálém centrálním nervovém systému je axonální reinervace dosažena zejména kolaterálním “klíčením” (růstem nových spojů) zbývajících projekcí spíše než dlouhým růstem nových axonů. Axonální degenerace je hlavní spouštěč růstu pro zbylé axony (Collyer, 2014). Čím aktivnější je zbylá aferentace a neurální aktivita, tím víc se přispívá k reinervaci, což tvoří slibný terapeutický cíl (Carmichael, 2006).

Některé výzkumy neuronální reorganizace po CMP se soustředí na reorganizaci motorického systému a přispění ke zlepšení funkce horní končetiny. Behaviorální intervence jako motorický rehabilitační trénink může utvářet neuronální reorganizaci. Pouze rehabilitační trénink je obvykle nedostačující pro obnovu normální funkce, ale

může být zlepšen v kombinaci s další léčbou. Mnoho prvků reorganizace motorického systému je citlivých na neurální aktivitu a další manipulace. Například elektrostimulace kontralaterálního kortexu zvyšuje růst kontralaterálních kortikospinálních projekcí (Jones, 2015).

2.3 Reinervace u experimentálních modelů

Hemiparéza je nejčastější důsledek CMP, je to kvůli tomu, že nejčastěji postiženou oblastí je cévní zásobení motorické kůry a přilehlých oblastí, což je oblast zásobení a.cerebri media. U CMP jde obvykle o “odpojení” kortexu od mezimozku, mozkového kmene a míchy v důsledku poškození descendentních subkortikálních drah, přímého poškození kortexu či kombinací obojího. Tím je ztracen signál motorických neuronů z kortexu do subkortikálních oblastí. Zbylé nepoškozené neurony pak vysílají nové výběžky pro reinervaci do těchto subkortikálních oblastí (Jones, 2015).

Bylo prokázáno, že pohyby končetin hlodavců jsou velmi podobné pohybům končetin primátů, mezi které patří i člověk a proto se studie zaměřují právě na experimentální modely s hlodavci a možnosti zlepšení terapeutických postupů (Alaverdashvili, 2008).

Většina studií zabývající se experimentálními modely zvířat a subkortikální reinervace zkoumaly projekci vysílající z nepoškozené primární motorické kůry, kdy po kortikálním infarktu či uzávěru a cerebri media dochází k reinervaci striata (Carmichael, 2006) či míchy (Liu, 2009). Nicméně neurony z ipsilaterálního (poškozeného) kortexu mohou rovněž stav ovlivnit – kortikospinální projekce zadních končetin, které běžně míří do nižších etáží míchy, mohou reinervovat do cervikální části míchy (Starkey, 2012).

Studie Liu et al (2009) tvrdí, že pokud převažuje reinervace z kontralaterální strany, přispívá to ke vzniku abnormálních svalových synergií na paretické končetině. Přímé poškození motorické kůry vede k rozsáhlé remodelaci a reorganizaci zbylých dendritů. Dendrity částečně degenerují a následuje různý stupeň opětovného růstu v průběhu času (Chen, 2011).

U dospělých potkanů léze M1 vede k růstu nových intrakortikálních axonů z oblasti analogické naší premotorické kůře do postižené oblasti (Benowitz, 2010). Ve zvířecích studiích funkce paretické končetiny byla silně spojena s reorganizací v

motorické (Tennant, 2015) a somatosenzorické (Brown, 2009) kůře poškozené hemisféry v souvislosti s návratem k běžným aktivitám.

Účinky rehabilitačního tréninku se liší podle délky tréninku, věku zvířete a načasování (Tennant, 2015). U zvířecích studií se ukázalo, že rehabilitační trénink zahájený během prvních týdnů po CMP vede k lepším funkčním výsledkům a k hlubším nervovým změnám než pozdější trénink (Park, 2010). Časně trénování paretické končetiny a behaviorální intervence působí proti nechtěným účinkům tréninku neparetické končetiny (Jones, 2011).

Okabe (2017) tvrdí, že růst axonů u potkanů z kontralaterální motorické kůry je zvýšen tréninkem, který je zahájen pátý den po CMP, ne dříve, ne později. Zároveň také tvrdí, že současné znalosti o časovém průběhu neuroanatomické reorganizace nejsou ucelené. Je jasné jen to, že proces trvá dlouhou dobu (měsíce a déle) a nejdynamičtější je ihned po zranění (Carmichael, 2006, Rehme, 2013). V rámci rehabilitace je nutné lépe porozumět závislosti nervové obnovy na času. (Dromerick, 2009).

2.4 Funkční poškození a testování experimentálních modelů

Funkční poškození senzomotorické oblasti se projevuje behaviorálními změnami. Přírozenou odpovědí na disabilitu jedné končetiny je naučení nových způsobů použití druhé končetiny pro vykonávání každodenních aktivit. Přeživší CMP se obvykle naučí spoléhat se na neparetickou končetinu, což je velmi častá a hluboce zakořeněná forma behaviorální kompenzace (Levin, 2009). Tím se ještě více podporuje nepoužívání paretické končetiny. Bylo prokázáno, že nepoužívání paretické končetiny a navíc učení nových schopností zdravou končetinu rozvrací nervové mechanismy pro funkční zlepšení paretické končetiny (Jones, 2015). Získání nových manuálních schopností závisí u nepoškozeného mozku na strukturální a funkční reorganizaci motorického kortexu (Xu, 2009). Po CMP se tato schopnost získávání překrývá s probíhajícím degenerativním a regeneračním procesem jako odpověď na poškození (Carmichael, 2006).

Kompenzace v podobě spoléhání se na funkčně "lepší" končetinu po CMP přispívá k trvající dysfunkci paretické končetiny tím, že se podporuje její nepoužívání. Nedávné poznatky potvrzují, že učení nové motorické schopnosti s neparetickou končetinou redukuje spontánní obnovu a limituje funkční zlepšení vyplývající z postupného rehabilitačního tréninku paretické končetiny po jednostranné ischemické lézi motorického kortexu u potkanů (Allred, 2008). Ve studii Allreda (2005) se zjistilo, že po prodělané lézi motorické kůry u laboratorního potkana došlo při trénování neparetické končetiny k prohloubení dysfunkce paretické končetiny. Spoléhání se na neparetickou končetinu má vliv na poškozenou hemisféru a znemožňuje funkční zlepšení postižené končetiny. MacLellan (2013) tvrdí, že tyto následky bývají dlouhodobé a trvají dlouho po skončení tréninku.

Obecným důsledkem tedy je, že pouhým přijetím a používáním přirozených strategií pro funkční návrat do běžných denních činností si mohou někteří přeživší lidé po CMP bezděčně překazit potenciál pro zlepšení funkce paretické končetiny (Jones, 2013). Na druhou stranu je v životě nutné se nějakým způsobem přizpůsobit a být co možná nejvíce soběstačný, ideálem by tedy mohlo být nalezení nějakého kompromisu.

Učení nové schopnosti na jedné končetině u zdravých zvířat běžně neprokáže tak význačný pokles u druhé končetiny. Například u kontrolní skupiny potkanů (v originálu “sham-operated”) speciální trénink jedné končetiny (v originálu “skilled reaching”) neměl žádný výrazný efekt na druhou končetinu (Allred, 2008). Z výše uvedených studií vyplývá, že není vhodné používat po CMP pouze neparetickou končetinu (Jones, 2013).

Rehabilitační trénink paretické končetiny podporuje obnovu pohybu přední končetiny a stejně tak růst dendritů a zrání synapsí v motorickém kortexu. Účinek rehabilitačního tréninku je narušen přednostním trénováním neparetické končetiny. Jeden z klinických rehabilitačních přístupů byl vyvinut s cílem čelit “naučenému nepoužívání”. Jedná se o omezení používání neparetické končetiny po většinu času během bdění v období intenzivního rehabilitačního tréninku paretické končetiny (Lang, 2013). Klinické studie podporují účinnost tohoto přístupu pro zlepšení motorické funkce po CMP (Kwakkel, 2015).

2.5 Experimentální modely CMP

Od konce sedmdesátých let byly vyvinuty experimentální modely cerebrální ischemie s cílem identifikovat mechanismy, které způsobují poškození tkání a poskytnout základ pro vývoj nových terapií po CMP na preklinické úrovni. Experimentální modely ischemické či hemoragické cévní mozkové příhody u laboratorní myši či potkana jsou důležitým nástrojem pro získání a charakterizaci nových terapeutických postupů. V posledních letech bylo vyvinuto několik modelů cerebrovaskulárních onemocnění. Tyto modely se vyznačují širokou paletou technik používaných k indukci mozkových infarktů. Modely slouží ke studiu patofyziologie CMP a procesů, které způsobují poškození mozku. Také testují účinnost předpokládaných neuroprotektivních látek nebo regeneračních čidel, které by mohly sloužit pro léčbu pacientů po CMP (Bacigaluppi, 2010).

Experimentální modely se rozlišují na globální či fokální podle velikosti indukované léze. Globální ischemie je vyvolána chirurgickou okluzí hlavních cév, což vede k téměř úplnému přerušení cerebrální cirkulace. Naproti tomu fokální ischemie je způsobena okluzí jedné tepny kmene (často je to a.cerebri media). U většiny pacientů dojde trombolýzou k rekanalizaci mozkové tepny, což vede k reperfuzi (obnově dodávky kyslíku a výživy) v oblasti ischemie. Mnohé experimentální modely fokální léze rovněž fungují na této bázi a tak se modely mohou dale dělit podle toho, zdali k reperfuzi dojde či ne. U potkanů reperfuze krátce po okluzi redukuje výsledný infarkt a neurologický deficit je méně závažný. Pozitivní účinky jsou viditelné, dojde-li k reperfuzi do 1,5 hodiny. U lidí je účinná doba trombolýzy 3-6 hodin od nástupu příznaků mrtvice (van der Staay, 2010).

MCA - okluze

MCA-okluze (v originálu “middle cerebral artery occlusion”) je velmi častým experimentálním modelem pro vyvolání trvalé fokální ischemie u laboratorní myši nebo potkana. Metoda MCAo umožňuje vytvoření trvalé i přechodné ischemie. Technika nejčastěji využívá nylonové vlákno o daném průměru, princip modelu stojí na dočasném přerušení krevního průtoku a. cerebri media (cestou a.carotis interna), po

vyndání vlákna dochází k reperfuzi. Tato technika s sebou nese značná rizika a i přes dodržování všech doporučení může dojít ke komplikacím. K rizikům patří zejména hemoragie způsobená vláknem, které bylo zasunuto příliš daleko nebo mohlo být zasunuto špatně. Dále může být materiál vlákna nedostatečně flexibilní nebo vlákno může být příliš silné v průměru. Model MCAo se vyznačuje četnými variantami, které se liší v obturaci dalších kolaterálních přítoků a hlavně vznikem velké léze. Výhodou je absence poškození kraniálních struktur.

Hemoragický model

Hemoragické zvířecí modely jsou o něco vzácnější než ischemické. Hematomy (používá se fyziologický roztok nebo vlastní krev) jsou injekčně vpraveny pod duru, čímž vznikne subdurální hematom, případně do cerebrospinální tekutiny za vzniku subarachnoidálního krvácení.

Chirurgický model

Chirurgický model je rovněž postaven na okluzi MCA, ale model vyžaduje kraniektomii a incizi dura mater. MCA je následně okludována nejčastěji kauterizací (pálení tkáně elektrickým proudem). Metoda umožňuje vytvoření trvalé i přechodné ischemie. Lze uskutečnit okluzi v různém průběhu tepny (proximální či distální okluze). Výhodou je dobrá reprodukovatelnost a nízká úmrtnost. Nevýhodou metody je nutná kraniektomie. Tato technika zároveň vyžaduje velikou zručnost operátora.

Fototrombotický model

Fototrombotický model ischemické cévní mozkové příhody využívá lokální intravaskulární fotokoagulaci v ohraničené kortikální oblasti. Po intravenózní aplikaci fotosenzitivní látky (např. bengálská červen) je cílená část mozku ozařována laserem přes lebku, což vede k fotochemické okluzi ozařovaných cév se sekundární tkáňovou ischemií. Metoda byla poprvé použita na potkanech Rosenblumem (1977), v průběhu let byla vylepšena a přizpůsobena i pro myši. Tato metoda má velmi nízkou úmrtnost, vyžaduje minimální chirurgický zákrok a je vhodná pro vyvolání malých lokalizovaných lézí.

Celkově byla vyvinuta široká škála technik k vyvolání mozkového infarktu, tyto techniky se stále vyvíjejí a jsou zdokonalovány (van der Staay, 2010).

2.6 Testování experimentálních modelů

V současné době existuje mnoho behaviorálních testů, které posuzují funkční změny po CMP u experimentálních modelů. Většina studií zaměřených na behaviorální testy používají u potkanů MCAo model. Žádný z testů se doposud neprokázal jako lepší než ty ostatní pro plnou charakterizaci různých deficitů, ke kterým dochází po iktu. Různé testy jsou odlišně citlivé na měření deficitu spojeného s konkrétními oblastmi poškození. Existují behaviorální testy, které posuzují jak akutní, tak i chronické poškození u experimentálních modelů. Motorické a behaviorální testy mohou být propojené, čili test zhodnocuje jak složku chování, tak i motorickou. Motorické testy jsou sestaveny tak, aby dokázaly sledovat určitý typ pohybových dovedností (Schaar, 2010).

Identifikace behaviorálních a farmaceutických intervencí, které zlepší zotavení po poškození CMP, je základním prvkem výzkumu iktu. Translační přístupy zaměřené na rehabilitaci se opírají o spolehlivost a platnost zvířecích modelů a jejich schopnost replikace lidského modelu iktu (O'Collins, 2006).

Některé testy vyžadují tréninkovou fázi neboli určitou dobu testování ještě před aplikací vybraného experimentálního modelu. Jedná se obvykle o náročné testy, které nelze provádět spontánně a zvíře se je nejprve musí naučit. Jiné testy naopak nepotřebují žádný trénink. Většina testů má stanovený doporučený časový limit nebo počet pokusů, což zajistí efektivní dobu testování bez zbytečného přetížení zvířete, které by se mohlo unavit nebo ztratit motivaci (Schaar, 2010).

Více testů může znamenat lepší rozpoznání i mírných poruch. Vždy záleží na konkrétním výběru baterie testů a na složitosti a náročnosti daných testů. Pro nejlepší šanci zajistit úspěšné funkční hodnocení po CMP u experimentálních modelů hlodavců je důležité získat základní údaje (výkon bez nervového poškození) ještě před experimentem. Dále je nezbytné snížit stres zvířat během testování na minimum šetrnou manipulací zvířat, zajistí to získání co nejněvhodnějších dat.

3 Cíle práce

Cílem práce bylo navrhnout a otestovat sadu motorických testů, které umožní efektivně posoudit motorický deficit, který vznikne po drobné ischemické lézi primární motorické kůry.

Hypotézy:

1. Ischemická léze v oblasti primární motorické kůry vede k objektivně měřitelnému motorickému deficitu.
2. Motorický deficit se projevuje především ve funkci horní končetiny resp. úchopu.
3. Motorický deficit se s časem po prodělané CMP zlepšuje a dochází k částečné obnově motoriky.

