

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Hana Freislebenová

**Behaviorální testování experimentálních zvířat  
po míšním poranění**

Behavioral Testing of Animals After Experimental Spinal Cord Injury

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Lucia Machová Urdzíková, Ph.D.

Praha 2017

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou 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, 15.05.2017

---

Hana Freislebenová

## **Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své školitelce MUDr. Lucii Machové Urdzíkovej, Ph.D. za trpělivost, věnovaný čas a poskytnuté rady. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a svým přátelům za podporu během studia.

# Abstrakt

Míšní poranění je jedním z nejtěžších úrazů, který vede ke snížení kvality života jak po fyzické, tak i po psychické stránce. Přestože v současné době neexistuje žádná účinná léčba, je vývoji nových léčebných postupů věnováno velké úsilí. Účinnost experimentální léčby je ověřována pomocí behaviorálních testů prováděných na zvířecích modelech, nejvhodnější pro tento typ poranění jsou potkani. Behaviorální testy se dělí do několika skupin podle toho, na co je testování zaměřeno. Lokomotorické testy zkoumají funkci lokomotorického aparátu, motorické testy slouží k určení funkce kosterních svalů, které nejsou primárně zapojené do lokomoce, senzorio-motorické testy testují funkčnost senzorio-motorického aparátu a jejich propojení, senzorio testy jsou určeny k testování odpovědi na senzorio podněty. Elektrofyziologické testy společně s funkční magnetickou rezonancí patří do skupiny speciálních testů, které využívají uměle vyvolaných elektrických podnětů k měření aktivity svalů.

Tato práce je zaměřena na detailní popis vybraných behaviorálních testů, jejich funkčnosti a porovnání jejich výhod a nevýhod.

**Klíčová slova:** behaviorální testování, míšní poranění, paraplegie, potkan, mícha

# Abstract

Spinal cord injury is one of the most serious injury that leads to a decrease in the quality of life both physically and mentally. Although there is currently no effective treatment, great efforts are being made to develop new treatments. The effectiveness of experimental treatment is verified by behavioral tests performed on animal models, where rats are the most suitable ones for this type of injury. Behavioral tests are divided into several groups depending on what the testing is focused on. Locomotor tests examine the function of a locomotive apparatus, motor tests are used to determine the function of skeletal muscles not primarily involved in locomotion, sensory and motor tests test the functionality of sensory and motor apparatus and their interconnection, sensory tests are designed to test responses to sensory stimuli. Electrophysiological tests and functional magnetic resonance imaging are part of a series of special tests that use artificially induced electrical stimuli to measure muscle activity.

This thesis is focused on detailed description of selected behavioral tests, their functionality and comparison of their advantages and disadvantages.

**Keywords:** behavioral testing, spinal cord injury, paraplegia, rat, spinal cord

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Mícha</b>	<b>3</b>
2.1	Patofyziologie poranění míchy . . . . .	4
2.1.1	Primární poranění . . . . .	4
2.1.2	Sekundární poranění . . . . .	4
2.1.2.1	Zánět . . . . .	4
2.1.2.2	Nekróza a apoptóza . . . . .	5
2.1.2.3	Glutamátová cytotoxicita . . . . .	5
2.1.2.4	Demyelinizace . . . . .	6
<b>3</b>	<b>Potkan jako laboratorní model</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Lokomotorické testy</b>	<b>9</b>
4.1	BBB test . . . . .	9
4.2	Kinematická analýza ( <i>Kinematic Analysis</i> ) . . . . .	10
4.3	Plavecký test ( <i>Swim Test</i> ) . . . . .	10
4.4	CatWalk ( <i>Automated Walkway</i> ) . . . . .	11
4.5	Analýza otisku stopy ( <i>Footprint Analysis Test</i> ) . . . . .	12
4.6	Thorakolumbální test ( <i>Thoracolumbal Heigh Test</i> ) . . . . .	13
4.7	Eshkol-Wachmannova notace . . . . .	13
<b>5</b>	<b>Motorické testy</b>	<b>14</b>
5.1	Nakloněná rovina ( <i>Inclined Plane</i> ) . . . . .	14
5.2	Cylindrový test ( <i>Forelimb Asymmetry</i> ) . . . . .	14
5.3	Test stoje na zadních ( <i>Rearing Test</i> ) . . . . .	15
5.4	Uchopovací test ( <i>Limb Hanging Test</i> ) . . . . .	15
5.5	Test síly končetin ( <i>Limb Grip Strength Test</i> ) . . . . .	16

5.6	Test získání jídla ( <i>Food Pellet Reaching Test</i> ) . . . . .	16
<b>6</b>	<b>Senzoricko-motorické testy</b>	<b>18</b>
6.1	Chůze po kladině ( <i>Narrow Beam Test, Beam Walking Test</i> ) . . . . .	18
6.2	Test smekání ( <i>Foot Slip Test, Horizontal Ladder Walking Test</i> ) . . . . .	19
6.3	Test chůze po mřížce ( <i>Grid Walking Test</i> ) . . . . .	20
6.4	Chůze po laně ( <i>Rope Walking Test</i> ) . . . . .	20
<b>7</b>	<b>Senzorické testy</b>	<b>22</b>
7.1	Test citlivosti na teplo ( <i>Hot Plate-based Test</i> ) . . . . .	22
7.2	Test citlivosti na chlad ( <i>Cold Sensitivity-based Test</i> ) . . . . .	23
7.3	Von Freyova filamenta ( <i>Von Frey Filaments</i> ) . . . . .	23
<b>8</b>	<b>Testy založené na reflexní odpovědi</b>	<b>24</b>
8.1	Test odezvy ( <i>Contact Placing Response Test</i> ) . . . . .	24
8.2	Reflex roztahování prstů ( <i>Toe Spread Reflex</i> ) . . . . .	24
8.3	Vzpřimovací reflex ( <i>Righting Reflex</i> ) . . . . .	25
<b>9</b>	<b>Elektrofyzologie a funkční zobrazování magnetickou rezonancí</b>	<b>26</b>
9.1	Záznam pohybu pomocí kontaktní elektrody . . . . .	26
9.2	Evokované potenciály — transkraniálně . . . . .	26
9.3	Motoricky evokované potenciály — intrakraniálně-intraspinálně . . . . .	27
9.4	Funkční zobrazování magnetickou rezonancí (fMRI) . . . . .	27
<b>10</b>	<b>Závěr</b>	<b>29</b>
<b>11</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>31</b>

# Seznam použitých zkratek

SCI	poranění míchy ( <i>spinal cord injury</i> )
IL-1 $\beta$	interleukin 1 $\beta$
IL-6	interleukin 6
TNF- $\alpha$	tumornekrotizující faktor $\alpha$
ROS	reaktivní formy kyslíku
LSS	Louisville swim scale
fMRI	funkční magnetická rezonance ( <i>Functional magnetic resonance imaging</i> )



# 1. Úvod

Poranění míchy (*spinal cord injury*, SCI) patří mezi nejvíce devastující poranění a za následek má dočasné nebo trvalé poškození sensorických a motorických funkcí. Míšní poranění ovlivňuje nejen fyzický, ale i psychický stav poraněného jedince, ale i celé jeho rodiny. Incidence je každoročně 40 nových případů na milion lidí na celém světě a nejčastěji postihuje mladé lidi s průměrným věkem 28,6 let (Basso, 2004). V České republice se ročně vyskytne průměrně 250 nových případů z nichž většinu tvoří muži (SpinalCord.CZ, 2017).

SCI je tvořeno sérií procesů, které jsou zapříčiněny mechanickým poškozením míchy. Tyto patofyziologické procesy se navzájem ovlivňují a společně vedou k poškození nervové tkáně. Prozatím neexistuje žádný léčebný postup, který by přinesl řešení, a proto je po celém světě vyvíjeno velké úsilí v oblasti výzkumu míšního poranění a jeho léčby. V současné době existuje několik slibných řešení jako je například terapie pomocí kmenových buněk (Sykova *et al.*, 2006), implantace biomateriálů (Shrestha *et al.*, 2014) či funkčně elektrická stimulace (Beaumont *et al.*, 2014).

Nejčastěji používaným modelovým zvířetem při experimentech je potkan (*Rattus norvegicus*), u kterého lze experimentálně vytvořit lézi pomocí nejrůznějších traumatických modelů jako je například transekce (Centenaro *et al.*, 2013), hemisekce (Shi *et al.*, 2014), kontuze (Beattie *et al.*, 1997) atd. Ideální je, aby reakce u potkanů odpovídaly klinickým znakům u lidských pacientů po SCI.

Behaviorální testování a jeho výsledky se používají na funkční ověření jednotlivých experimentálních teorií, z tohoto důvodu jsou důležitým faktorem pro budoucí klinické studie. (Basso, 2004). Pomocí behaviorálních testů se lokalizuje léze a určuje se její velikost, mapuje se integrita specifických motorických a sensorických drah a dokumentuje se průběh zotavení po SCI.

Podle údajů, které lze z těchto testů získat, je můžeme dělit do několika kategorií: lokomotorické testy, kdy dochází k testování lokomotorického aparátu u zvířat, motorické testy, které analyzují sílu, koordinaci a další schopnosti kosterních svalů, sensorické testy, které vyhodnocují propriocepci a reakci na teplo, bolest či dotek, sensoricko-motorické testy, které testují správné propojení sensorických a motorických drah. Dále lze použít elektrofyziologická měření, při kterých se detekuje svalová a sensorická funkčnost.

Cílem této práce je shrnout nejčastěji používané behaviorální testy u zvířat po

SCI. V první části jsou shrnuty poznatky o míše a patofyziologických procesech, které se účastní míšního poranění, druhá část se věnuje potkanům jako laboratorním zvířatům a obecným zásadám, které jsou důležité při výběru zvířete, aby byl pokus reprodukovatelný. Ve třetí části jsou popsány nejčastěji používané behaviorální testy.

## 2. Mícha

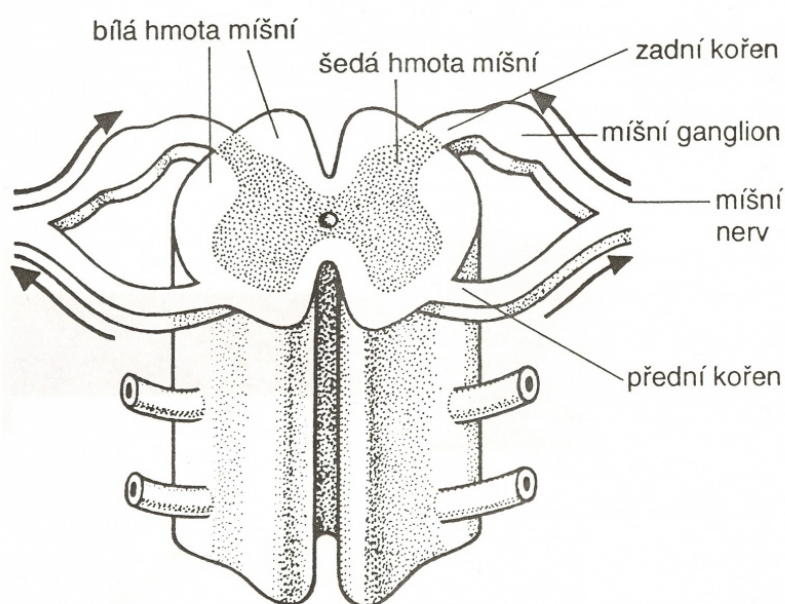
Mícha (*medulla spinalis*) je tenký sloupec nervové tkáně uložený v páteřním kanále a zajišťuje komunikaci mezi mozkem a periferním nervstvem. Mimo to je také schopna určitých autonomních funkcí a koordinace některých reflexů.

Začíná na úrovni prvního krčního obratle, kde navazuje na prodlouženou míchu a končí u druhého bederního obratle v místě nazývaném *conus medullaris*.

Mícha je u lidí dlouhá 40-45 cm a směrem dolů se zužuje z 13 mm na 6 mm. V oblasti krční a bederní páteře je mícha zesílena v místech, kde z ní vystupují nervy inervující horní a dolní končetiny.

Lidská mícha je rozdělena do 31 segmentů, tedy 8 krčních, 12 hrudních, 5 bederních, 5 křížových a 1 kostrčního, a z každého segmentu vychází jeden pár míšních nervů, které inervují specifickou oblast těla a vznikají spojením ventrálních (motorických, eferentních) a dorzálních (senzorických, aferentních) kořenů míšních. Na zadních kořenech míšních se nachází míšní ganglia obsahující těla aferentních neuronů.

Míšní tkáň je tvořena bílou a šedou hmotou, na rozdíl od mozku se bílá hmota nachází na povrchu a šedá hmota uvnitř. Šedá hmota má na průřezu tvar písmene H a rozeznáváme na ní přední a zadní rohy. (Obrázek 1.)



Obrázek 1: **Anatomie míchy.** Zdroj: Novotný & Hruška (2010)

## 2.1 Patofyziologie poranění míchy

Míšní poranění je velice závažný stav tvořený vzájemně se ovlivňujícími patofyziologickými ději, které poškozují míšní tkáň a způsobují změny v neuronech a v přenosu signálu nervovými drahami, což vede k rozličným sensorickým i motorickým poruchám. Rozsah poruch je závislý na lokalizaci a velikosti poranění. Rozlišujeme dva druhy poranění — sekundární a primární.

### 2.1.1 Primární poranění

Primární poranění míchy vzniká v důsledku mechanického působení na míchu během zranění, čímž dochází k přerušení nervových vláken a k poškození buněčných membrán, což má za následek nekrózu buněk. Dochází k poškození krevních cév, které zásobují míchu a následně k hemoragii a k otoku. Otékající mícha pak vyplňuje prostor míšního kanálu a ve chvíli, kdy je tlak uvnitř kanálu vyšší jak tlak v krevních cévách, nastává ischemie (Becker *et al.*, 2003).

### 2.1.2 Sekundární poranění

Sekundární poranění navazuje na primární poranění a je výsledkem procesů, které jsou organismem spuštěny jako odpověď na prodělané trauma. Tyto procesy by měly vést k reparaci poškozené tkáně, avšak většinou mají spíše opačný charakter a tkáň poškozují ve větší míře než primární poranění. Často přímo brání regeneraci poškozené tkáně, z tohoto důvodu je oblast výzkumu terapie míšního poranění zaměřena hlavně na omezení sekundárních procesů, které se rozvinou po míšním poranění.

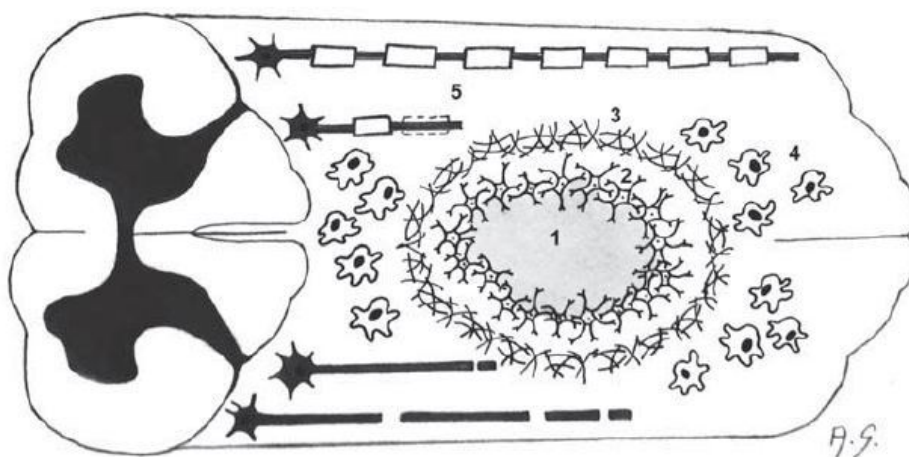
Tyto mechanismy lze zařadit do 25 kategorií (Oyinbo, 2011). Mezi nejdůležitější procesy patří zánět, glutamátová excitotoxicita, poškození reaktivními sloučeninami kyslíku, formování gliové jizvy, demyelinizace, apoptóza, nekróza.

#### 2.1.2.1 Zánět

V místě poranění dochází ke zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů interleukinu  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleukinu 6 (IL-6) a tumornekrotizujícího faktoru  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Vzestup produkce IL- $1\beta$  a TNF- $\alpha$  probíhá rychleji než pronikání buněk imunitního systému do místa léze, což je dle Streita *et al* z počátku produktem mikroglíí (Streit *et al.*, 1998). Hladina cytokinů dosahuje svého vrcholu jen několik málo hodin po

poranění a poté opět klesá téměř na počáteční úroveň. Během několika málo hodin dochází k infiltraci neutrofilů do místa zánětu. Neutrofilly produkují látky přispívající k rozvoji místního zánětu a zároveň fagocytují poškozenou tkáň. Bohužel tento proces často vede i k narušení původně zdravé tkáně. Později následuje druhá fáze infiltrace makrofágů do místa léze (Carlson *et al.*, 1998). V místě zánětu se může později vytvořit kavita ohraničená gliovou jizvou a může dojít k sekundární degeneraci axonů (Fitch *et al.*, 1999).

Gliovou jizvu vytváří astrocyty sdružující se do vzájemně se překrývajících svazků a působí jako fyzická bariéra důležitá pro regeneraci axonů. Zároveň i předchází dalšímu poškození tkáně tím, že zabraňuje šíření zánětlivých buněk (Wanner *et al.*, 2013). (Obrázek 2.)