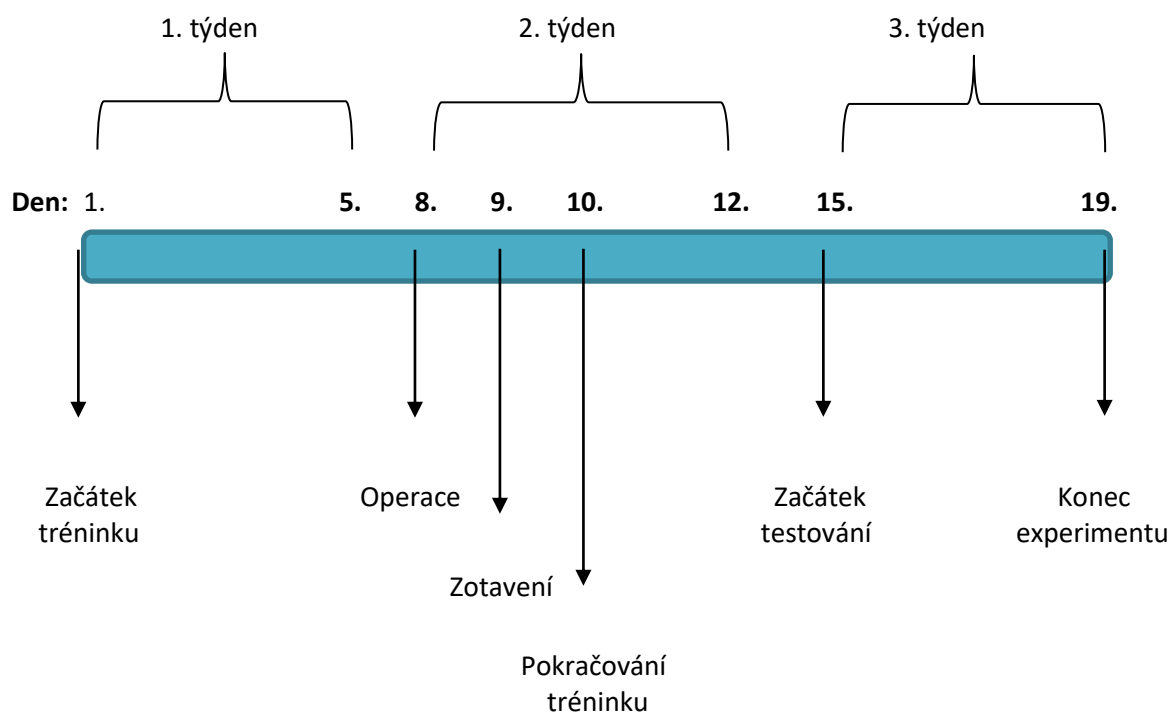
4 Experimentální přístup

Experimenty a péče o zvířata probíhaly v souladu se zákonem č. 246/92 Sb. Na ochranu zvířat proti týrání a předpisem 311/97 Sb. o chovu a využití pokusných zvířat. Experimentální protokol byl schválen Etickou Komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (příloha č. 1).

V experimentu bylo použito 16 potkaních samců kmene Long Evans z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Zvířata (věk 48 dnů, hmotnost 260 – 270g) byla ustájena v klecích ve skupinách po čtyřech s volným přístupem k vodě a potravě. V místnosti, kde byli chováni, byl 12/12 hodinový režim. Světlo se rozsvítilo v 6h ráno, teplota místnosti byla konstantně nastavena na 22°C a vlhkost na 50-60%.

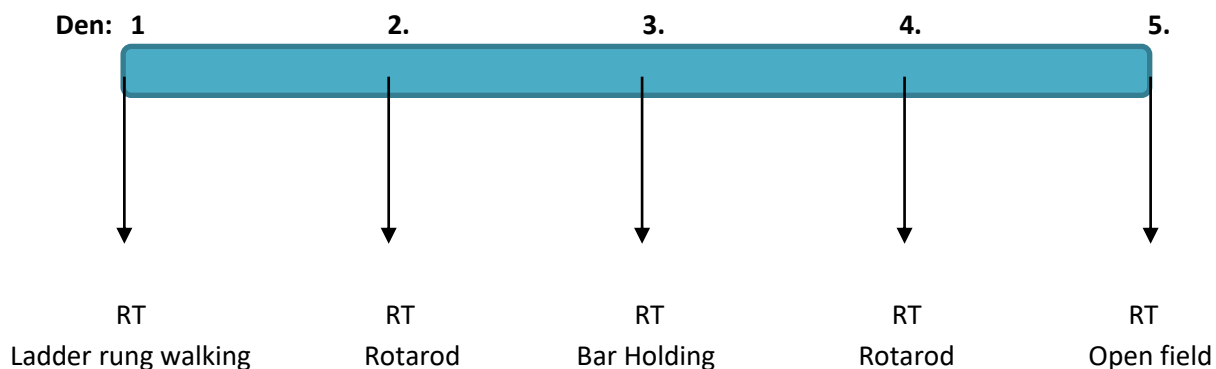
Pro testování zvířat jsme vybrali následující baterii senzomotorických testů: reaching test, rotarod, ladder walking and bar holding s cílem stanovit senzomotorický výkon a koordinaci zvířat před vyvoláním CMP. Po vyvolání CMP byla zvířata testována za použití stejné baterie testů ve stejném pořadí jako před zásahem (viz časové schema, obr. 2-5). Vybrané testy jsou rutinně používány v oddělení experimentální epileptologie FGU (Mikulecká, 2002, Brima, 2013, Brožičková, 2014). Navíc bylo hodnoceno sponntání explorační chování v open fieldu (OF) jako základní měření behaviorální odpovědi na nové prostředí.

Tři dny před začátkem testování byl zvířatům omezen přísun potravy s cílem zvýšit jejich motivaci pro správné provedení testu. Zároveň byly do jejich domácích klecí poskytnuty speciální pelety, které byly použity během tréninku v “reaching testu”, aby si zvířata navykla na novou potravu. Tímto způsobem byla zvířata adaptována na taktilní, vizuální a olfaktorické vlastnosti pelet. Všechny experimenty byly provedeny mezi 9 a 14h. Každý den byla zvířata předem umístěna do laboratoře po dobu 30 minut před zahájením experimentu, aby se adaptovala na jiné prostředí.

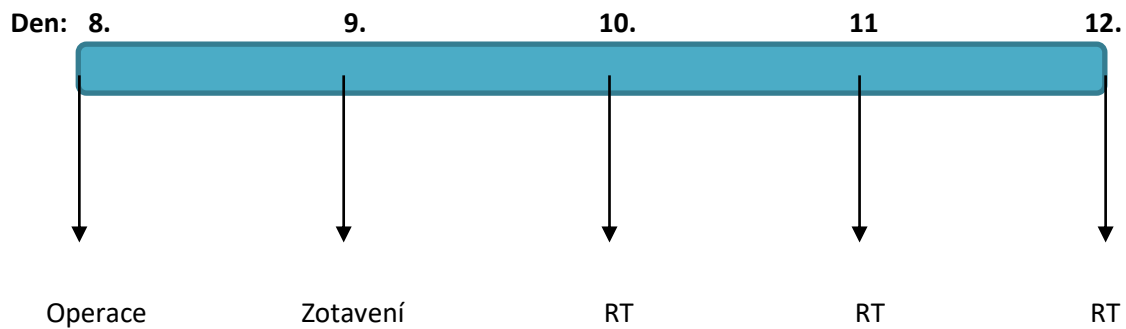


Obrázek 2 Časové schema celého experimentu

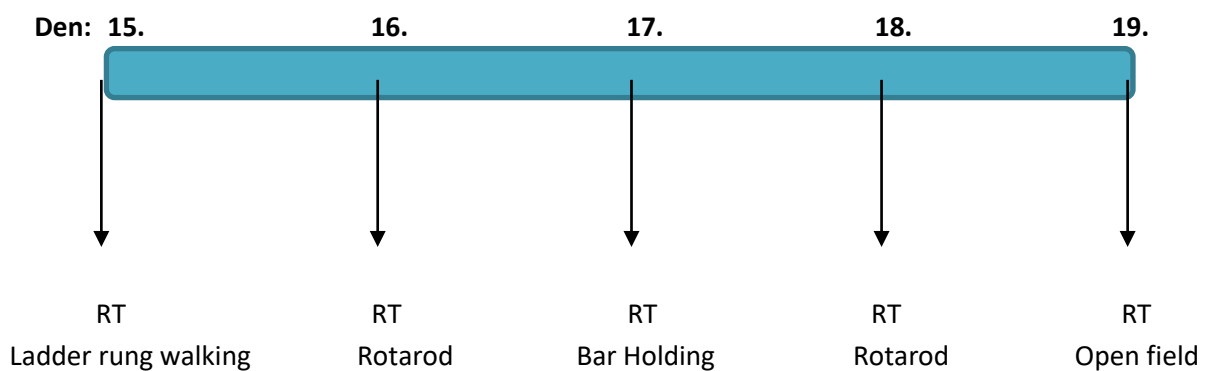
Celý experiment byl rozvržen do 3 týdnů (obr. 2). Jednotlivé testy byly rozděleny do určitého pořadí a program byl detailně rozvržen pro každý den. První týden (obr. 3) probíhal každodenní trénink “Reaching test” (RT) a po něm následoval vždy jeden další test. V následujícím týdnu (po skončení tréninku) byla provedena operace (obr. 4), následoval jeden den zotavení (všechna zvířata přežila zákrok). Do konce druhého týdne zvířata byla trenována v “Reaching test” jako před zákrokem a třetí týden (obr. 5) byla testována stejným způsobem jako před vyvoláním CMP.



Obrázek 3 Časové schema prvního týdne experimentu



Obrázek 4 Časové schema druhého týdne experimentu



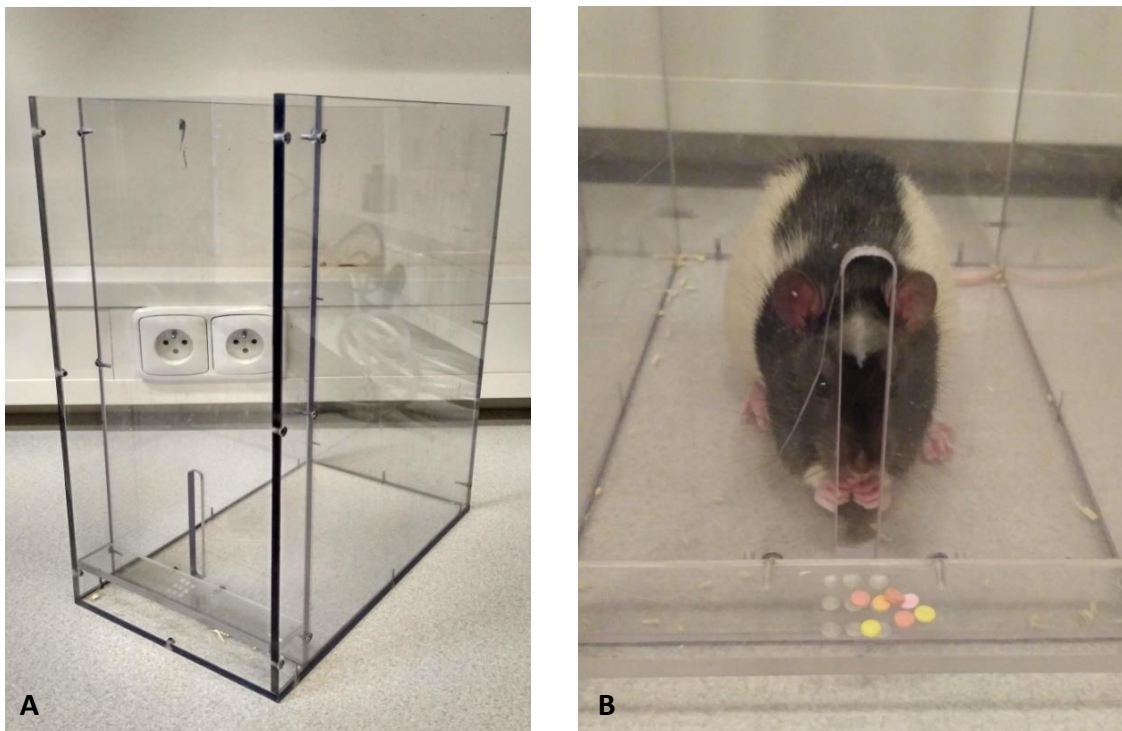
Obrázek 5 Časové schema třetího týdne experimentu

4.1 Reaching test:

Testovací box, podobný jako ve studii Wishaw and Pellis (1990), byl vyroben z plexiskla o rozměrech (23 x 16 x 34 cm). Před jednou ze stěn se nacházel pult s 3 x 3 žlábků, do kterých se umísťovaly jednotlivé pelety (obr. 6A). Zvíře mělo k pultu přístup prostřednictvím 1 cm široké mezery v jedné z užších stěn. Cílem bylo získávání pelet skrze mezeru využitím úchopu předních končetin. Trénink probíhal každý den ve stejný čas po dobu 10 minut. Během této doby mělo zvíře možnost získat tolik pelet, kolik bylo schopno jednotlivě odebírat ze žlábků (obr. 6B). Úspěšnost byla zaznamenávána

do protokolu. Vyhodnocovali jsme počet úspěšných a neúspěšných pokusů o získání pelety a to pro každou přední končetinu zvlášť.

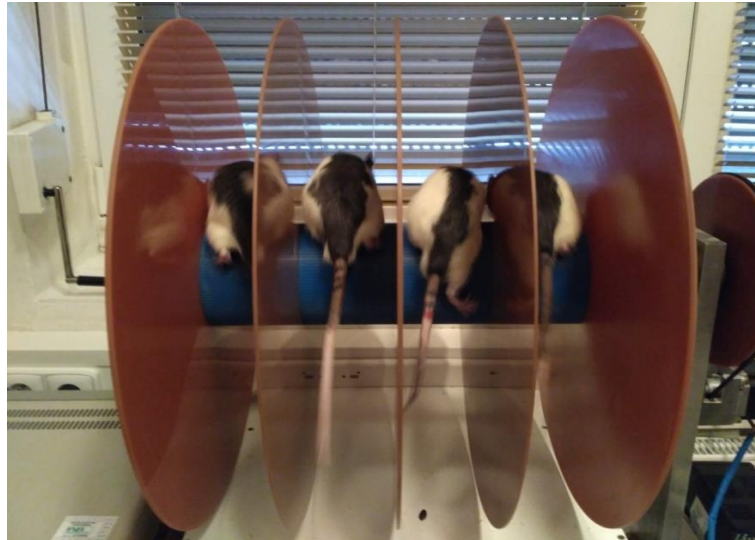
Na konci prvního týdne byla u každého zvířete definována preferovaná končetina pro uchopení pelet (dominantní). Nepreferovaná končetina byla označena jako nedominantní.



Obrázek 6 Testovací box pro Reaching test (A), ukázka zvířete při Reaching testu (B)

4.2 Rotarod test:

Rotarod test představuje obecný úkol koordinace, síly, motivace, aktivity a sensorimotorických funkcí. Zvířata byla pokládána na rotující válec v protipohybu po maximální dobu 60s. Test byl proveden při dvou rychlostech otáčení, 20rpm a 30rpm. Rotující válec byl umístěn 30cm nad zemí. Sledovali jsme dobu setrvání na rotujícím válci s maximální dobou 60s (obr. 7).



Obrázek 7 Rotarod test

4.3 Bar holding test:

V tomto testu se zvíře muselo držet předními končetinami vodorovné tyče (25 cm dlouhé, 1 cm široké, 25 cm nad zemí). Měřili jsme dobu, po kterou se udrželo na tyči (obr. 8A), maximálně však do 60 s. Dále se hodnotilo zda-li zvíře přitáhne k tyči zadní končetiny nebo zůstává viset na předních končetinách (obr. 8B).



Obrázek 8 Bar holding test (A), zvíře přitahující zadní končetiny při Bar holding testu (B)

4.4 Ladder rung walking test:

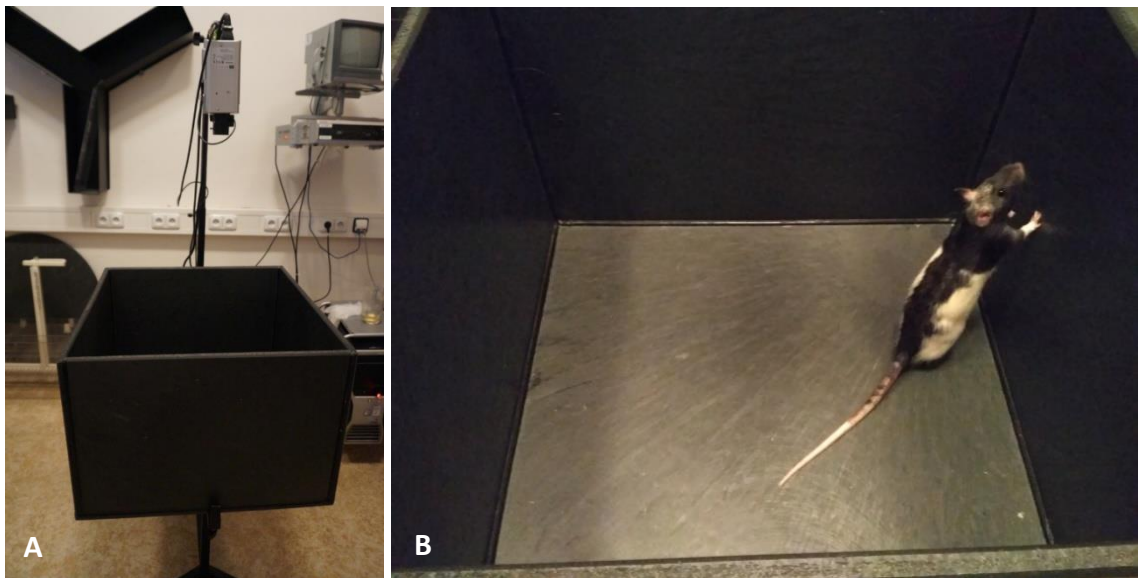
Žebřík byl umístěn mezi 2 klece – prázdnou a domovskou s dalšími zvířaty – sourozenci. Zvíře bylo umístěno na začátek žebříku s prázdnou klecí (obr. 9A). V tomto testu jsou zvířata motivována k chůzi po žebříku z jednoho konce na druhý, aby se setkala se sourozenci. Měřili jsme čas přecházení celé délky žebříku a hodnotili jsme chyby při chůzi – propady jednotlivých končetin mezi mezery žebříku. Chyby byly zaznamenány do protokolu. Test byl prováděn dvakrát – nejprve s pravidelným uspořádáním mezer (1 cm, obr. 9B) a nepravidelným uspořádáním mezer (1, 2 a 3 cm).



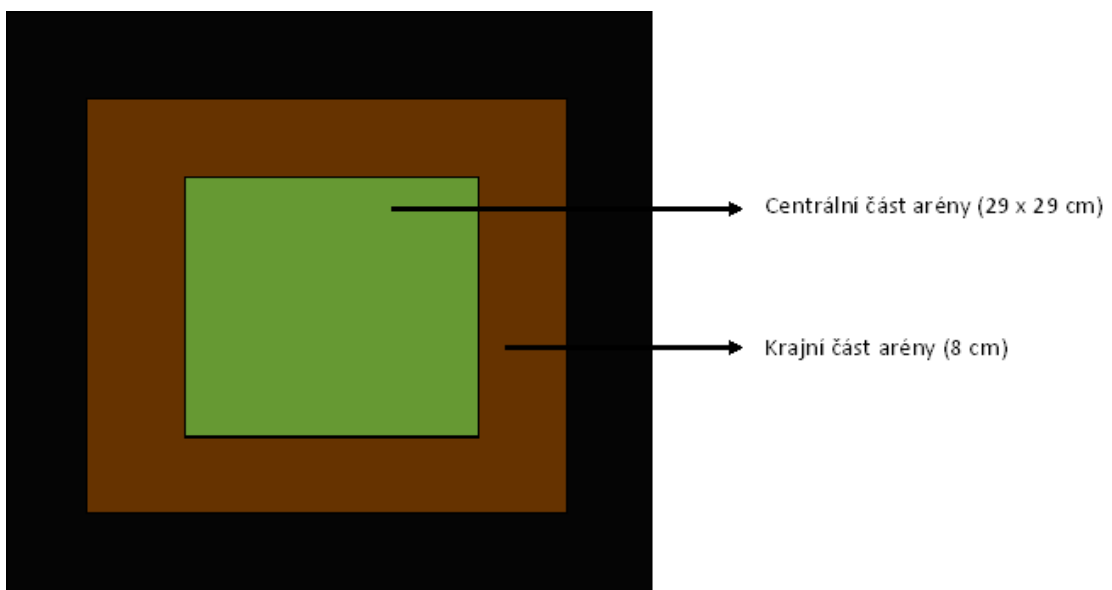
Obrázek 9 Ladder rung walking test, testovací žebřík (A), zvíře přecházející žebřík s pravidelným a nepravidelným uspořádáním (B)

4.5 Open field:

Test byl proveden v tmavé aréně o čtvercovém poli 45 x 45 x 30 cm. Nad Open fieldem byla instalována kamera (obr. 10A). Videozáznam byl pořízen po dobu 5 minut. Trajektorie pohybu byla snímána pomocí automatického (on-line) programu Etho Vision Noldus Information Technology (obr. 11). V OF testu byla měřena ušlá vzdálenost (cm) jako ukazatel lokomoční aktivity a čas strávený v centrální části arény jako ukazatel emocionálního stavu (obr. 10B).



Obrázek 10 Open field test, testovací box a kamera (A), zvíře v testovacím boxu (B)



Obrázek 11 Znázornění arény pro Open field test a popis jednotlivých částí

4.6 Vyvolání cévní mozkové příhody (CMP)

Při operaci zvířat byl brán ohled na výsledky tréninku reaching testu, po kterém byla určena preferovaná končetina (dominantní) a následně se definovalo místo provedení zákroku a vyvolání CMP pro docílení malého poškození v oblasti motorické kůry.

Zvířata podstoupila systémovou anestezii isofluranem (indukce 2 – 3%). Ve střední čáře byla provedena kožní incize a měkké tkáně hlavy byly odpreparovány, aby vznikl volný průchod ke kostem kalvy pro budoucí osvit laserem. Z předního přístupu, byla preparována pravá v.jugularis, do které byla následně injekčně podána (20 mg/1 kg, 20mg RB v 1ml fyziologického roztoku) fotosenzitivní látka „bengálská červeň“ (RB). Kontrolní skupině byl aplikován pouze fyziologický roztok („sham surgery“). „Dominantní“ polovina lebky byla ozářena v oblasti kryjící senzomotorickou kůru (bregma: R-C 0mm, L-L 3mm). Jako světelný zdroj byl využit zelený laser (30mw, 532 μ m) s instalovaným „beam expanderem“ zvyšujícím původní průměr laserového paprsku z původních 1,8 mm na 5,4 mm. Přístroj byl nastaven na kontinuální režim a doba ozáření činila 10 minut. Kůže byla bezprostředně po ozáření sešita a zvíře vráceno do klece ke zotavení.

4.7 Zpracování a statistické hodnocení dat

Statistická analýza byla provedena programem Sigma Stat3.5@SPSS. Pro hodnocení dat z Reaching testu byla počítána procentuální úspěšnost úchopu pelet v týdenním tréninku a následně po provedení léze. Pro porovnání skupin byl použit t-test. Některá data nesplnila požadavky parametrické statistiky, z toho důvodu byly použity pro hodnocení dat z Ladder rung walking testu, Bar holding testu a Open field testu neparametrické testy: Kruskal Wallis test s následným párovým porovnáním testem Dunn's method. Pro hodnocení dat z Rotarod testu byl použit Wilcoxon Signed Rank test. Uváděná data jsou průměrné hodnoty a standardní chyby průměru (SEM). Statistická signifikance byla stanovena na $p=0.05$.

Pro vyměřené velikosti léze každého zvířete byl použit program Fiji. Pro korelaci následné porovnání velikosti léze s úspěšností zvířat v “Reaching testu” byl použit systém Microsoft Excel 2010.

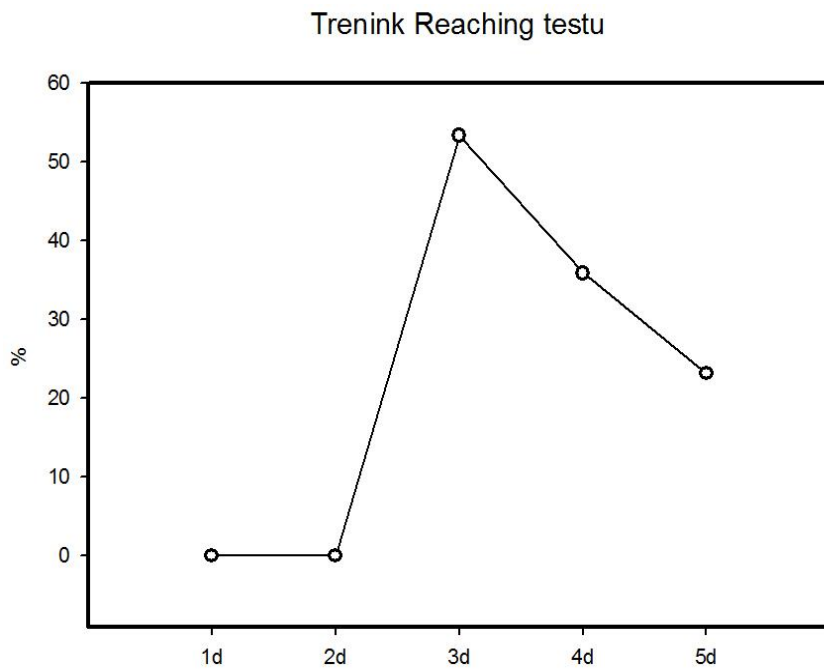
5 Výsledky

Reaching test

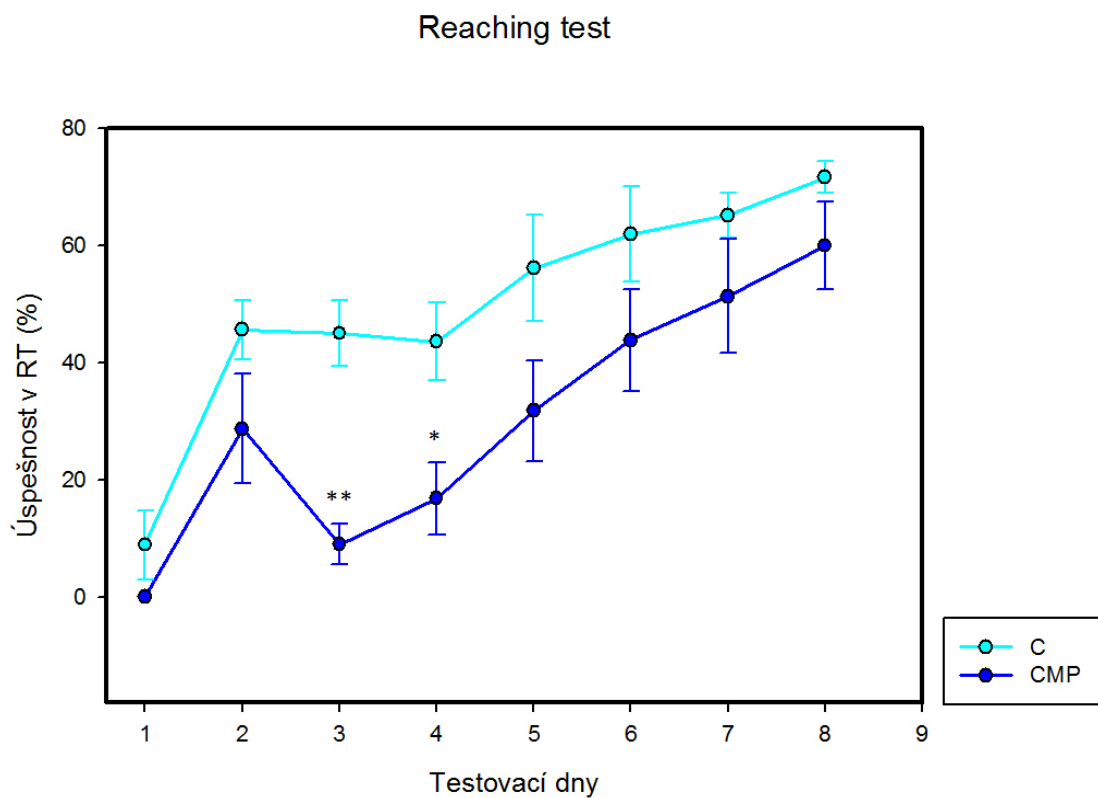
Výsledky z prvního týdne ukázaly, že během tréninku byla zvířata schopna se postupně naučit úchop pelet (graf 1). Trénink byl úspěšný u 13 zvířat (82%), tj. tolik zvířat provedlo uchopení pelety přední končetinou a snědlo ji. To dokazuje, že zvířata byla schopna získat taktilní, vizuální a olfaktorické charakteristiky pelet a tím se adaptovala na novou odměnu. Zároveň to prokazuje schopnost motorického učení – získání potravy pomocí nového funkčního pohybu přední končetinou.

Obě skupiny měly v prvním testování po zákroku horší výkon než při posledním tréninkovém dnu. Obě skupiny však mají v průběhu posledního týdne výrazně se zlepšující výkon. Při srovnání CMP a kontrolní skupiny bylo zjištěno, že i CMP skupina dokáže svůj výkon plynule zlepšovat. Strměji stoupající křivka pro CMP skupinu v grafu (graf 2) dokonce nasvědčuje tomu, že byť je výkon CMP skupiny zpočátku signifikantně horší než u kontrolní skupiny, tak kontrolní skupinu ve výkonu dohání. Poslední den experimentu jsou hodnoty skupin téměř stejné.

Další graf (graf 3) znázorňuje celkový počet pokusů u CMP a kontrolní skupiny. Lze říci, že v průběhu testování se zvyšoval počet pokusů a zároveň se zvyšovala úspěšnost v provedení testu. Korelační analýza neprokázala statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolní a CMP skupinou zvířat v celkovém výkonu v průběhu experimentu. Jak je vidět z grafu 4, kumulativní hodnoty za 8 dnů tréninku ukázaly snížení výkonu u CMP zvířat, i když nedosáhlo statistické významnosti ($P=0,073$).