Obrázek 2: **Schéma SCI:** 1) hemoragická léze, 2) gliová jizva tvořená astrocyty a jejich výběžky, 3) mezenchymální jizva, 4) makrofágy, 5) demyelinizace vláken.

Zdroj: Hejčl *et al.* (2015)

### 2.1.2.2 Nekróza a apoptóza

Neurony i glie vlivem míšního poranění podléhají jak nekróze, tak i apoptóze. Na rozdíl od nekrózy, která je způsobena mechanickým poškozením buněk v rámci primárního poranění, apoptóza probíhá až během sekundární fáze (Liu *et al.*, 1997b). Hlavní příčinou apoptózy je zvýšený příliv vápníku do buněk, mechanismus apoptózy je blíže popsán v následujícím odstavci.

### 2.1.2.3 Glutamátová cytotoxicita

Do extracelulárního prostoru je následkem primárního poranění z poškozených neuronů uvolňování hlavní excitační neurotransmitter glutamát. Brzo po poranění dochází ke kumulaci glutamátu v místě poranění, kde se stává toxickým pro okolní buňky (Dumont *et al.*, 2001). Glutamát má schopnost depolarizace buněčné membrány a aktivace napěťově ovládaných vápníkových kanálů. Zvýšená koncentrace glutamátu má tedy za následek masivní vtok vápenatých iontů do buňky. Ve chvíli, kdy jejich koncentrace překročí mezní hranici, dochází ke spuštění mechanismů vedoucích k apoptóze (Xu *et al.*, 2005).

Příliš vysoká koncentrace vápenatých iontů vede k selhání elektrontransportního řetězce, což má za následek produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Dochází k poškození mitochondrií, ty ztrácí svůj membránový potenciál, do cytoplazmy se uvolňuje cytochrom c a aktivují se kaspázy 3 a 9 což má za následek spuštění apoptózy buňky (Zhang *et al.*, 2014).

### 2.1.2.4 Demyelinizace

Demyelinizace axonů je způsobena jednak nekrotou oligodendrocytů, která je spuštěna glutamátovou excytotoxicitou a poté zhoršena kaskádou zahrnující apoptózu, poškození reaktivními kyslíkovými radikály a aktivitou pro a protizánětlivých mediátorů, ale i přímým mechanickým poškozením myelinové vrstvy (Casha *et al.*, 2001). Demyelinizace vrcholí 24 hodin po míšním poranění a po 7 až 14 dnech dochází k remyelinizaci, ovšem síla myelinového obalu se již nedostane do původního stavu (Totoiu & Keirstead, 2005).

### 3. Potkan jako laboratorní model

Potkan (*Rattus norvegicus*) je díky nenáročné péči, nízkým pořizovacím nákladům, vhodné velikosti a inteligenci nejpoužívanější laboratorní zvíře. Pro studium SCI je potkan daleko vhodnějším modelovým zvířetem než myš, která je menší než potkan, což znesnadňuje provedení chirurgických úkonů. Další velkou výhodou potkanů je jejich odolnost, bez větších problémů se zotaví i z tak vážného poranění jako je míšňí léze.

Mezi inbrední kmeny vhodné pro SCI studie patří Sprague-Dawley, Wistar, Long Evans, Louis či Fisher. V rámci určité studie by měl být vždy použit pouze jeden kmen. U jedinců odlišných kmenů byly pozorovány odchylky v genové expresi různých proteinů, což může po experimentálním poranění míchy vést k rozdílným regenerativním procesům. Například u potkanů z kmene Sprague-Dawley probíhá zotavení lokomotorického aparátu rychleji než u potkanů z kmene Wistar (Mills *et al.*, 2001).

Zvířata by měla být stejného věku a nejlépe i stejné váhy. Pro SCI studie se optimální váha potkana pohybuje kolem 300 a 350 g. V případě, že budou mezi jedinci velké váhové rozdíly, může dojít k tomu, že léze nebude u všech stejně velká (Vanicky *et al.*, 2001).

Při SCI studiích jsou užíváni jak samci, tak samičky, avšak celosvětově jsou samičky používanější než samci. Hlavní výhodou samic je kratší močová trubice, což kromě nižšího výskytu zánětu močových cest také zjednodušuje proces manuálního vyprazdňování, který je po zákroku nutností.

Na druhou stranu u samic vlivem estrálního cyklu dochází ke kolísání hladiny hormonů, což může ovlivňovat chování, stav zvířat a vývoj míšňí léze (Tatlisumak & Fisher, 2006). Je tedy nutné v dané studii vždy používat buď samce, anebo samičky.

V experimentálních podmínkách lze poranění míchy provést prakticky v jakékoli oblasti páteře, nejčastěji se však provádí buď v hrudní nebo krční oblasti. Z důvodu vyšší úmrtnosti zvířat a složitější pooperační péči se míšňí poranění častěji provádí v hrudní oblasti (Pearse *et al.*, 2005).

V současné době je k experimentálnímu vytváření traumatické míšňí léze využíváno několik modelů. Kontuzní model se snaží napodobit mechanismus poranění míchy způsobený prudkým úderem, který vede ke zlomení a dislokaci obratle (Kwon *et al.*, 2002). Využitím kompresního modelu dochází ke stlačení míchy, což

daleko lépe simuluje podmínky SCI u lidí než kontuzní model (Zhang *et al.*, 2013). Dalším modelem je transekce, kdy dochází k úplnému přerušení míchy v transversálním směru. Provedení transekce a pooperační péče o zvířata bývá ovšem velmi náročná, a proto se někdy využívá hemisekce, kdy dojde k přerušení jen určité části míchy, většinou pravé nebo levé poloviny (Shi *et al.*, 2014). Při excitotoxickém modelu se využívá faktu, že po poranění míchy dochází k prudkému zvýšení extracelulární koncentrace glutamátu. K vytvoření SCI se tedy využívá ligandu vázajícího se na příslušný glutamátový receptor, čímž zvyšuje prostupnost pro glutamát (Liu *et al.*, 1997a). Tělesná teplota potkanů během operace je udržována na 37 °C, aby nedocházelo k hypotermii (Vanicky *et al.*, 2001).

Aby se předešlo zánětům či stresu u zvířat, je třeba, aby byly po operaci podávány patřičné léky jako jsou antibiotika či analgetika. Je třeba také alespoň dvakrát denně potkanům manuálně vyprazdňovat močový měchýř, jelikož po přerušení míšních drah dochází k poruše ovládní močového měchýře.

Ke snížení stresu u potkanů je doporučeno chovat je v kleci po dvou, zvířata si však na sebe musí zvyknout ještě v adaptační době před operací, aby se předešlo možným vzájemným útokům způsobeným stresem z operace. Chov více jak dvou potkanů ve standardní kleci se nedoporučuje z důvodu snazšího přenosu infekcí (Tatlisumak & Fisher, 2006).

Důležitou součástí behaviorálního testování je i předtestování a aklimatizace zvířat. Hlavním důvodem pro předtestování je, aby zvířata byla během testování co nejméně ve stresu, zároveň je také velmi důležité zvířata seznámit s testovací procedurou a zároveň se i ujistit, že porozuměli úkolu. Z tohoto důvodu se strategie testování nesmí v průběhu měnit (Metz *et al.*, 2000).



## 4. Lokomotorické testy

Při behaviorálním testování zvířat po míšním poranění rozlišujeme pozemní lokomoci, horizontální lokomoci a lokomoci během plavání. Během lokomočních testů je důležitým momentem chvíle, kdy se zvíře začne pohybovat s podporou váhy zadních končetin (Timoszyk *et al.*, 2005).

### 4.1 BBB test

Název testu je odvozen od prvních písmen jeho tvůrců Basso, Beatie a Bresnahan a je to jeden z nejužívanějších testů pohybových funkcí u potkanů po míšním poranění. Jde o takzvaný „*open field test*“. Potkan je umístěn do otevřené arény, kde se volně pohybuje. Dva nezávislí pozorovatelé pozorují motorické dovednosti potkanů a udělují jim skóre pro každou končetinu zvlášť dle předem definovaných kategorií od 0 do 21. Tyto kategorie můžeme rozdělit do tří částí.

První část zahrnuje analýzu pohybu v jednotlivých kloubech zadních končetin až po takzvané zametání (*sweeping*) bez podpory váhy (skóre 0-7). Druhá část analyzuje provedení kroků s podporou váhy, plantární umístění tlapky, předozadní koordinaci končetin, postavení a vnitřní či vnější rotaci tlapek během zvedání končetiny (skóre 8-13). Poslední část analyzuje takzvaný *toe clearance* — výskyt zvuku vydaného palcem zadních tlapek během pohybu, zvedání ocasu během pohybu a stabilitu trupu (Basso *et al.*, 1995).