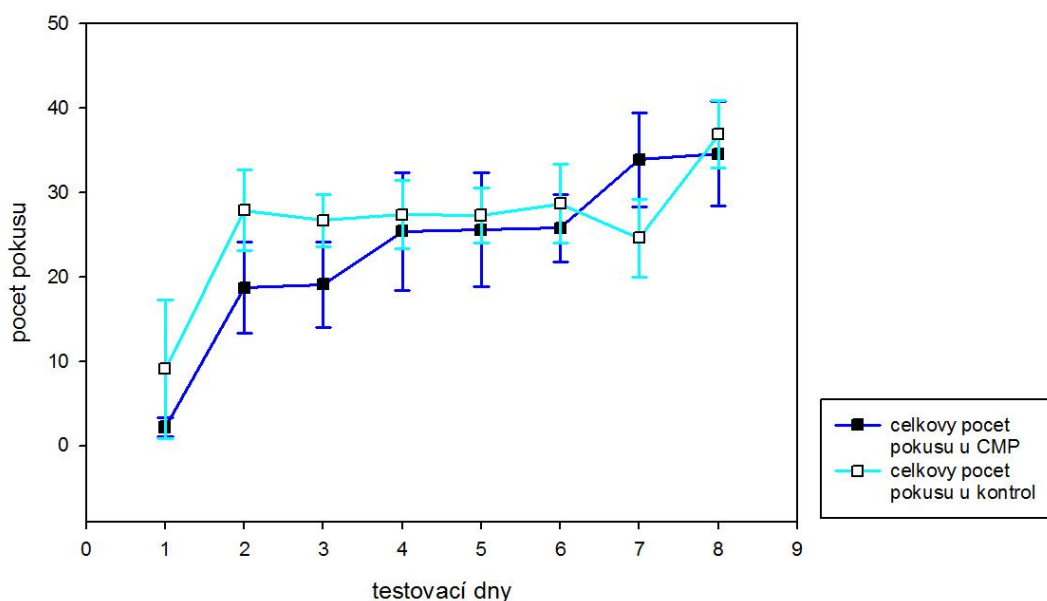


Graf 1 Tréninková fáze Reaching testu – 1. Týden



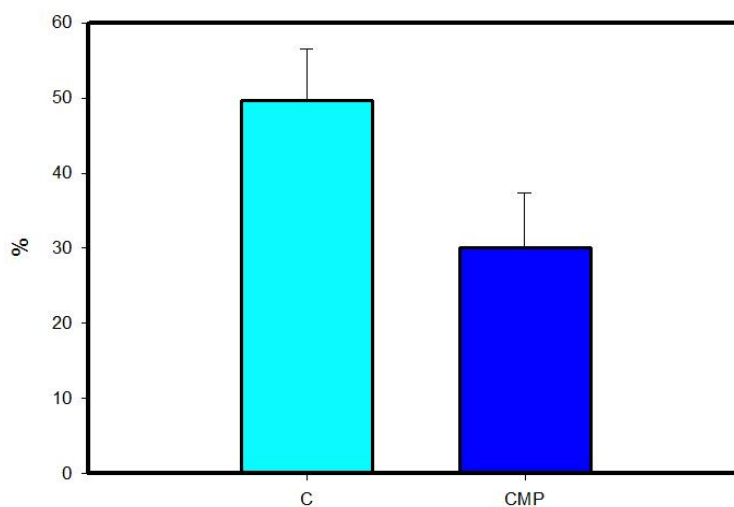
Graf 2 Výsledný graf úspěšnosti v Reaching testu a u CMP a kontrolní (C) skupiny
 * signifikantní rozdíl mezi CMP a kontrolní skupinou $p < 0.01$,
 ** signifikantní rozdíl mezi CMP a kontrolní skupinou $p < 0.001$

Celkový počet pokusu v Reaching testu po zásahu



Graf 3 Graf znázorňující celkový počet pokusů v Reaching testu u CMP a kontrolní skupiny.

Kumulativní hodnoty v RT za 8 dní

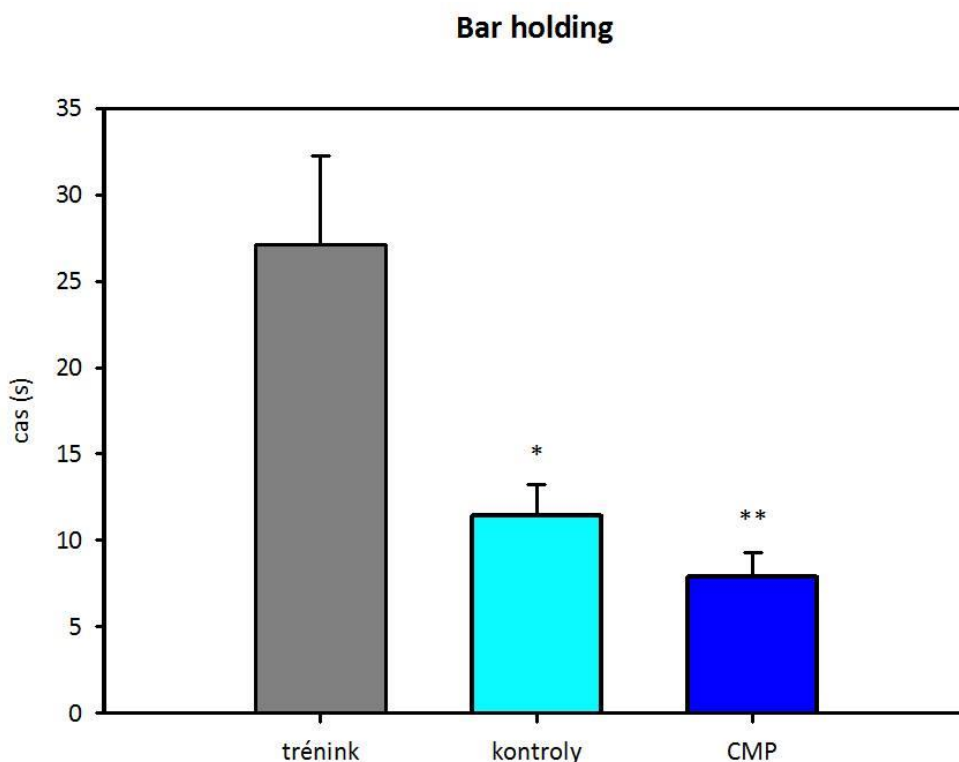


Graf 4 Kumulativní hodnoty úspěšnosti v Reaching testu u CMP a kontrolní skupiny

Bar holding

Po zásahu se obě skupiny zvířat (kontrolní a CMP skupina) udržely na tyči signifikantně kratší dobu než před zásahem ($p < 0.05$ a $p < 0.01$). CMP skupina měla horší výkon než kontrolní skupina (graf 5). Před vyvoláním CMP se z celkového počtu zvířat udrželo na tyči 25% zvířat po maximální určenou dobu, tj. 60s. Při opakovaném testování po zásahu žádné zvíře nevydrželo na tyči do doby 60s.

Při tréninku dokázalo přitáhnout dolní končetiny 11 zvířat. V CMP skupině došlo po zásahu ke zhoršení u 2 zvířat, která nedokázala dolní končetiny přitáhnout. U kontrolní skupiny došlo v tomto parametru u jednoho zvířete ke zlepšení, u druhého k zhoršení. Všechna ostatní zvířata měla stejný výkon co se týče přitáhnutí dolních končetin.



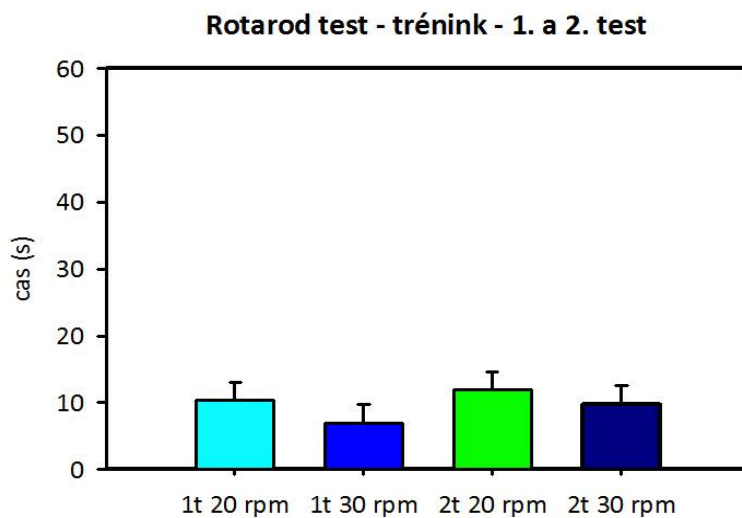
Graf 5 Výkon zvířat v Bar holding testu

* signifikantní rozdíl u kontrolní skupiny oproti tréninku $p < 0.05$

** signifikantní rozdíl u CMP skupiny oproti tréninku $p < 0.01$

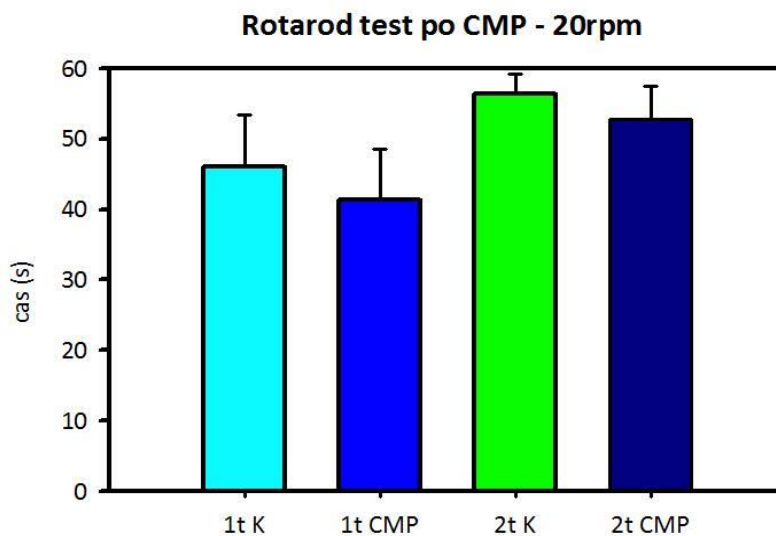
Rotarod test

V prvním testu provedeném před zásahem se zvířata na rotujícím válci udržela kratší dobu než po zásahu (graf 6). Tento výsledek není překvapující, neboť opakovaným testováním jsou zvířata schopna zdokonalit svůj výkon a udržet se na válci delší dobu. To dokazuje již první opakování testu o dva dny později po prvním testování, kdy došlo k mírnému zlepšení výkonu zvířat při obou rychlostech. Probíhá tzv. motorické učení. Před vyvoláním CMP bylo patrné, že při vyšší rychlosti (30 rpm) byl výkon zvířat snížený, tzn. udrželi se na válci kratší dobu.



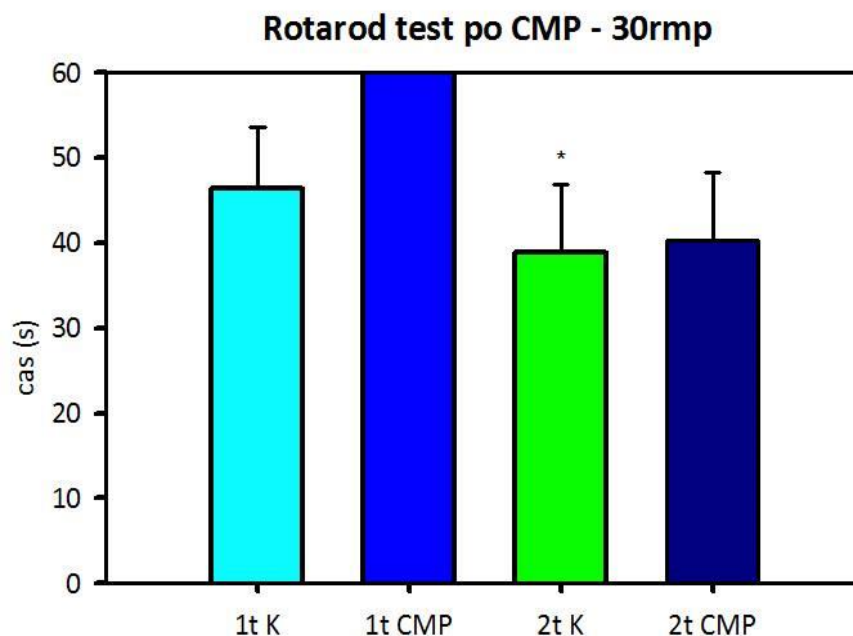
Graf 6 Rotarod test, 1. a 2. testování před zásahem při rychlosti 20 a 30 rpm

Výsledky ukazují, že po zásahu obě skupiny, tzn. kontroly a CMP, si mírně zvýšily výkon při druhém testování při rychlosti 20 rpm (graf 7). Poškození tedy nemělo vliv na výkon při rychlosti 20 rpm.



Graf 7 Rotarod test, výkon kontrolní a CMP skupiny při opakovaném testování při rychlosti 20 rpm

Naopak při rychlosti 30 rpm se výkon při opakování testu zhoršil u obou skupin (graf 8). Výsledky neukazují významné rozdíly mezi skupinami.



Graf 8 Rotarod test, výkon kontrolní a CMP zvířat při opakovaném testování při rychlosti 30 rpm

* signifikantní rozdíl u CMP zvířat v druhém testu ve srovnání s prvním testem při rychlosti 30 rpm, $p < 0,05$

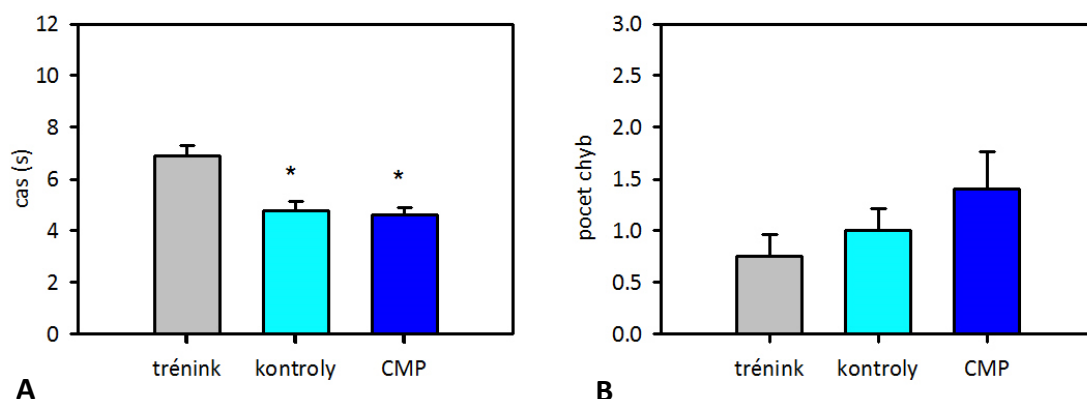
Ladder rung walking test

Data ukázala, že po zákroku byly obě skupiny schopny přejít žebřík za signifikantně kratší čas než před zásahem a to jak u pravidelného ($P < 0,05$, graf 9A), tak i u nepravidelného ($P < 0,05$, graf 10A) uspořádání žebříku. To znamená, že zvířata byla bez ohledu na zákrok schopna zdokonalit motorický výkon a rovnováhu při opakovaném testu.

Při přechodu pravidelného žebříku provedla CMP skupina více chyb (propad do mezer žebříku, graf 9B), naopak u nepravidelného žebříku více chyb u kontrolní skupiny. (Graf 10B). Nicméně tyto výsledky nejsou signifikantní.

Ladder rung walking test

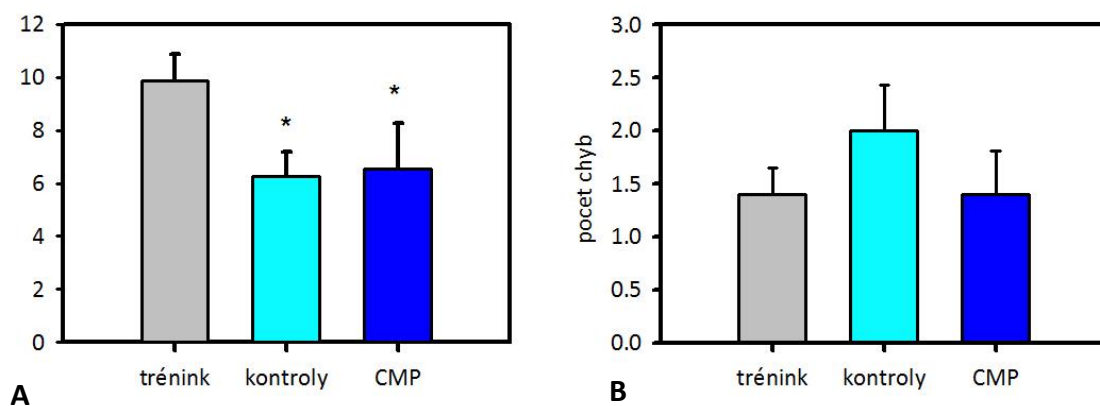
Pravidelné usporádání



Graf 9 Ladder rung walking test – výkon při pravidelném usporádání mezer (A) a počet chyb (propad končetin do mezer) během přecházení žebříku (B)

* signifikantní rozdíl proti výkonu zvířat před zásahem $p < 0,05$

Nepravidelné usporádání



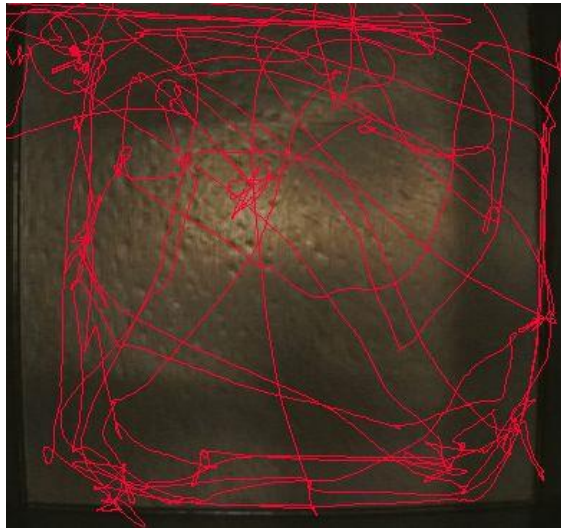
Graf 10 Ladder rung walking test – výkon při nepravidelném usporádání mezer (A) a počet chyb (propad končetin do mezer) během přecházení žebříku (B)

* signifikantní rozdíl proti výkonu zvířat před zásahem, $p < 0,05$

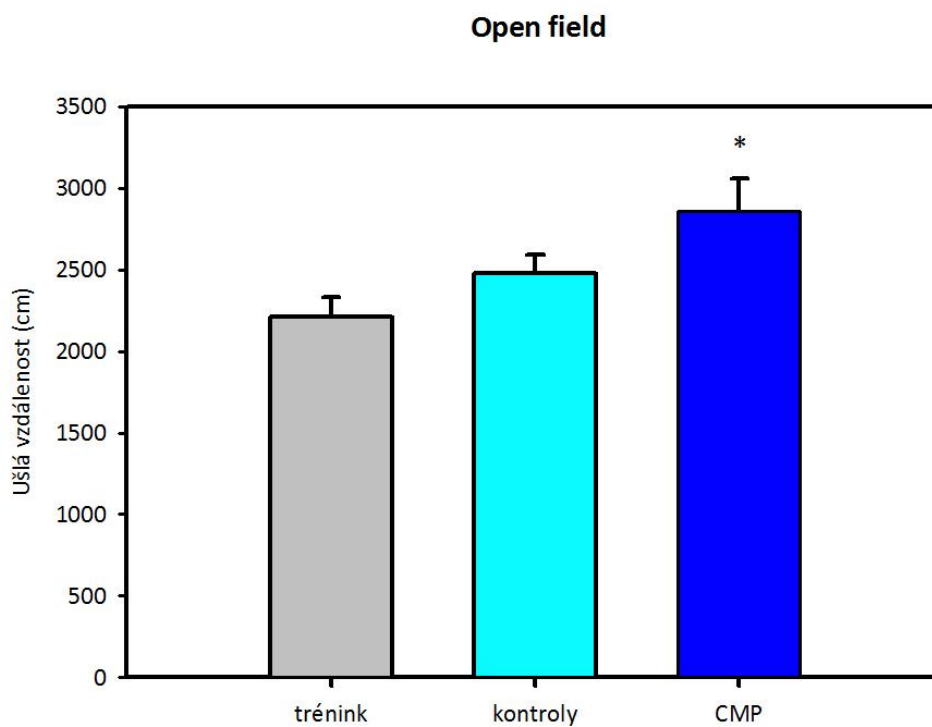
Open field

Když jsou zvířata poprvé vystavena novému prostředí, tráví více času lokomocí po okrajích arény (obr. 12). Po adaptaci na nové prostředí pobývají více i v centrální části arény. Jakmile zvířata získají informace o nové aréně, jejich motivace k explorační aktivitě se sníží. Výsledky ukázaly, že uběhnutá vzdálenost v “Open fieldu” byla kratší, když byla zvířata vystavena poprvé novému prostředí (graf 11).

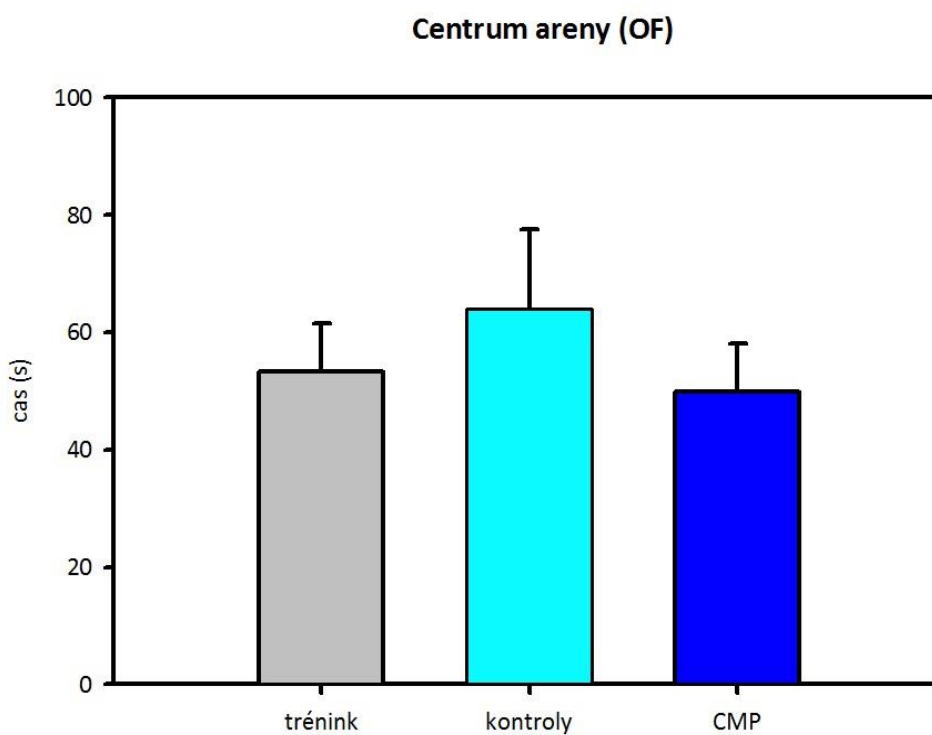
Opakované testování ukázalo, že obě skupiny ušly větší vzdálenost, ačkoliv signifikantně větší vzdálenost ušla zvířata po CMP. To znamená, že CMP vyvolalo hyperlokomoci. Ani jedna skupina zvířat nebyla schopna adaptace na nové prostředí (explorace neklesla), i když výrazněji u CMP zvířat (graf 12). Navíc, zvířata po CMP strávila méně času v centrální části arény, což poukazuje na mírně zvýšenou anxiétu těchto zvířat.



Obrázek 12 Ukázka trajektorie zvířete v Open fieldu



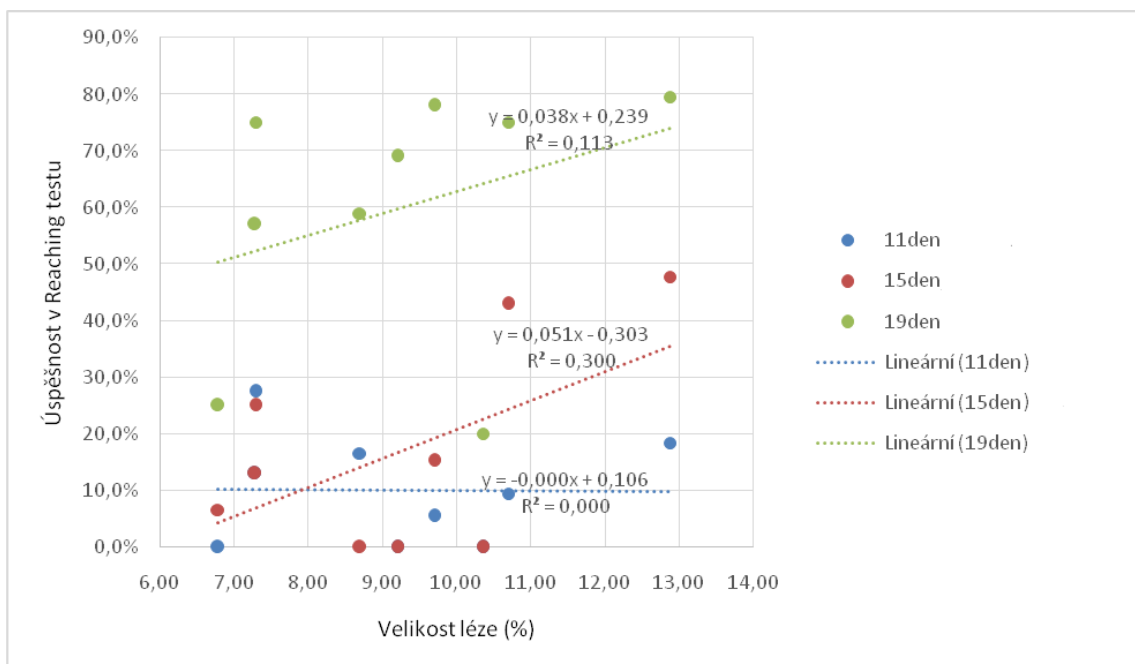
Graf 11 Open field, lokomoční aktivita vyjádřená ušlou vzdáleností (cm) v OF
 * signifikantní rozdíl u CMP zvířat proti lokomoční aktivitě před zásahem, $p < 0,05$



Graf 12 Open field. Čas strávený v centrální části arény

Velikost léze a její vliv na funkční deficit

Z řezů mozku potkanů byla zjištěna velikost léze (příloha č.2) vypočítána jako procento postižené plochy řezu mozku oproti celkové ploše daného řezu. Tato hodnota byla porovnána s úspěšností potkana v Reaching testu ve třech vybraných dnech experiment, konkrétně 11., 15. a 19. den. Výsledky nepotvrzují, že by větší léze znamenala zároveň horší výkon. Naopak, 15. a 19. den ukazují lehkou tendenci k opačnému trendu, ovšem výsledky nejsou signifikantní (graf 13). Korelační analýza neprokázala souvislost mezi velikostí léze a úspěšností v Reaching testu.



Graf 13 Graf hodnotící korelaci mezi velikostí léze potkana a jeho úspěšností v Reaching testu 11., 15. a 19. den experimentu.

6 Diskuze

V roce 2010 bylo po celém světě 33 milionů přeživších po CMP a předpovídá se, že do roku 2030 toto číslo v zroste na 70 milionů (Feigin, 2014).

Většina pacientů je dosud léčena konzervativně, interval mezi začátkem symptomů a přijetím na specializované oddělení je dlouhý a rehabilitace po CMP, především dlouhodobá, je nedostačující. Současně jsou možnosti pro zminimalizování poškození mozku omezené a potřeba lepšího porozumění a zlepšení léčby následků CMP je stále aktuální (Jones, 2015).

Cílem vzniku a vývoje experimentálních modelů mozkové ischemie je možnost testování nových neuroprotektivních strategií v kontrolovaných podmínkách. Dnes jsou k dispozici spolehlivé experimentální modely různých druhů včetně primátů, prasat, ovcí, psů, králíků, potkanů a myší. Pro lidskou populaci neexistuje ideální animální model a je obtížné porovnávat lidi a zvířata, nicméně existují zvířecí modely, které splňují kritéria, díky kterým jsou v biomedicinském oboru považována za validní. I když je použití a vývoj modelů u vyšších savců důležitým cílem, malá zvířata zůstávají upřednostňována z několika důvodů. Vzhledem k délce březosti, počtu mláďat ve vrhu, maximální hmotnosti a celkové délce života je chov potkana nízkonákladový i při větším počtu zvířat a je rychle a snadno udržitelný. Díky rozsáhlým znalostem z oborů genetiky a molekulární biologie (Carmichael, 2005) lze výsledky dobře interpretovat i s dopadem na humánní medicínu. Další výhodou je stále větší množství geneticky modifikovaných organismů, které umožňují kauzálně studovat funkci jednotlivých genů. Potkan je navíc specifický tím, že má, stejně jako člověk, úchop, tedy jemnou motoriku řízenou horním motoneuronem. V tomto parametru není lepší volby, u ostatních zvířat kromě primátů jemná motorika "ruky" víceméně chybí. Testování na primátech je problematické, nesmírně nákladné a naráží na pochopitelné etické aspekty. V případě příznivých výsledků u hlodavců se tedy již přistupuje k prvním klinickým testům u člověka. Zároveň i přes mnoho nadějných preklinických studií o neuroprotektivní léčbě, která minimalizuje poškození tkání po CMP, je efektivita přenosu do kliniky doposud spíše zklamáním (O'Collins, 2006).