Hned po zveřejnění BBB škály (Basso *et al.*, 1995) bylo navrženo několik modifikací a vylepšení (Metz *et al.*, 2000; Popovich *et al.*, 1999; von Euler *et al.*, 1997). BBB podhodnocovací škála (*BBB sub-scoring scale*) zvyšuje senzitivitu BBB testu tím, že přiřazuje skóre každému behaviorálnímu atributu zvlášť a poté je hodnotí dohromady pomocí procesu, který se nazývá podhodnocování (*sub-scoring*) (Basso, 2004). Podhodnocovací škála byla zavedena kvůli předpokladu, že aplikace léčby ovlivní pouze některé aspekty lokomoce, ale nemusí nutně ovlivnit všechny. Například může ovlivnit *toe clearance* bez toho, aby ovlivnila předozadní koordinaci (Basso, 2004).

Tomuto testu bývá vytýkána určitá míra subjektivity, avšak zkušenosti vědeckých týmů po celém světě ukazují, že při hodnocení dvěma na sobě nezávislými vědci jsou výsledky porovnatelné (Metz *et al.*, 2000).

## 4.2 Kinematická analýza (*Kinematic Analysis*)

Během kinematické analýzy dochází k měření krokového cyklu, kdy jsou posuzovány jednotlivé složky pohybu dané končetiny.

Před začátkem testování je třeba zvířatům vyholit zadní končetiny a naznačit si orientační body a to v místech hřebenu kyčelního (*crista iliaca*), velkého chocholíku (*trochanter major*), kolenního kloubu, zevního kotníku (*malleolus lateralis*) a v místě pátého nártního kloubu.

Potkan je poté umístěn na chodící pás a vše je zaznamenáváno na kameru (Gillis & Biewener, 2001).

Rychlost pásu je v závislosti na věku a zdravotním stavu zvířat obvykle nastavena v rozmezí 50 až 400 mm/s. Pomocí značek na kloubech je vypočítán maximální rozsah pohybu v jednotlivých kloubech u daného zvířete. U potkanů s míšním poraněním je zpravidla nejpohyblivějším kloubem kotník (Basso, 2000).

Rozsah flexe a extenze u určitého kloubu je měřen v počáteční švihové fázi, uprostřed švihové fáze a ve chvíli, kdy se tlapka potkana dotkne podlahy. Flexe a extenze končetin je poté analyzována ze záznamu kamery obraz po obraze (Metz *et al.*, 2000).

Kinematická analýza umožňuje doplnění důležitých informací o průběhu chůze k dalším lokomotorickým testům jako je například BBB test (Metz *et al.*, 1998).

Nevýhodou této metody je její nepoužitelnost u zvířat bez podpory váhy končetin, v takovém případě nelze získat pomocí kinematické analýzy signifikantní data. V takovém případě má větší výpovědní hodnotu např. BBB test.

## 4.3 Plavecký test (*Swim Test*)

Zdraví potkani plavou s tělem paralelně k vodní hladině, hlavou, krkem a přibližně 30 % povrchu jejich zad nad hladinou a s ocasem přímo pod hladinou. Zadní končetiny používají k pohybu směrem dopředu a přední končetiny jsou pod hrudníkem a využívají je k řízení směru. Oproti tomu potkani po míšním poranění používají přední končetiny k pohybu směrem dopředu a zadní část těla mají většinou ponořenou pod hladinou (Smith *et al.*, 2006).

Hlavní výhodou tohoto testování potkanů po míšním poranění je podpora váhy těla, kterou zajišťují podmínky ve vodě a zároveň nutnost lokomoce, aby se nepoto-

pili pod hladinu.

Původní test byl prováděn tak, že byl potkan umístěn do bazénku o průměru 125 cm, Pohyb zadních končetin během plavání byl ohodnocen na stupnici od 0 do 3, kde skóre 3 znamenalo pohyb jako zdravý potkan (Gale *et al.*, 1985).

Od té doby přišly různé vědecké skupiny s různými modifikacemi z nichž jako nejdůležitější je Louisville swim scale (LSS), kterou vyvinuli vědci z David Magnuson 's laboratory v Kentucky (Smith *et al.*, 2006).

Škála obsahuje 18 bodů, tedy 0 (těžké poranění) až 17 (jako zdravý potkan). Zvířata se skóre 0-5 jsou označena za velmi špatné plavce, plavání jim dělá velké problémy, anebo nejsou vůbec schopna plavat. Potkani ohodnoceni skórem 6-11 jsou označeni za středně zdatné plavce, jsou schopni plavat, ale s určitými obtížemi. Zvířata hodnocena se skórem 12-17 jsou označena za dobré plavce, jsou schopna plavat bez větších obtíží nebo plavou jako zdravý potkan.

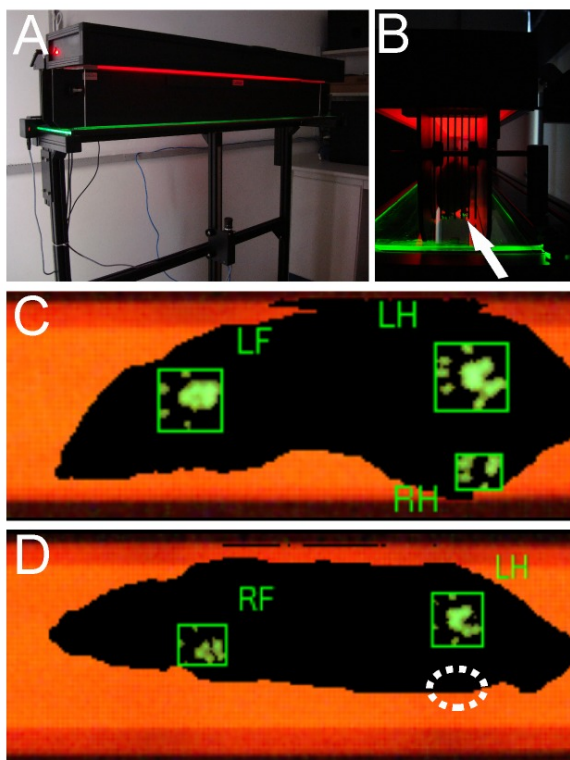
LSS byla generována a evaluována v souladu s BBB stupnicí. Škála je užitečná při hodnocení mírného, středního a středně těžkého poranění míchy v hrudní oblasti. V případě, že potkan používá k plavání pouze přední končetiny, je během pohybu nestabilní a osa těla se vychyluje, nelze ho hodnotit podle LSS (Smith *et al.*, 2006).

#### **4.4 CatWalk (*Automated Walkway*)**

Automatizovaný walkway test byl poprvé popsán Hamersem *et al.* (Hamers *et al.*, 2001). Potkan má přejít 100-120 cm dlouhou skleněnou lávku ohraničenou černými stěnami, které jsou od sebe vzdáleny 8 cm a stropem. V tunelu je tma a jediné světlo pochází z uzavřené fluorescenční žárovky a je přenášeno přes skleněný povrch lávky. Kontakt tlapy potkana s povrchem lávky způsobí, že se světlo prosvítí skrz a světelný otisk tlapy je pak monitorován kamerou. (Obrázek 3.)

Video se následně hodnotí pomocí speciálního programu. Analyzuje se koordinace pohybu, vzdálenost mezi zadními končetinami (podpora váhy), doba trvání švihové a stojné fáze a další parametry (Gensel *et al.*, 2006).

Výhodou tohoto testu je, že přináší objektivnější data než např. BBB test u rychle se pohybujících zvířat s vyšším skóre, kde je pro experimentátora velmi těžké určit skóre přesně.



Obrázek 3: A) Catwalk přístroj B) šipka ukazuje na potkana jdoucího v přístroji C) potkan, který je schopný ovládat všechny končetiny D) kroužkem je označené místo, kde by se měla dotýkat pravá zadní končetina podložky. Zdroj: Barbizan *et al.* (2013)

## 4.5 Analýza otisku stopy (*Footprint Analysis Test*)

Potkanům jsou nabarvena chodidla tlapek, přičemž pro přední a zadní končetiny je použita jiná barva. Poté jsou postaveni na 1 m dlouhou a 7 cm širokou dřevěnou kladinu pokrytou papírem.

Měří se vzdálenost mezi kroky, úhel tlapek (indikátor stability a rovnováhy) a je vypočítána schopnost podpory těla (Metz *et al.*, 2000).

K ohodnocení míry podpory váhy těla lze využít čtyř bodovou stupnici. Nulou jsou ohodnocena zvířata, která tahají zadní končetiny či nejsou viditelné žádné obtisky zadních končetin. 1 bod je započítán v případě, že jsou viditelné obtisky palce v minimálně třech obtiscích chodidla. V případě, že zvíře vykazuje více než dvojnásobně vyšší hodnotu vnitřní a vnější rotace chodidla, než tomu bylo při předtestování, je ohodnoceno 2 body. 3 body získává potkan, u kterého není znatelný obtisk palce, ale stále je viditelná rotace chodidla. 4 body získává zvíře, které nevykazuje známky vnitřní a vnější rotace (Metz *et al.*, 2000).