Jedním z hlavních problémů, které je obtížné překonat, je to, že výzkum mrtvice se provádí většinou u mladých laboratorních zvířat a tím se nebere v úvahu, že lidé, u kterých dojde ve vyšším věku k mrtvici, jsou postiženi i dalším onemocněním jako arteriální hypertenze, diabetes nebo ateroskleróza. Autoři uznávají rostoucí potřebu rozvíjet více studií, které hodnotí ischemické poškození u experimentálních modelů s aterosklerotickými, diabetickými či staršími zvířaty (Bacigaluppi, 2010).

Vzhledem k tomu, že běžně používané modely (např. MCAO) jsou často technicky náročné, byly jako alternativa vyvinuty jednodušší modely, které indukují částečnou ischemickou lézi. Jedna z takových metod spočívá v aplikaci fotosenzitivního barviva do krevního oběhu. Ischemie je vyvolána transkraniálním osvětlením mozku, čímž vznikne koagulace v ozařované oblasti. Tento model má výhodu v tom, že oblast ischemie může být předem definována a ohraničena, čímž se nabízí možnost koagulovat odlišné kortikální oblasti s vysokou přesností. Nevýhodami tohoto modelu jsou nefyziologické fotokoagulace, které vytvářejí lézi s malou penumbrou v porovnání s jinými modely fokální mozkové ischemie. Bohužel tromboembolické modely, kam patří i fotochemický model, dosáhly v minulosti omezeného významu v neuroprotektivním výzkumu kvůli jejich variabilitě a neúspěchu translace zvířecích dat do klinické medicíny (Bacigaluppi, 2010).

Model MCAo má ještě několik podkategorií, existuje více typů a technik, např. model proximální MCAo má výhodu v tom, že velmi věrně simuluje poškození mozku, ke kterému dochází u lidí po CMP, je vysoce reprodukovatelný a nevyžaduje kraniotomii. Nevýhoda modelu spočívá v tom, že pokud okluze trvá dlouho, nevyhnutelným následkem může být i smrt zvířete v případě vzniku edému mozku. Naopak model distální MCAo zahrnuje i kraniotomii, čímž se zvyšuje riziko komplikací s ní spojenými (subarachnoidální krvácení, infekce), na druhou stranu ušetří hluboké struktury mozku jako thalamus, hypothalamus, střední mozek (Carmichael, 2005). V naší studii jsme indukovali ischemickou lézi u laboratorního potkana pomocí fototrombotického (fotochemického) modelu, který se nejvíce hodil pro náš cíl, tj. malé poškození konkrétně definované oblasti mozku - motorické kůry.

V Reaching testu jsou zvířata trénována k tomu, aby získávala malé pelety, které musí uchopit, přiložit k ústům a sníst. Po poškození experimentálně vyvolanou mozkovou ischemií může “skilled reaching” v Reaching test ukázat různé stupně zlepšování a také díky spontánní obnově, ale působí i jako terapie. Rovněž se tento test používá pro zhodnocení jiných terapií jako fyzikální terapie, roboticky asistovaná terapie, terapie na buněčné bázi nebo elektrostimulace (Alaverdashvili, 2008). “Skilled reaching”, tedy pohyb vyžadující učení a zahrnující úchop přední končetinou, se studuje ve více testech: “the staircase task” (Montoya, 1991), “the tray reaching task” (Maldonado, 2008) nebo “the pasta matrix reaching task” (Ballermann, 2001).

Naše výsledky ukázaly, že jeden týden stačí na to, aby se většina zvířat naučila správně provést úkol v Reaching testu. Křivka úspěšnosti tréninku má ke konci prvního týdne klesající tendenci, je to dáno tím, že test začalo provádět více zvířat a zvýšil se počet chybných pokusů. Zvířatům byl odepřen volný přístup k potravě a dostávali vypočítané dávky pelet a zároveň nové pelety vhodné svými rozměry pro Reaching test, čímž se zvýšila jejich motivace k provedení úkolu.

Operační zákrok přežila bez komplikací všechna zvířata. Následoval jeden den pro zotavení, kdy měla zvířata neomezený přístup k vodě i potravě a nebyly prováděny žádné testy. Výsledky testování po zákroku ukázaly, že CMP skupina zvířat měla v Reaching testu obecně horší výkon než kontrolní skupina zvířat. První den neměla CMP skupina žádný úspěšný pokus, ale i velmi malou snahu test provést. Ve 3. a 4. dnu zde byl statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami. V prvních třech dnech byl zájem CMP skupiny o pelety nižší než kontrolní skupiny. Vysvětlením může být kombinace pooperačního stavu a dle protokolu z průběhu testování i ztráta motivace po neúspěšném pokusu v Reaching testu.

V dalších dnech se výkon obou skupin zlepšuje. Je to dáno tím, že si zvířata pamatují, případně se znovu učí tento specifický úkon pro získání pelety. V současné době je známo, že reorganizace v motorické oblasti po CMP je zvýšena trénováním paretické horní končetiny jak u lidí, tak přední končetiny u experimentálních modelů (Bütefisch, 20016, Dong, 2007, Winstein, 2016). Jak bylo zjištěno, u zdravých zvířat motorický trénink podněcuje v motorické kůře časově závislé změny v genové expresi, syntézu bílkovin, synaptické potenciály, které jsou lokalizovány v reorganizované

motorické mapě (Adkins, 2008). Po lézi v motorické kůře existuje blízká vazba mezi reorganizací kortikální mapy a axonálním růstem (Clarkson, 2013) a rehabilitační trénink rovněž zvyšuje synaptická zranění v oblasti pro přední končetinu (Kim, 2015).

Křivka CMP skupiny je strmější a předpokládáme, že v případě delšího testování by se výkon obou skupin vyrovnal. Tvar křivek hovoří o tom, že CMP skupina zvířat je schopna po takto drobné lézi svůj výkon postupně zlepšovat a předpokládáme, že při delším tréninku by mohl být funkční deficit úplně odstraněn. Vysvětlení může být takové, že test není dostatečně citlivý k detekci nejmenších motorických deficitů. Dále je možné, že na základě kompenzace přes nižší regulační okruhy (extrapyramidový systém) dojde k obnově funkcí, kdy testovaný pohyb je podobný až téměř stejný a vede k obdobnému výsledku jako u kontrolní skupiny. Kumulativní hodnoty úspěšných pokusů ze všech dnů experimentu rovněž poukazují na rozdíl mezi kontrolní a CMP skupinou ve smyslu, že kontrolní skupina má lepší výkon než CMP skupina.

Ohledně dalších motorických testů lze konstatovat, že výkon zvířat byl ovlivněn obtížností daného testu. Bar holding test je považován za jeden z nejnáročnějších testů vzhledem k tomu, že zvířata musí vynaložit velké množství energie, aby se pomocí předních končetin udržela na tyči a navíc aby přitáhla také zadní končetiny. Výkon v tomto testu byl u obou skupin horší než před zásahem, ale signifikantně horší byl u CMP skupiny v porovnání s tréninkem. Menší zhoršení kontrolní skupiny může být vysvětleno ztrátou motivace udržet se na tyči, protože při prvním absolvování testu se naučili, že pád není spojen z žádným negativním prožitkem či újmou.

V rotarod testu byl výkon před zásahem horší než po zásahu, což není překvapující, neboť při opakovaném vystavení rotarodu jsou zvířata schopna si zdokonalit výkon a naučit udržet si rovnováhu a dokonce si pamatovat, že tento test již prováděli. Jedná se o tzv. motorické učení. Tento fenomén nebyl narušen po operačním zásahu. Nicméně při testování při vyšší rychlosti se ukázalo, že CMP skupina už nebyla schopna svůj výkon zlepšit, naopak se výkon zhoršil. To znamená, že provedení testu při vyšší rychlosti pro ně bylo už příliš náročné. Vyhodnocení testu neprokázalo zjištění významného rozdílu mezi kontrolní a CMP skupinou.

Ladder rung walking test ukázal, že při opakovaném testování si zvířata zapamatovala princip testu a tak obě skupiny dokázaly přejít obě varianty žebříku za kratší čas. Nicméně opět se neprokázal významný rozdíl ve výkonu mezi kontrolní a CMP skupinou jak v čase, tak i v počtu chyb provedených při přecházení žebříku.

Co se týče explorační aktivity v novém prostředí, naše výsledky ukázaly hyperaktivitu u CMP zvířat a mírně zvýšenou anxiétu. Tento výsledek naznačuje zhoršenou adaptaci na nové prostředí po CMP zásahu a změnu emocionálního stavu zvířat. Nicméně v současné době nemůžeme vyvodit neústupné závěry ohledně chování zvířat po CMP pouze z jednoho testu. Přírozené prostředí potkana je spíše uzavřené a s menším přístupem světla. Po opakovaném vystavení stejnému neznámému prostředí je pro laboratorního potkana přirozeným procesem adaptace (habituače), která následuje po předchozí exploraci. Zvýšenou anxiétu u skupiny s CMP tj. zhoršené adaptaci novému prostředí, může být způsobeno tím, že postižený jedinec si je vědom handicapu, který je ale pod našimi detekčními schopnostmi, a proto se pohybuje po nejtemnějších okrajích arény a přirozeně hledá místo, kam se schovat, protože se cítí ohroženě v odkrytém prostředí. Něco podobného lze pozorovat i u lidí. Mnoho lidí po CMP je dříve či později schopna samostatnosti z hlediska běžných denních aktivit a péče o sebe. Jedna z krizových situací může nastat v momentě, kdy takový člověk nastoupí do práce nebo když ji začne hledat. Je nervozní z nového prostředí, bojí se očekávání ostatních a bojí se dostatečnosti svých fyzických možností. Často se stydí za svůj handicap. Z vlastních zkušeností mohu říci, že je potřeba velká trpělivost. Na druhou stranu mají lidé po CMP ohromnou radost z každého malého pokroku a z každé nové pozitivní zkušenosti aktivit, které běžně zvládali před CMP.

Nedostatky studie:

Při operování došlo u jednoho zvířete k poškození hemisféry, která byla námi vyhodnocena jako nedominantní. Zvíře jsme přesto ponechali v experimentální - CMP skupině s ostatními správně operovanými zvířaty a bylo testováno stejným způsobem jako další zvířata ve skupině. Toto zvíře vykazovalo obecně lepší výkony než ostatní zvířata ve stejné skupině. Je tedy možné, že výsledky studie byly do jisté míry ovlivněny tímto jedincem a tím mohlo dojít ke snížení statistické významnosti. Zároveň zde vyvstává otázka, do jaké míry může ovlivnit celkový motorický projev drobné

poškození primární motorické kůry v nedominantní hemisféře. To by mohlo být podnětem pro další studie.

Naše výsledky jsou v souladu s dosavadními jinými modely, kde byly použity stejné či podobné testy ohledně behaviorálních změn u zvířat po CMP (van der Staay, 2010, Alaverdashvili, 2008).

Cílem práce bylo navrhnout a otestovat sadu motorických testů, které umožní detekovat a určit motorický deficit, který vznikne po malé ischemické lézi primární motorické kůry u laboratorního potkana. Cíle práce byly splněny, experiment proběhl bez větších komplikací a podařilo se úspěšně využít všechny plánované motorické testy. Vyjádření k hypotézám:

1. Ischemická léze v oblasti primární motorické kůry vede k objektivně měřitelnému motorickému deficitu. Hypotéza byla potvrzena pomocí výsledků Reaching testu.
2. Motorický deficit se projevuje především ve funkci horní končetiny resp. úchopu. Na testech hodnotících především lokomoční aktivitu je patrné, že významný rozdíl a deficit u CMP skupiny nebyl prokázán. Naopak u Bar holding testu, který využívá sílu předních končetin a převážně u Reaching testu lze říci, že ischemická léze motorické kůry ovlivnila převážně funkci přední končetiny. Hypotéza byla potvrzena.
3. Motorický deficit se s časem po prodělané CMP zlepšuje a dochází k částečné obnově motoriky. Na základě hodnocení Reaching testu byla hypotéza potvrzena.

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo navrhnout a otestovat sadu motorických testů, které umožní efektivně a spolehlivě posoudit motorický deficit po experimentálně vyvolané drobné ischemické lézi primární motorické kůry u laboratorního potkana. Diplomová práce obsahuje kapitoly o cévní mozkové příhodě u lidí, dále kapitoly o současných poznatcích ohledně fyziologických procesů nervové reinervace a funkčním testování experimentálních modelů v jiných studiích. Další kapitoly se věnují třítydennímu experimentu, použitým testům a vyhodnocení výsledků.

Pro studii bylo vybráno celkem 16 potkanů, kteří byli empiricky rozděleni na experimentální a kontrolní skupinu. Ischemická léze byla indukována pomocí fototrombotického modelu pro docílení malého poškození v oblasti motorické kůry mozku.

Zvířata byla testována za použití baterie pěti motorických testů – Reaching test, Bar holding test, Rotarod test, Ladder rung walking test a Open field test, které jsou rutinně používány v oddělení vývojové epileptologie, Akademie věd České republiky.

Cíle práce byly splněny, experiment proběhl bez větších komplikací a podařilo se úspěšně využít všechny plánované motorické testy. Výsledky testů ukázaly, že vzniklé drobné poškození motorické kůry u laboratorního potkana lze objektivně hodnotit pomocí Reaching testu, který se zaměřuje na úchop a jemnou motoriku. U testů hodnotících převážně lokomoci nebyl nalezen významný rozdíl mezi výkony experimentální a kontrolní skupiny. Podařilo se ověřit, že deficit se projevuje především na funkci horní končetiny a má zároveň vliv na emocionální stav zvířat ve smyslu zvýšené anxiety. V průběhu času lze pozorovat zlepšení v Reaching testu z hlediska úspěšnosti a dochází k částečné obnově motoriky.

8 Seznam použité literatury

1. AMBLER, Z. Základy neurologie: učebnice pro lékařské fakulty. 6., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Galén, 2006, 351s. ISBN 80-7262-433-4.
2. American heart association [online]. 2017 [cit. 2017-07-02]. Dostupný z: http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/WarningSigns/Stroke-Warning-Signs-and-Symptoms_UCM_308528_SubHomePage.jsp
3. JONES, T. A., ALLRED, R. P., JEFFERSON, S. C., KERR, A. L., WOODIE, D. A., CHENG, S.-Y., ADKINS, D. L. Motor System Plasticity in Stroke Models: Intrinsically Use-dependent, Unreliably Useful. *Stroke* [online]. 2013, Volume 44, Issue 6, pp. 104-106 [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/STROKEAHA.111.000037>
4. ALLRED, R. P., JONES, T. A. Experience: a double-edged sword for restorative neural plasticity after brain damage. *Future Neurology* [online]. 2008, Volume 3, Issue 2, pp. 189-198 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/14796708.3.2.189>
5. ALAVERDASHVILI, M., WHISHAW, I. Q. Motor cortex stroke impairs individual digit movement in skilled reaching by the rat. *European Journal of Neuroscience* [online]. 2008, Volume 28, Issue 2, pp. 311-322 [cit. 2016-12-14]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2008.06315.x>
6. ADKINS, D. L., HSU, J. E., JONES, T. A. Motor cortical stimulation promotes synaptic plasticity and behavioral improvements following sensorimotor cortex lesions. *Experimental Neurology* [online]. 2008, Volume 212, Issue 1, pp. 14-28 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488608000551>

7. BÜTEFISCH, C. M. Neurobiological bases of rehabilitation. *Neurological Sciences* [online]. 2006, Volume 27, pp. 18-23 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10072-006-0540-z>
8. BALLERMANN, M., METZ, G. A. S., MCKENNA, J. E., KLASSEN, F., WHISHAW, I. Q. The pasta matrix reaching task: a simple test for measuring skilled reaching distance, direction, and dexterity in rats. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 2001, Volume 106, Issue 1, pp. 39-45 [cit. 2017-08-02]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027001003260>
9. BENOWITZ, L. I., CARMICHAEL, S. T.. Promoting axonal rewiring to improve outcome after stroke. *Neurobiology of Disease* [online]. 2010, Volume 37, Issue 2, pp. 259-266 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996109003313>
10. BRIMA, T., MIKULECKÁ, A., OTÁHAL, J. Impacts of perinatal induced photothrombotic stroke on sensorimotor performance in adult rats. *Physiological research* [online]. 2013, Volume 62, Issue 1, pp. 85-94 [cit. 2017-07-01]. Dostupné z: http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/62/62_85.pdf
11. BROWN, C. E., AMINOLTEJARI, K., ERB, H., WINSHIP, I. R., MURPHY T. H.. In Vivo Voltage-Sensitive Dye Imaging in Adult Mice Reveals That Somatosensory Maps Lost to Stroke Are Replaced over Weeks by New Structural and Functional Circuits with Prolonged Modes of Activation within Both the Peri-Infarct Zone and Distant Sites. *Journal of Neuroscience* [online]. 2009, Volume 29, Issue 6, pp. 1719-1734 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4249-08.2009>
12. BROŽÍČKOVÁ, C., MIKULECKÁ, A., OTÁHAL, J. Effect of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, on behavioral and physiological parameters. *Physiological research* [online]. 2014, Volume 63, Issue 5, pp. 637-

648 [cit. 2017-07-01]. Dostupné z:
http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/63/63_637.pdf

13. BRUTHANS, J. Epidemiologie a prognóza cévních mozkových příhod. *Remedia* [online]. 2009, roč. 19, č. 2, s. 128-131. [cit. 2017-07-21]. Dostupné z <http://www.remedia.cz/Clanky/Prehledy-nazory-diskuse/Epidemiologie-a-prognoza-cevnich-mozkovych-prihod/6-F-Bn.magarticle.aspx>
14. CARMICHAEL, S. T. Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: Making waves. *Annals of Neurology* [online]. 2006, Volume 59, Issue 5, pp. 735-742 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.20845>
15. CARMICHAEL, S. T. Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. *NeuroRX* [online]. 2005, Volume 2, Issue 3, pp. 396-409 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1602/neurorx.2.3.396>
16. CLARKSON, A. N., LÓPEZ-VALDÉS, H. E., OVERMAN, J. J., CHARLES A. C., BRENNAN, K. C., CARMICHAEL, S. T. Multimodal Examination of Structural and Functional Remapping in the Mouse Photothrombotic Stroke Model. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* [online]. 2013, Volume 33, Issue 5, pp. 716-723 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2013.7>
17. CHEN, S., TRAN, S., SIGLER, A., MURPHY, T. H. Automated and quantitative image analysis of ischemic dendritic blebbing using in vivo 2-photon microscopy data. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 2011, Volume 195, Issue 2, pp. 222-231 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165027010007065>
18. COLLYER, E., CATENACCIO, A., LEMAITRE, D., DIAZ, P., VALENZUELA, V., BRONFMAN, F., COURT, F. A. Sprouting of axonal collaterals after spinal cord injury is prevented by delayed axonal

- degeneration. *Experimental Neurology* [online]. 2014, Volume 261, pp. 451-461 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488614002428>
19. DROMERICK, A. W., LANG, C. E., BIRKENMEIER, R. L., et al. Very Early Constraint-Induced Movement during Stroke Rehabilitation (VECTORS): A single-center RCT. *Neurology* [online]. 2009, Volume 73, Issue 3, pp. 195-201 [cit. 2017-08-06]. Dostupné z: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0b013e3181ab2b27>
20. DOYLE, K. P., SIMON, R. P., STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* [online]. 2008, Volume 55, Issue 3, pp. 310-318 [cit. 2017-08-06]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390808000099>
21. FEIGIN, V. L., FOROUZANFAR, M. H., KRISHNAMURTHI, R., MENSAH, G. A. Global burden of stroke: an underestimate – Authors' reply. *The Lancet* [online]. 2014, Volume 383, Issue 9924, pp. 1205-1206 [cit. 2017-08-06]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673614605961>
22. FEIGIN, V. Cévní mozková příhoda: prevence a léčba mozkového iktu. Praha: Galén, 2007, 207 s. ISBN 8072624288.
23. BACIGALUPPI, M., COMI, G., HERMANN, D. M. Animal Models of Ischemic Stroke. Part Two: Modeling Cerebral Ischemia. *The Open Neurology Journal* [online]. 2010, Volume 4, Issue 2, pp. 34-38 [cit. 2017-07-20]. Dostupné z: <http://benthamopen.com/journal/render-fulltext.php?articleID=TONEUJ-4-34>
24. HEISS, W. D. The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2012, Volume 1268, Issue 1, pp. 26-34 [cit. 2017-08-06]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2012.06668.x>

25. JONES, T. A., JEFFERSON, S. C. Reflections of experience-expectant development in repair of the adult damaged brain. *Developmental Psychobiology* [online]. 2011, Volume 53, Issue 5, pp. 466-475 [cit. 2017-08-06]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dev.20557>
26. JONES, T. A., ADKINS., D. A. L. Motor System Reorganization After Stroke: Stimulating and Training Toward Perfection. *Physiology* [online]. 2015, Volume 50, Issue 5, pp. 358-370 [cit. 2017-07-31]. Dostupné z: <http://physiologyonline.physiology.org/lookup/doi/10.1152/physiol.00014.2015>
27. KALITA, Z. Akutní cévní mozkové příhody: diagnostika, patofyziologie, management. Praha: Maxdorf, 2006, 626 s. ISBN 80-85912-26-0.
28. KWAKKEL, G., VEERBEEK, J. M., VAN WEGEN, E. E. H., WOLF, S. L. Constraint-induced movement therapy after stroke. *The Lancet Neurology* [online]. 2015, Volume 14, Issue 2, pp. 224-234 [cit. 2017-08-06]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442214701607>
29. KIM, S. Y., ALLRED, R. P., ADKINS, D. L., TENNANT, K. A., DONLAN, N. A., KLEIM, J. A., JONES, T. A.. Experience with the "Good" Limb Induces Aberrant Synaptic Plasticity in the Perilesion Cortex after Stroke. *Journal of Neuroscience* [online]. 2015, Volume 35, Issue 22, pp. 8604-8610 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0829-15.2015>
30. KOLÁŘ, Pavel. *Rehabilitace v klinické praxi*. Praha: Galén, 2009, 713 s. ISBN 978-80-7262-657-1.
31. OKABE, N., NARITA, K., MIYAMOTO, O. Axonal remodeling in the corticospinal tract after stroke: how does rehabilitative training modulate it? *Neural Regeneration Research* [online]. 2017, Volume 12, Issue 2, pp. 185-192 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://www.nrronline.org/text.asp?2017/12/2/185/200792>

32. LIU, Z., ZHANG, R. L., LI, Y., CUI, Y., CHOPP, M.. Remodeling of the Corticospinal Innervation and Spontaneous Behavioral Recovery After Ischemic Stroke in Adult Mice. *Stroke* [online]. 2009, Volume 40, Issue 7, pp. 2546-2551 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/STROKEAHA.109.547265>
33. LANG, K. C., THOMPSON, P. A., WOLF, S. L.. The EXCITE Trial. *Neurorehabilitation and Neural Repair* [online]. 2013, Volume 27, Issue 7, pp. 654-663 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1545968313481281>
34. LEVIN, M. F., KLEIM, J. A., WOLF, S. L.. What Do Motor “Recovery” and “Compensation” Mean in Patients Following Stroke? *Neurorehabilitation and Neural Repair* [online]. 2008, Volume 23, Issue 4, pp. 313-319 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1545968308328727>
35. LUKÁŠ, K., ŽÁK, A. *Chorobné znaky a příznaky: diferenciální diagnostika*. Praha: Grada, 2014, 928 s. ISBN 978-80-247-5067-5.
36. MALDONADO, M. A., ALLRED, R. P., FELTHAUSER, E., L., JONES, T. A. Motor Skill Training, but not Voluntary Exercise, Improves Skilled Reaching After Unilateral Ischemic Lesions of the Sensorimotor Cortex in Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair* [online]. 2008, Volume 22, Issue 3, pp. 250-261 [cit. 2017-08-05]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1545968307308551>
37. MOZAFFARIAN, D., BENJAMIN, E. J., GO, A. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* [online]. 2016, Volume 133, Issue 4, pp. 38-360 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://circ.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/CIR.0000000000000350>
38. MACLELLAN, C. L., LANGDON, K. D., BOTSFORD, A., BUTT, S., CORBETT, D. A Model of Persistent Learned Nonuse Following Focal

- Ischemia in Rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair* [online]. 2013, Volume 27, Issue 9, pp. 900-907 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1545968313496323>
39. MIKULECKÁ, A., MAREŠ, P. NMDA receptor antagonists impair motor performance in immature rats. *Psychopharmacology* [online]. 2002, Volume 162, Issue 4, pp. 364-372 [cit. 2017-08-08]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00213-002-1122-2>
40. MONTOYA, C.P., CAMPBELL-HOPE, L.J., PEMBERTON, K.D., DUNNETT, S.B.. The “staircase test”: a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. 1991, Volume 36, Issue 2, pp. 219-228 [cit. 2017-08-01]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165027091900485>
41. NEVŠÍMALOVÁ, S., RŮŽIČKA, E., TICHÝ J. a kol. Neurologie. Praha: Galén, 2002, 368 s. ISBN 80-7262-160-2.
42. O'COLLINS, V. E., MACLEOD, M. R., DONNAN, G. A., HORKY, L. L., VAN DER WORP, B. H., HOWELLS, D. W. 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Annals of Neurology* [online]. 2006, Volume 59, Issue 3, pp. 467-477 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ana.20741>
43. PARK, J. W., BANG, M. S., KWON, B. S., et al. Early treadmill training promotes motor function after hemorrhagic stroke in rats. *Neuroscience Letters* [online]. 2010, Volume 471, Issue 2, pp. 104-108 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394010000480>
44. POLI, P., MORONE, G., ROSATI, G., MASIERO, S. Robotic Technologies and Rehabilitation: New Tools for Stroke Patients' Therapy. *BioMed Research International* [online]. 2013, Volume 2013, pp. 1-8 [cit. 2017-08-07]. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/153872/>

45. STARKEY, M. L., BLEUL, C., ZÖRNER, B., LINDAU, N. T., MUEGGLER, T., RUDIN, M., SCHWAB, M. E. Back seat driving: hindlimb corticospinal neurons assume forelimb control following ischaemic stroke. *Brain* [online]. 2012, Volume 135, Issue 11, pp. 3265-3281 [cit. 2017-08-08]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/aws270>
46. REHME, A. K., GREFKES, C. Cerebral network disorders after stroke: evidence from imaging-based connectivity analyses of active and resting brain states in humans. *The Journal of Physiology* [online]. 2013, Volume 591, Issue 1, pp. 17-31 [cit. 2017-08-08]. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2012.243469>
47. SCHAAR, K. L, BRENNEMAN, M. M., SAVITZ, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine* [online]. 2010, Volume 2, Issue 1 [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <http://etsmjournals.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-7378-2-13>
48. Stroke: First aid [online]. 2014 [Cit. 2017-07-01]. Dostupné na <http://www.mayoclinic.org/first-aid/first-aid-stroke/basics/ART-20056602>
49. VAN DER STAAY, F J. The study of behavioral dysfunctions. Groningen: Graduate School of Behavioral and Cognitive Neurosciences, University Groningen, the Netherlands, 2000. ISBN 90-367-1195-9.
50. TENNANT, K. A., KERR, A. L., ADKINS, D. A. L., DONLAN, N., THOMAS, N., KLEIM J. A., JONES, T. A.. Age-Dependent Reorganization of Peri-Infarct “Premotor” Cortex With Task-Specific Rehabilitative Training in Mice. *Neurorehabilitation and Neural Repair* [online]. 2014, Volume 29, Issue 2, pp. 193-202 [cit. 2017-08-08]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1545968314541329>
51. WINSTEIN, C. J., STEIN, J., ARENA, R., et al. Guidelines for Adult Stroke Rehabilitation and Recovery. *Stroke* [online]. 2016, Volume 47, Issue 6, pp. 98-

169 [cit. 2017-07-31]. Dostupné z:

<http://stroke.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/STR.0000000000000098>

52. WHISHAW, I. Q., PELLIS, S.M. The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. *Behavioural Brain Research* [online]. 1990, Volume 41, Issue 1, pp. 49-59 [cit. 2017-08-02]. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016643289090053H>
53. XU, T., YU, X., PERLIK, A. J., TOBIN, W. F., ZWEIG, J. A., TENNANT, K., JONES, T., ZUO, Y. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature* [online]. 2009, Volume 462, Issue 7275, pp. 915-919 [cit. 2017-08-08]. Dostupné z:
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature08389>
54. ZVOLSKÝ, M. Hospitalizovaní a zemřelí na cévní nemoci mozku v ČR v letech 2003-2010. *Aktuální informace Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky* [online]. roč. 2012, č. 3, s. 1-27 [cit. 2017-07-20]. Dostupné z:
http://www.uzis.cz/system/files/03_12.pdf

Seznam grafů

Graf 1 Tréninková fáze Reaching testu – 1. Týden	38
Graf 2 Výsledný graf úspěšnosti v Reaching testu a u CMP a kontrolní (C) skupiny ..	38
Graf 3 Graf znázorňující celkový počet pokusů v Reaching testu u CMP a kontrolní skupiny.....	39
Graf 4 Kumulativní hodnoty úspěšnosti v Reaching testu u CMP a kontrolní skupiny	39
Graf 5 Výkon zvířat v Bar holding testu.....	40
Graf 6 Rotarod test, 1. a 2. testování před zásahem při rychlosti 20 a 30 rpm	41
Graf 7 Rotarod test, výkon kontrolní a CMP skupiny při opakovaném testování při rychlosti 20 rpm	41
Graf 8 Rotarod test, výkon kontrolní a CMP zvířat při opakovaném testování při rychlosti 30 rpm	42
Graf 9 Ladder rung walking test – výkon při pravidelném uspořádání mezer (A) a počet chyb (propad končetin do mezer) během přecházení žebříku (B)	43
Graf 10 Ladder rung walking test – výkon při nepravidelném uspořádání mezer (A) a počet chyb (propad končetin do mezer) během přecházení žebříku (B)	43
Graf 11 Open field, lokomoční aktivita vyjádřená ušlou vzdáleností (cm) v OF.....	45
Graf 12 Open field. Čas strávený v centrální části arény	45
Graf 13 Graf hodnotící korelaci mezi velikostí léze potkana a jeho úspěšností v Reaching testu 11., 15. a 19. den experimentu.	46