## 4.6 Thorakolumbální test (*Thoracolumbal Heigh Test*)

Test je založen na poznatku, že výška thorakolumbální kyfózy u potkanů závisí na schopnosti podpory váhy zadní poloviny těla. Před testováním je inkoustem označen nejvyšší bod thorakolumbální kyfózy a poté je potkan umístěn do průhledného koridoru. Pozice označeného bodu je během pohybu monitorována pomocí videokamery. Analýza se poté provádí pomocí specializovaného softwaru (van de Meent *et al.*, 1996).

## 4.7 Eshkol-Wachmannova notace

Eshkol-Wachmannova pohybová notace byla původně vytvořena pro záznam tanečních pohybů tak, aby umožnila choreografům zapsat pohyb na papír. Zobrazuje tělo jako soustavu končetin pospojovaných dohromady klouby. Tělo je vnímáno jak systém kloubových os a končetiny jsou brány jako část těla ležící mezi dvěma klouby, či jako část s jedním kloubem a druhým koncem volným (Whishaw & Pellis, 1990).

Pohyb je pečlivě zaznamenán pomocí videokamery a poté je obraz po obraze hodnocen. Každému segmentu končetiny je uděleno určité skóre.

Ačkoli Eshkol-Wachmannova notace není kvantitativní metodou, doplňuje cenná a přesná data k výsledkům z dalších testů (Whishaw & Pellis, 1990).

## 5. Motorické testy

Do této kapitoly jsou zařazeny testy, které vyhodnocují funkci kosterních svalů, které nejsou primárně zapojeny do lokomoce.

### 5.1 Nakloněná rovina (*Inclined Plane*)

V tomto testu je hodnocena schopnost zvířete udržet polohu na desce, která je postupně nakláněna. Potkan je na desku umístěn hlavou nahoru, dolů, doprava či doleva.

Úhel náklonu je postupně zvyšován směrem k vertikální rovině až do doby, kdy zvíře není schopno se na rovině dále udržet ve výchozí pozici. Nejvyšší úhel ve kterém je potkan schopný zůstat ve stabilní poloze po dobu 5 vteřin je zaznamenán. Chování potkana na nakloněné rovině koreluje s integritou rubrospinalního traktu a dalšími nepyramidovými drahami po SCI (Fehlings & Tator, 1995).

### 5.2 Cylindrový test (*Forelimb Asymmetry*)

U cylindrového testu se využívá přirozená vlastnost potkanů prozkoumávat nové vertikální povrchy za pomoci předních tlapek a hmatových vousků (vibrissae). Tento test je velmi citlivý na asymetrie způsobené poraněním centrálního nervového systému včetně SCI na úrovni krční míchy (Gharbawie *et al.*, 2004).

Potkan je umístěn do průhledného válce a poté je určován počet, kolikrát nezávisle na sobě potkan umístí pravou, levou či obě přední tlapky proti vertikální stěně cylindru. Celý pokus je nahráván na kameru a později analyzován. Skóre je poté počítáno procentuálně z celkového počtu zvláště pro pravou a zvláště pro levou tlapku.

Je důležité vyhnout se tomu, aby si potkan na nové prostředí zvyknul, čehož se docílí kratšími intervaly testování, které jsou vystřídány pobytem zpět v kleci.

Výhodou tohoto testu je jeho schopnost detekovat chronické senzomotorické deficity, které se pomocí jiných testů nedaří zjistit (Gensel *et al.*, 2006).

### 5.3 Test stoje na zadních (*Rearing Test*)

Stejně jako u cylindrového testu i zde se využívá průhledný válec, kam je potkan během testování umístěn. Potkani jsou testováni jednotlivě po dobu deseti minut a examinátor by neměl být obeznámen se stavem léčby. Celý pokus je pečlivě nahráván a ze záznamu je poté vyhodnocen počet okamžiků, kdy potkan stojí na zadních končetinách.

Tento test je velmi citlivým v měření využití zadních končetin během postoje, kdy potkan simultánně zvedá obě přední tlapky a poté volně stojí v prostoru, či se předními končetinami opírá o hladký povrch válce, při čemž balancuje a většina váhy je tak na zadních končetinách. Hladký povrch testovacího válce zároveň neumožňuje kompenzovat slabost zadních končetin tím, že by docházelo k přenášení váhy na přední končetiny opřené o stěny válce (Arvanian *et al.*, 2006).

U potkanů se středním či vážným poraněním se vzácně vyskytuje stoj na zadních tlapkách s plnou podporou váhy, daleko častěji prozkoumávají okolí v příkrčené poloze předními končetinami. Toto chování se nazývá pokusem o stoj na zadních a dá se hodnotit tak, že se analyzuje počet těchto pokusů během tříminutového testování a pak se každý pokus o stoj hodnotí separátně (Yoshihara *et al.*, 2006).

### 5.4 Uchopovací test (*Limb Hanging Test*)

Tento test využívá přirozené vlastnosti tlapky uchopit předmět. Primárně byl vyvinut pro testování svalů předních končetin u zvířat po SCI v cervikální oblasti, ale lze ho použít i pro testování zadních končetin.

Ke stimulaci dochází umístěním 12 cm dlouhé a 1,8 mm široké tyče do dlaně přední končetiny a zjišťuje se, zda potkan tyč uchopil či ne. Za předpokladu, že tyč uchopil se měří čas, za který ji upustí. Lze také změřit sílu svalů, tu zjistíme tak, že se změří čas, za který potkan drží zvednutou tyč. Aby nebyl výsledek testu zkreslený, je třeba zabránit tomu, aby se potkan dotýkal tělem, zadními končetinami či ocasem části testovacího zařízení na bocích. Testování je opakováno a poté je vypočítána průměrná hodnota.

U vážně poraněných zvířat je zpravidla výstupem z testu pouze ano, uchopil tyč či ne, neuchopil tyč. Proto se tento test doporučuje kombinovat ještě s dalšími behaviorálními testy (Pearse *et al.*, 2005).

## 5.5 Test síly končetin (*Limb Grip Strength Test*)

Tento test má za úkol posoudit maximální sílu, kterou testované zvíře vloží do uchopení speciálně sestrojeného zařízení, které zahrnuje speciální přístroj nazývaný siloměr úchopu (*grip strength meter*), který je zkonstruovaný na základě Meyerovy metody (Meyer *et al.*, 1979). Test lze použít při měření síly jak u předních, tak i u zadních končetin.

Zvíře je jemně přidržováno tak, aby se měřenou končetinou uchopilo přístroje, ke kterému je připojen siloměr. (Obrázek 4).



Obrázek 4: Potkan držící se předními končetinami *grip strength meteru*.

Zdroj: Obrázek lze nalézt v galerii Bioseb (2017)

Zvíře je poté odtahováno od uchopené tyče, dokud se jí nepustí. Ve chvíli těsně před puštěním dosahuje největší síly úchopu, ta je vyjádřena v Newtonech a zobrazena na obrazovce přístroje. Obvykle se měření provádí třikrát po sobě a výsledek se poté zprůměruje (Pearse *et al.*, 2005).

Nevýhodou tohoto testu je stejně jako u uchopovacího testu to, že ho nelze provádět u vážně poraněných zvířat. Další nevýhodou může být i nutnost speciálního zařízení. Na druhou stranu, tento test poskytuje cenná a unikátní data.

## 5.6 Test získání jídla (*Food Pellet Reaching Test*)

Tento test zkoumá schopnost předních končetin dosáhnout na jídlo, uchopit ho a získat. Potkan je zavřen do plexisklového boxu a má za úkol získat 190 mg peletu skrz 1-2 cm širokou mezeru mezi dvěma plexiskly. Aby se zajistilo, že potkan vždy



po úspěšném získání pelety opustí oblast u otvoru, je vždy poté, co získá jídlo do zadní části plexisklového boxu vhozena jedna 45 mg peleta. Celé testování je pečlivě zaznamenáváno na kameru a poté hodnoceno. (Obrázek 5.)

Výsledek je vypočítán tak, že se počet okamžiků, kdy potkan úspěšně uchopí a získá peletu, vydělí počtem pokusů o její získání. K hodnocení se používá 10 bodová škála (Whishaw, 2000), kde se hodnotí dosáhnutí, uchopení a získání pelet (Whishaw *et al.*, 1993).

Při testování po SCI je tento test využitelný pouze pro poranění v krční oblasti. Je také velmi důležité předtestování.



Obrázek 5: A) Potkan se zaměřuje na peletu B) snaží se ni dosáhnout C) uchopuje ji D) získává ji. Zdroj: Jones Lab - Behavioral Neuroscience (2017)

## 6. Senzoricko-motorické testy

Testují správnou funkčnost sensorického a motorického systému a jejich správné propojení.

### 6.1 Chůze po kladině (*Narrow Beam Test, Beam Walking Test*)

Tento test posuzuje jemnou motorickou koordinaci pomocí chůze po relativně úzké kladině.

V testování popsaném Hicksem a D'Amatem (Hicks & D'Amato, 1975) jsou použity tři různé kladiny. Obdélníková kladina o šířce 1,2 cm či o šířce 2,3 cm a kulatá kladina o průměru 2,5 cm. Všechny tři kladiny jsou umístěny 30 cm nad zem a jsou 1 m dlouhé. Úkolem potkanů je přejít na druhou stranu. K tomu, aby dostatečně pochopili svůj úkol, se doporučuje zvířata ještě před provedením operace předtestovat.

Potkanům je podle jejich výkonu přiděleno následující skóre: 0 bodů pokud nejsou schopni chodit po kladině a neustále padají, 0,5 bodu pokud jsou schopni dojít do půlky, 1 bod když přejdou celou kladinu, 1,5 bodu pokud při chůzi alespoň částečně využívají zadní končetiny a 2 body získávají potkani, kteří se po kladině pohybují s podporou váhy. Každý potkan je testován na všech třech kladinách a výsledné skóre je pak součtem bodů, které získal na jednotlivých kladinách. Nejméně tedy může získat 0 bodů (0+0+0) a nejvíce 6 bodů (2+2+2) (Metz *et al.*, 2000).

Existují i různé modifikace tohoto testu, například von Euler (von Euler *et al.*, 1997) využil sedm různě širokých kladin a potkany poté testoval postupně tak, že začínal vždy na té nejširší a končil na té nejužší. Skóre se zapisovalo podle toho, jaká byla nejužší kladina, kterou byl určitý potkan schopný přejít.

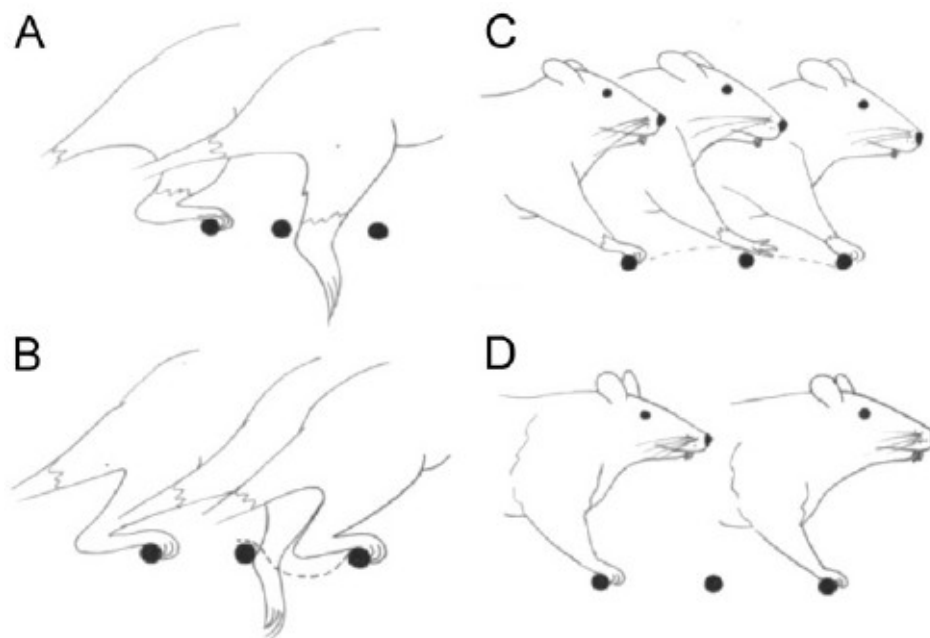
Chůze po kladině velmi přesně monitoruje jemné deficity v rovnováze a v umístění tlapek při chůzi. Další výhodou je, že obtížnost tohoto testu může být upravena použitím kladin o různém tvaru a šířce. Schopnost potkanů přejít po kladině závisí jak na funkci páteřní míchy, tak na správné funkci kortikospinální, rubrospinnální a vestibulospinnální dráhy (Metz *et al.*, 2000).

## 6.2 Test smekání (*Foot Slip Test, Horizontal Ladder Walking Test*)

Během tohoto testu potkani šplhají po žebříku s příčkami umístěnými v různé vzdálenosti od sebe. Žebřík se skládá z bočních lišt a z kovových příček s plošinkou na každé straně. Rozdílná vzdálenost mezi příčkami způsobí, že potkan není schopen předvídat vzorec, podle kterého jsou umístěny. Vzor se liší i v tom, zda jde zvíře z pravé či levé strany. Během tohoto testu je vyžadováno, aby potkan umisťoval tlapky přesně na kovové příčky (Metz & Whishaw, 2002). (Obrázek 6)

Celý pokus je pečlivě zaznamenáván na kameru a poté analyzován.

Frekvence sklouznutí (chybných kroků) je počítána jako rozdíl celkového počtu kroků k počtu uklouznutí. Test může být hodnocen i kvalitativně za pomoci chybového skórovacího systému (*fault scoring system*) zavedeného Metzem a Whishawem (Metz & Whishaw, 2002), kde se hodnotí umisťování předních a zadních končetin během chůze po žebříku. Hodnocení se pohybuje na škále od 0 po 6, kdy skóre nula je přiděleno za chybný krok, kdy potkan uklouzne poté, co minul příčku (*total miss*) a skóre 6 za správné umístění tlapky na příčku (*correct placement*).



Obrázek 6: Čtyři pohybové kategorie při *horizontal ladder* testu

A) vynechání B) sklouznutí C) dotknutí D) krok

Zdroj: Šedý *et al.* (2008)

### 6.3 Test chůze po mřížce (*Grid Walking Test*)

Test chůze po mřížce je velmi citlivá metoda sloužící k určení senzorio-motorické koordinace předních a zadních končetin. Úspěšné přejití mřížky je podmíněno správnou koordinací předních a zadních končetin, která je zprostředkována ventrolaterální a retikulospinální dráhou (tyto dráhy iniciují krokový rytmus) a vědomou kontrolou pohybu, která je přednostně způsobena kortikospinální a rubrospinalní dráhou (Metz *et al.*, 2000).

Potkani jsou umístěni na 1-1,2 m dlouhou mřížku, kterou mají za úkol přejít. Mezery mřížky jsou různého průměru (0,5-5 cm) a jsou nepravidelně umístěny. Určuje se počet chybného umístění končetiny, do kterého se počítá jak uklouznutí, tak chybné umístění tlapky. Aby potkan přešel celou mřížku je třeba, aby umisťoval končetiny přesně. Počet chyb, kterých se potkan dopustí během přechodu mřížky je klasifikován jako neparametrické skóre při přechodu mřížky (*non-parametric grid walking score*). Za 0-1 chybu je potkan ohodnocen 3 body, za 2-5 chyb 2 body, za 6-9 chyb 1 bodem a za 10-20 chyb 0 body. Potkan, který není schopný pohybu zadních končetin je ohodnocen, jako kdyby se dopustil 20 chyb. Každý potkan je testován třikrát (Behrmann *et al.*, 1992).

Komplexní testy jako je právě test chůze po mřížce dokáží odhalit deficity, které při běžné lokomoci nejsou viditelné. Aby se testování ještě zefektivnilo, je třeba využívat více mřížek s rozdílným rozložením mezer. Avšak pokud je zvíře stresováno neustálou proměnlivostí testu, může to negativně ovlivnit výsledky. Díky využití čtyřbodové škály a respektování individuality každého zvířete je však možné tyto rušivé elementy vyfiltrovat (Metz *et al.*, 2000).

Největším benefitem tohoto testu je možnost se soustředit na jednotlivé funkce zadních končetin u zvířat po SCI v hrudní oblasti. U potkanů toto poranění často nezpůsobuje výraznější problémy v pozemní lokomoci, u lidí je však dostatečné k absolutní ztrátě schopnosti chůze (Norrie *et al.*, 2005). Nicméně tento test je vhodný pouze pro zvířata po lehkém či mírném poranění míchy, kdy jsou schopna podpory váhy zadních končetin a určitého stupně koordinované chůze (Gris *et al.*, 2004).

### 6.4 Chůze po laně (*Rope Walking Test*)

Zvíře má za úkol přelézt 125 cm dlouhé a 4 cm v průměru široké lano horizontálně natažené mezi dvě platformy. Test se opakuje celkem třikrát a při každém běhu

je zaznamenám počet uklouznutí a spadnutí. K úspěšnému přezení lana je třeba, aby potkan precizně umisťoval tlapy na lano, měl podporu váhy zadních končetin a rovnováhu. Před tímto testem je nutné provést testování, což se může jevit i jako nevýhoda, jelikož zabere až pět týdnů (Kim *et al.*, 2001).