Seznam obrázků

Obrázek 1 Mezinárodní zkratka FAST, která pomáhá rozpoznat příznaky CMP (American Heart Association 2017)	15
Obrázek 2 Časové schema celého experimentu	29
Obrázek 3 Časové schema prvního týdne experimentu	29
Obrázek 4 Časové schema druhého týdne experimentu	30
Obrázek 5 Časové schema třetího týdne experimentu	30
Obrázek 6 Testovací box pro Reaching test (A), ukázka zvířete při Reaching testu (B)	31
Obrázek 7 Rotarod test	32
Obrázek 8 Bar holding test (A), zvíře přitahující zadní končetiny při Bar holding testu (B)	33
Obrázek 9 Ladder rung walking test, testovací žebřík (A), zvíře přecházející žebřík s pravidelným a nepravidelným uspořádáním (B)	34
Obrázek 10 Open field test, testovací box a kamera (A), zvíře v testovacím boxu (B)	35
Obrázek 11 Znázornění arény pro Open field test a popis jednotlivých částí.....	35
Obrázek 12 Ukázka trajektorie zvířete v Open fieldu	44



Přílohy




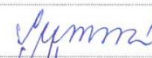

Příloha č. 1 - projekt pokusů Akademie věd ČR



Příloha č. 2 – řezy mozku potkana pro vyměření velikosti léze

Příloha č. 1 - projekt pokusů Akademie věd ČR

PROJEKT POKUSŮ 132/2013 podle § 16a zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů			
1.	Žadatel - název právnické osoby nebo jméno, popřípadě jména, a příjmení fyzické osoby, která provozuje zařízení		
	FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, v.v.i.		
	IČ, bylo-li přiděleno	67985823	Registrační číslo hospodářství ¹⁾
	CZ11760005		
Adresa sídla nebo místa podnikání žadatele (včetně PSČ a okresu)			
VÍDEŇSKÁ 1083, 142 20 PRAHA-4			
Vedoucí projektu pokusů - titul, jméno, popřípadě jména, a příjmení a číslo osvědčení podle § 15d odst. 3 nebo § 15e odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.			
Doc. MUDr. Jakub Otáhal, PhD, ČZU 410/00			
2.	Název projektu pokusů, úkolu studie, případně označení grantu		
Epileptogeneza v ischemickém mozku			
3.	Podrobná charakteristika cílů studie s uvedením konkrétního očekávaného přínosu, včetně charakteristiky aplikovaných látek, nebo zařazení látek do indikačních skupin, s výjimkou výstupní kontroly šarží látek		
Hlavním přínosem plánované studie je rozšíření znalostí mechanismů vývojových specifík vzniku epilepsie v důsledku ischemického poškození mozku. Cílem experimentů je určení věkové specifických mechanismů, zapojených do epileptogeneze a iktogeneze a vyhledávání nových, terapeutických cílů pro léčbu a prevenci epilepsie a dalších důsledků časného ischemického poškození			
4.	Účel plánovaných pokusů podle § 18 zákona č. 246/1992 Sb.		
Odpovídající zařazení označte křížkem (x) do prázdného políčka			
x a) základní výzkum			
x b1) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem zabránit a předejít onemocnění, špatnému zdravotnímu stavu nebo jiným anomáliím nebo jejich následkům u lidí, zvířat nebo rostlin a diagnostikovat je nebo léčit			
b2) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem posoudit, zjistit, regulovat nebo upravit fyziologické předpoklady lidí, zvířat nebo rostlin			
b3) translační nebo aplikovaný výzkum s cílem zlepšit životní podmínky a podmínky produkce zvířat chovaných k zemědělským účelům			
c) jakýkoli z cílů uvedených v písmenu b) při vývoji, výrobě nebo zkoušení kvality, účinnosti a nezávadnosti léčiv, potravin, krmiv a jiných látek nebo výrobků			
d) ochrana přírodního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí nebo zvířat			
e) výzkum zaměřený na zachování druhů			
f) vyšší vzdělávání nebo odborná příprava za účelem získání, udržení nebo zlepšení odborných znalostí			
g) trestní řízení a jiné soudní řízení			
5.	Podrobný popis pokusu a činnosti s pokusnými zvířaty		
Vyvolání ischemické léze: Zvířatům P7, případně starším (až do dospělosti) bude v celkové anestezii (2% isofluran inhalačně) aplikován roztok bengálské červeně (10 mg/1 ml v PBS, pak 0.15ml na zvíře) a vybraná oblast mozkové kůry bude ozářena s pomocí Roithner Laser, Austria (50 mW output) po dobu 60s (0.5s on/off cykly) přes intaktní lebeční kost. Kožní incise, nezbytná pro provedení ozáření, bude ošetřena kolodiem. Po probuzení budou mláďata vrácena k matce.			
Euthanasie pro získání tkání: zvířata budou dekapitována v etherové anestézii nebo perfundována 4% roztokem paraformaldehydu v urethanovém komatu (2g/kg).			
6.	Prohlášení žadatele o průkazu nezbytnosti pokusu nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusu ukládá, včetně zdůvodnění, proč nelze pokus na pokusném zvířeti nahradit alternativními metodami		
Alternativní metody nepostihují složitost zkoumané problematiky a proto nemohou nahradit navrhované pokusy.			
7.	Způsob značení pokusných zvířat v pokusu		
Fixem na ocase, štítkem na chovných nádobách			
8.	Umístění pokusných zvířat během pokusu nebo u volně žijících zvířat místo pokusu		
Příruční zvěřinec, přízemí budovy D, č. dveří 022.			
9.	Časový plán jednotlivých fází pokusu na pokusných zvířatech, včetně data jeho ukončení		
V případě předpokládaného prodloužení akreditace bude datum ukončení pokusu 30.05.2018			
10.	Úroveň operačního vybavení a způsob pooperační péče		
Pro vyvolání ischemie bude použita místnost č. 004, budova D případně operační místnost, suterén budovy D, č. dveří. Místnosti jsou vybaveny zařízením na inhalační anestezii, stereotaktickými aparáty, operačním mikroskopem, vyhřívacími deskami na udržování tělesné teploty anestezovaných zvířat, zařízením na rychlou sterilizaci nástrojů, UV zářičem a dalším nezbytným zařízením. Během zásahu jsou zvířata umístěna na vyhřívané dešce (34°C). Po zákroku je zvířatům věnována zvýšená péče (zajištění příjmu potravy, hydratace, minimalizace bolesti a diskomfortu.).			

11.	Způsob naložení s pokusnými zvířaty po ukončení pokusu <i>Usmrcení zvířete po dosažení výsledků pokusu bude provedeno předávkováním celkové anestezie. Kadaver bude uložen v kafilerním boxu v suterénu budovy G. Odvoz kadaveru je zajištěno asanační službou.</i>	
12.	Uvedení zdravotního rizika pro další pokusná zvířata a pro zaměstnance <i>Při dodržování vnitřních předpisů o bezpečnosti práce z uvedeného pokusu mohou vyplývat pouze běžná rizika pro další zvířata a zaměstnance. Další rizika nejsou.</i>	
13.	Údaj o úrovni podmínek správné laboratorní praxe (je-li to požadováno jinými právními předpisy – např. zákon o léčivech, zákon o chemických látkách a chemických přípravcích, apod.) <i>Nejsou požadovány</i>	
14.	Datum <i>23.9.2013</i>	Razítko a podpis žadatele  FYZIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, v.v.i. Videňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč Česká republika 2
		Podpis vedoucího projektu pokusů 

<i>Tuto tabulku vyplňuje odborná komise pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat</i>		
STANOVISKO ODBORNÉ KOMISE PRO ZAJIŠŤOVÁNÍ DOBRÝCH ŽIVOTNÍCH PODMÍNEK POKUSNÝCH ZVÍŘAT K PŘEDLOŽENÉMU PROJEKTU POKUSŮ		
Předložený projekt pokusů je v souladu se zákonem 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. Projekt pokusů je doporučen ke schválení resortní komisí.		
Členové odborné komise		
Jméno	Podpis	Datum
Doc. PharmDr Hana Kubová, DrSc.		
Ing. Josef Lachout, CSc.		<i>26.9.2013</i>
Mgr. Andrej Litvinec, Ph.D.		<i>26.9.2013</i>
PharmDr. Alena Sumová DSc.		<i>26.9.2013</i>
RNDr Karel Valeš, PhD.		<i>26.9.2013</i>

<i>Tuto tabulku vyplňuje státní orgán příslušný ke schvalování projektů pokusů</i>	
Státní orgán příslušný ke schvalování projektů pokusů potvrzuje, že tento projekt pokusů byl schválen rozhodnutím – číslo jednací, spisová značka, ze dne	132/2013 <i>ze dne 3.10.2013</i>
Razítko a podpis státního orgánu příslušného ke schvalování projektů pokusů	 

Poznámka:

¹⁾ § 2 písm. c) vyhlášky č. 136/2004 Sb., kterou se stanoví podrobnosti označování zvířat a jejich evidence a evidence hospodářství a osob stanovených plemenářským zákonem, ve znění pozdějších předpisů.



Akademie věd České republiky
Václavská 1083, 142 20 Praha 4
tel.: 241063173

Č. j.: 132/2013
Vyřizuje: MVDr. Jan Honetschläger, MBA
Telefon: 774798153
E-mail: honet@img.cas.cz

V Praze dne 18. 11. 2013

ROZHODNUTÍ

Akademie věd České republiky (dále jen „AV ČR“), která je státním orgánem příslušným ke schvalování projektu pokusů k rozhodování o schválení nebo neschválení projektu pokusů z hlediska jeho souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů (dále jen „zákon na ochranu zvířat“), a prováděcími právními předpisy vydanými k jeho provedení, a o změně, pozastavení nebo odnětí rozhodnutí o schválení projektu pokusů podle AV ČR - § 23 odst. 2 písm. c) a § 23a odst. 1 písm. a) zákona na ochranu zvířat, v řízení zahájeném na základě žádosti podané Fyziologickým ústavem AV ČR, v.v.i., zastoupená ve správním řízení RNDr. Lucíí Kubínovou, CSc., ředitelkou, podle § 44 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správního řádu, ve znění pozdějších předpisů, na základě § 23a odst. 1 písm. a) zákona na ochranu zvířat ve věci schválení projektu pokusů rozhodla takto:

**Projekt pokusů „Epileptogeneza v ischemickém mozku“ (dále jen „projekt pokusů),
podaný Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., se sídlem Václavská 1083, 142 20 Praha 4,
IČ 67985823 (dále jen „žadatel“),**

se z hlediska souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat

s c h v a l u j e

a to na dobu do 5 let ode dne právní moci tohoto rozhodnutí.

Vedoucím projektu pokusů je Doc. MUDr. Jakub Otáhal, PhD, evidenční číslo
osvědčení o odborné způsobilosti podle § 15d odst. 3 zákona na ochranu zvířat / evidenční

číslo osvědčení o prodloužení doby platnosti osvědčení podle § 15e odst. 1 zákona na ochranu zvířat ČZU 410/00.

Zástupcem vedoucího projektu pokusů je Doc. PharmDr Hana Kubová, DrSc, evidenční číslo osvědčení o odborné způsobilosti podle § 15d odst. 3 zákona na ochranu zvířat / evidenční číslo osvědčení o prodloužení doby platnosti osvědčení o podle § 15e odst. 1 zákona na ochranu zvířat 0639/98-M/17, vydáno VFU Brno.

Projekt pokusů bude prováděn ve schváleném zařízení uživatele pokusných zvířat Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4 .

Na projekt pokusů se **vztahuje** povinnost zpětného posouzení podle § 16c zákona na ochranu zvířat. Projekt pokusů bude zpětně posuzován ke dni 18. 11. 2019.

O D Ů V O D N Ě N Í

Žádost o schválení projekt pokusů podle § 16a zákona na ochranu zvířat a podle § 5 vyhlášky č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat (dále jen „vyhláška“) byla AV ČR doručena dne 3. 10. 2013. Tímto dnem bylo zahájeno správní řízení.

AV ČR posoudila, zda předložená žádost o schválení projektu pokusů vyhovuje kritériím podle § 16b odst. 1 zákona na ochranu zvířat. Předložená žádost kritériím stanovených zákonem vyhověla.

AV ČR provedla podrobné hodnocení předloženého projektu pokusů dle hledisek stanovených v ustanovení § 16b odst. 2 zákona na ochranu zvířat.

Žadateli byla udělena akreditace osoby provozující uživatelské zařízení rozhodnutím Ministerstva zemědělství č.j. 36215/2008-10001, ze dne 9.12.2008. Toto rozhodnutí je platné 5 let ode dne právní moci tohoto rozhodnutí. Předložený projekt pokusů je v souladu s výše uvedeným rozhodnutím.

Na základě předložené žádosti, po provedení hodnocení projektu pokusů podle § 16b zákona na ochranu zvířat AV ČR ve vyhodnocení projektu pokusů dospěla k závěru, že předložený projekt pokusů obdržel příznivé hodnocení z hledisek uvedených v § 16b zákona na ochranu zvířat.

Podle § 23a odst. 2 zákona na ochranu zvířat státní orgán příslušný ke schvalování projektů pokusů neschválí ty projekty pokusů, které neobdržely příznivé hodnocení projektu pokusů podle § 16b zákona na ochranu zvířat.

Na základě příznivého hodnocení projektu pokusů v rámci jeho hodnocení dle kritérií podle § 16b zákona na ochranu zvířat AV ČR rozhodla o schválení projektu pokusů a to na dobu 5 let, a to vzhledem ke splnění stanovených podmínek, které jsou v souladu se zákonem na ochranu zvířat a vyhláškou.

Podle § 16b odst. 5 zákona na ochranu zvířat, obdržel-li projekt pokusů příznivé hodnocení projektu pokusů, určí státní orgán příslušný ke schvalování projektu pokusů, zda a kdy by se měl projekt pokusů zpětně posoudit. S ohledem na požadavky ustanovení § 16c

zákona na ochranu zvířat bylo ve výroku rozhodnutí stanoveno, že tento projekt pokusů bude zpětně posuzován, neboť se na něj vztahuje zákonná povinnost posouzení ve smyslu § 16c odst. 2 zákona na ochranu zvířat.

V souladu s § 16d odst. 5 zákona na ochranu zvířat bylo rozhodnuto v zákonem stanovené lhůtě.

Z výše uvedených důvodů bylo rozhodnuto tak, jak je uvedeno ve výroku tohoto rozhodnutí.

POUČENÍ ÚČASTNÍKŮ

Proti tomuto rozhodnutí lze podat podle § 152 odst. 1 zákona č. 500/2004 Sb., správního řádu, ve znění pozdějších předpisů, ve lhůtě 15 dnů ode dne jeho oznámení rozklad k Rezortní komisi AV ČR, a to podáním učiněným u AV ČR.

Podle § 16c odst. 4 zákona na ochranu zvířat je uživatel pokusných zvířat povinen na vyžádání poskytnout AV ČR všechny doklady a informace nezbytné k provedení zpětného posouzení.

MVDr. Jan Honetschlager, MBA
Předseda Rezortní komise AV ČR



Přílohy:

1. Schválená žádost o schválení projektu pokusů - Epileptogeneza v ischemickém mozku, počet stran 6

Doručí se:

Účastník řízení (datovou schránkou / do vlastních rukou na doručenkou) – Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., se sídlem Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Příloha č. 2 – řezy mozku potkana pro vyměření velikosti léze