## 7. Senzorické testy

Pod senzorické testy patří metody behaviorálního testování, které jsou schopné detekovat poruchy senzorického systému. Zkoumají hypoaktivitu (ztráta či snížená senzorická funkce) či hyperaktivitu (hypersenzitivita) senzorických funkcí v reakci na teplo, chlad, bolest či dotek.

### 7.1 Test citlivosti na teplo (*Hot Plate-based Test*)

Během tohoto testu se měří latence odpovědi končetin na tepelný stimul. Test je používán hned v několika modifikacích. Například komerčně dostupný standardizovaný Plantar Heater Test (Ugo Basil, Comercio, Italy) (obrázek 7), kde jsou testována vždy tři zvířata naráz v oddělených plastových klecích (Hargreaves *et al.*, 1988). Je důležité vždy testovat stejnou část končetin během celého testu, například chodidlo zadní končetiny. Generátor infračerveného světla je obvykle nastaven tak, aby se po 35 vteřinách vypnul a jeho intenzita je nastavená mezi 50 a 60 jednotkami. Toto nastavení umožňuje předcházet poranění (Urdzikova *et al.*, 2006).



Obrázek 7: Přístroj používaný na *Plantar Heater Test*, kdy se měří latence odezvy zadní končetiny na zdroj sálavého tepla. Zdroj: Šedý *et al.* (2008)

Dalším příkladem testu citlivosti na teplo je technika používaná Galem a jeho kolegy (Gale *et al.*, 1985), kteří využívali horkého plátu předehřátého na 50 °C, kam umístili potkana na dobu 60 s a měřili, kolik času uběhne do doby, než si začne olizovat obě zadní tlapy.

Další možnou modifikací testu je tail-flick test, kdy se potkanům zahřívá báze ocasu (Merkler *et al.*, 2001).

## 7.2 Test citlivosti na chlad (*Cold Sensitivity-based Test*)

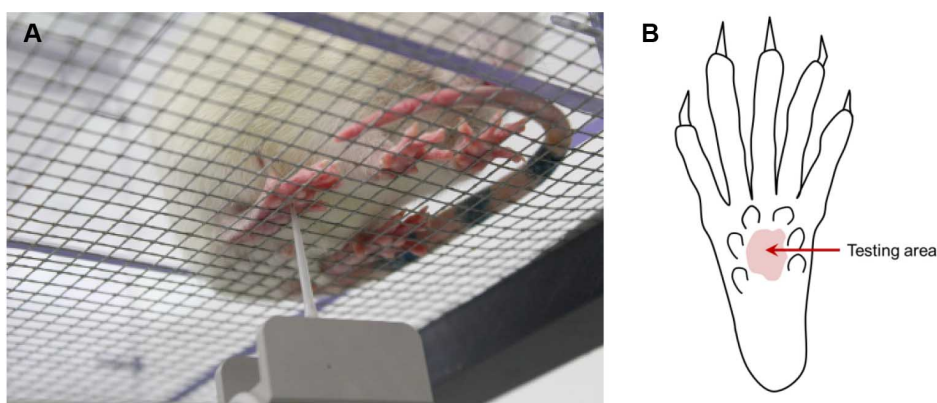
Během tohoto testu se hodnotí nocicepční citlivost na chlad. Potkanům je na předem vyholená místa aplikován chlorethan ve spreji a pozoruje se odpověď, která se pak hodnotí na stupnici od 0 (žádná odpověď) až po 3 (reaguje na bolest vydáváním zvuků) (Vaquero *et al.*, 2006).

## 7.3 Von Freyova filamenta (*Von Frey Filaments*)

Pomocí tohoto testu se hodnotí citlivost na mechanický podnět. Hodnotí se stupeň mechanické alodynie, což je nadměrná citlivost na podnět, který u zdravých jedinců bolestivou reakci nezpůsobuje (Gris *et al.*, 2004).

Potkan je umístěn do boxu z plexiskla, kde je na dně umístěna jemná mřížka, skrz kterou jsou na plantární povrch předních či zadních končetin postupně aplikována filamenta (obrázek 8) dokud potkan na tento podnět nereaguje (Liebscher *et al.*, 2005). Jako pozitivní odezva se hodnotí rychlé ucuknutí tlapkou, které může být doprovázeno olizováním postiženého místa, utíkáním, abnormálně agresivním chováním, vokalizací nebo chvěním (Gris *et al.*, 2004).

Po každém kole testování musí následovat pauza a poté je potkan testován znovu pomocí toho samého filamenta. Vzhledem k tomu, že změna absolutního počtu ucuknutí tlapkou může znamenat spíše než alodynii zesílení spinálního reflexu, při hodnocení se v potaz bere pouze to, pokud ucuknutí bylo doprovázeno dalším chováním např. okusováním filamentu.



Obrázek 8: Von Freyova filamenta Zdroj: Ferrier *et al.* (2016)

## 8. Testy založené na reflexní odpovědi

### 8.1 Test odezvy (*Contact Placing Response Test*)

Tento test je založen na poznatku, že položení končetiny na neznámý povrch může být vyvoláno lehkým dotekem na dorzální stranu chodidla, na který zvíře reaguje tím, že zvedne nohu a umístí ji na překážku (Metz *et al.*, 2000).

Rozvoj pokládacího reflexu dočasně koreluje s postnatálním růstem kortikospinálních axonů do šedé hmoty páteřní míchy. Tento reflex s věkem vymizí, pokud se vyskytne u staršího jedince, je to signál o poškození nervové soustavy. Reflex je prvně pozorován u předních končetin (mezi 4 až 7 dnem) a poté se rozvíjí u zadních končetin (mezi 9 až 13 dnem). Jako poslední je pozorována odezva na taktilní kontakt a na lehké propioceptivní stimuly (Donatelle, 1977).

Během testu je zvíře uchopeno tak, že jeho zadní končetiny volně visí a dorzální povrch obou chodidel je lehce podrážděn hranou papíru. Test se opakuje desetkrát a počet odpovědí na podnět je zaznamenán. Každé zvíře je poté hodnoceno individuálně tak, že data získaná z testování po operaci jsou porovnávána s daty, které byly získány před operací. Předoperační výsledky jsou brány jako 100 % a od toho se odvíjí ohodnocení jednotlivého potkana (Metz *et al.*, 2000).

Bohužel reakce u tohoto testu jsou velmi variabilní jak u operovaných, tak i u zdravých potkanů a proto pokud není tento test kombinován s dalším, výsledky mohou být značně zkreslené (Metz *et al.*, 2000).

### 8.2 Reflex roztahování prstů (*Toe Spread Reflex*)

Roztažení prstů je způsobeno kontrakcí meziprstcových svalů (*musculi interossei*) a odtahovačem palce nohy (*musculus abductor hallucis*), inervovanými peroneálním nervem, který je jednou z větví sedacího nervu (*nervus ischiadicus*). Z tohoto důvodu je tento reflex využíván i při posuzování regenerace sedacího nervu po jeho experimentálním poškození (Renno *et al.*, 2006).

Reflex je studován tím, že je potkan uchopen za ocas a zvednut tak, aby mu končetiny volně visely. Pozoruje se, zda roztahuje prsty na tlapkách a hodnotí se síla odpovědi na reflex – buď není odpověď žádná či může být normální anebo abnormální. Za abnormální odpověď se považuje hyperextenze, která může být



doprovázena třesem tlapek či prstů anebo za abnormální odpověď může být považován i samotný třes v tlapkách (von Euler *et al.*, 1997).

Několik dní po operaci je pozorována nulová odpověď, která může být následována abnormální odpovědí. Přehnaná odpověď zadních končetin je reakcí na sníženou kontrolu lokomotorického systému řízeného motoneurony. Postupně dochází k rozvoji reflexní odpovědi, ze začátku dochází k nepatrnému roztahování prstů a postupně se rozvíjí normální odpověď (Seki *et al.*, 2002).

### 8.3 Vzpřimovací reflex (*Righting Reflex*)

Vzpřimovací reflexy (statické reflexy) tvoří skupinu reflexů, které zajišťují koordinaci statických reakcí a usměrňování těžiště. U zvířat po experimentálním SCI je vzpřimovací reflex testován tak, že experimentátor uchopí potkana, otočí ho na záda, zvedne ho do výšky cca 7 cm nad polstrovaný stůl a upustí ho. Poté se měří, kolik sekund potkanovi zabere dostat se do běžné ventrální polohy. Odpověď na reflex je buď chybějící, normální anebo abnormální a je ohodnocena skórem od 0 (žádný reflex) až po 3 (sám se vzpřímí ihned po upuštění) (von Euler *et al.*, 1997).

## 9. Elektrofyziologie a funkční zobrazování magnetickou rezonancí

### 9.1 Záznam pohybu pomocí kontaktní elektrody

Tento test v sobě kloubí výhody horizontální dráhy a elektrofyziologického monitorování. Nejprve jsou zvířata předtestována tak, že jsou naučena přejít horizontálně umístěný žebřík a poté jsou jim na palmární či plantární povrch tlapek pomocí gumových pásků umístěny malé kontaktní elektrody tvořené tenkými měděnými drátky. Po nějakém čase si potkani na elektrody připojené na tlapkách zvyknou a nemají potřebu si je sundávat. Povrch horizontální dráhy je pokrytý vodivým materiálem připojeným ke zdroji nízkého napětí, čímž je umožněn záznam pohybu (Gorska *et al.*, 1998).

### 9.2 Evokované potenciály — transkraniálně

Evokované potenciály jsou vyvolány úmyslným podnětem z okolí a jsou příčinou změny elektrické aktivity mozku i jiných částí nervové soustavy.

Zvířatům je podána anestezie, aby se předešlo stresu a bolesti a evokované potenciály jsou vyvolány transkraniálně elektrickou stimulací motorické oblasti neokortexu za pomoci perkutánně umístěné ocelové elektrody. Odpověď je zaznamenána z periferního kosterního svalu, obvykle z lýtkového za pomoci jehlové elektrody. Naopak mozková aktivita je zaznamenána v odpovědi na senzoryckou stimulaci vyvolanou somato-senzorycky evokovaným potenciálem (Marsala *et al.*, 2004).

Výhodou elektrofyziologických technik je přesné měření svalové aktivity, latence reflexu a relativní síla reflexní odpovědi. Naopak nevýhodou těchto metod je implantace elektrod (Muir & Webb, 2000).

### **9.3 Motoricky evokované potenciály — intrakraniálně-intraspinálně**

Během tohoto testu jsou zvířata pod anestezií a intubovaná. Do těla jim je injekčně vpraven atropin, aby se redukovala tracheální sekrece a pancuronium bromid (Pavulon) k navození svalové relaxace. Potkani jsou poté umístěni do stereotaktického rámu, je jim chirurgicky otevřena lebka a motorické centrum neokortexu je stimulováno pomocí elektrody. Impulz je poté zaznamenán pomocí epidurální elektrody umístěné v bederní části páteře. Motoricky evokované potenciály jsou poté hodnoceny pomocí specializovaného softwaru (Lee *et al.*, 2005).

Velkou nevýhodou je, že je to velmi invazivní metoda a je k ní potřeba speciální vybavení. Dalším problémem je, že test nemůže být prováděn na denní či týdenní bázi.

### **9.4 Funkční zobrazování magnetickou rezonancí (fMRI)**

Funkční zobrazování magnetickou rezonancí je velmi precizní metoda vyžadující speciální MR-spektrometr. Zvířata jsou pro tento test pod anestezií a mechanicky ventilována. Svaly jsou relaxovány pomocí Pavulonu a potkanům je během celého úkonu kontrolována teplota. Zvířatům jsou do předních a zadních končetin implantovány bipolární stimulační elektrody a svaly končetin jsou stimulovány. Po stimulaci jsou snímány signály ze somatosenzorické oblasti kortexu a ze subkortikální oblasti a vše je nahráváno. Metoda fMRI umožňuje rozlišení mezi rekonvalescencí senzorických a motorických funkcí (Hofstetter *et al.*, 2003).

Test		objektivita	Předtestování	Míra poškození	Výhody	Nevýhody
lokomotorické testy	BBB	sub.	ne	N, S, V	jednoduchý na provedení a levný	subjektivní
	kinematická analýza	ob.	ano	N, S	detailní test	vyžaduje speciální vybavení
	plavecký test	sub.	ano	N, S	testuje spontánní lokomoci	subjektivní
	CatWalk	ob.	ano	N, S	precizní výsledky	vyžaduje speciální vybavení
	analýza otisku	ob.	ano	N, S		výsledky testu závisí na motivaci zvířat
	thorakolumbální test	ob.	ne	S	testuje pouze jednu charakteristiku	vyžaduje speciální vybavení
	Eskhol-Wachmannona notace	ob.	ne	N, S	detailní test	vyžaduje zkušeného pracovníka
motorické testy	nakloněná rovina	ob.	ne	N, S, V	jednoduchý na provedení a levný	není standardizovaný
	cylindrový test	ob.	ano	N, S	citlivý ku chronickým deficitům	nevhodný pro závažné SCI
	test stoje na zadních	sub.	ano	N, S	umožňuje určit preferovanou končetinu	
	uchopovací test	ob.	ne	N, S	výsledkem je schopnost zvířat produkovat trvalé napětí ve svalovině končetin	
	test síly končetin	ob.	ne	N, S	precizní test	vyžaduje speciální vybavení
	test získání jídla	ob.	ano	N	testuje motorické funkce	je třeba, aby zvířata hladověla před testem
	senzoricko-motorické testy	chůze po kladině	ob.	ano	N	odhaluje lehké změny ve výsledcích
test smekání		ob.	ano	N, S	falešně pozitivní či negativní výsledky	
test chůze po mřížce		ob.	ano	N, S	vyžaduje předtestování	
chůze po laně		ob.	ano	N	jednoduchý na provedení a levný	
senzorické testy	test citlivosti na teplo	ob.	ne	N, S, V	jednoduchý na provedení	riziko poranění, falešně pozitivní výsledky
	test citlivosti na chlad	sub.	ne	N, S, V		nízká senzitivita
	Von Freyova filamenta	ob.	ne	N, S, V		chybovost
testy založené na reflexní odpovědi	test odezvy	sub.	ne	N, S, V	jednoduchý na provedení a levný	falešně pozitivní výsledky
	reflex roztahování prstů	sub.	ne	N, S, V		nízká senzitivita
	vzpřimovací reflex	sub.	ne	N, S		
evokované potenciály		ob.	ne	N, S, V	precizní výsledky	vyžaduje speciální vybavení
fMRI		ob.	ne	N, S, V		vysoká cena

Tabulka 1: Shrnutí zmíněných behaviorálních testů, jejich výhod a nevýhod.

sub. — subjektivní ob. — objektivní

N/S/V — nízká/střední/vysoká míra poškození

## 10. Závěr

Výzkum míšního poranění je v současné době velmi intenzivní, navzdory tomu zatím neexistuje léčba, která by dokázala pacienty po SCI úspěšně léčit. Avšak existuje již několik terapeutických postupů, u kterých lze pozorovat výrazné zlepšení. Jednou z možností, jak ověřit, zda experimentální léčba funguje je behaviorální testování.

Behaviorální testy se dělí do několika skupin, které se liší podle toho, na co jsou zaměřené. Existují tedy lokomotorické testy, které testují lokomotorickou aktivitu, kdy je největším průlomem v léčbě okamžik, když se zvíře začne pohybovat s podporou váhy. Většina lokomotorických testů je vhodná pro zvířata s lehkým až středním poškozením, pouze BBB test lze použít i pro zvířata s těžkým SCI. Předtestování zvířat je třeba provést hlavně u kinematické analýzy, plaveckého testu, CatWalku a analýzy otisku stopy (*foot print analysis*), což zvyšuje časovou náročnost těchto testů. Další otázkou je i míra objektivity, která je diskutována hlavně u BBB testu a u plaveckého testu.

Další skupinou testů jsou motorické testy, které jsou zaměřeny na funkci kosterních svalů, jež nejsou primárně zapojeny do lokomoce. Nevýhodou těchto testů je, že až na pár případů nejsou vhodné pro zvířata s vážným poraněním, ovšem je zde vysoká míra objektivity. Prakticky u všech testů je potřeba potkany předtestovat, což může být časově náročné. Až na test síly končetin není třeba žádné speciální vybavení, testy jsou tedy relativně levné a proveditelné prakticky v každé běžně vybavené laboratoři.

Senzoricko-motorické testy testují správnou funkčnost sensorických a motorických drah a jejich správné propojení. U těchto testů je třeba provést předtestování, zároveň pouze test smekání a test chůze pro mřížce je vhodný pro zvířata po lehkém až středním poranění. Ostatní testy jsou vhodné pouze pro zvířata s lehkým SCI.

Senzorické testy pomáhají detekovat poruchy sensorického aparátu, jejich velkou výhodou oproti ostatním testům je, že není třeba předtestování a zároveň je zde vysoká míra objektivity. Nevýhodou naopak je možnost poranění zvířat, hlavně u testu citlivosti na teplo (*hot plate-based test*), u kterého hrozí i falešně pozitivní výsledky, kdy není jisté, zda zvíře reaguje na tepelnou stimulaci, či jeho reakce je vyvolána na základě poškození kůže. U těchto testů je také nižší míra senzitivity, či hrozí možnost chybných výsledků.

U testů založených na reflexní odpovědi je jejich velikou výhodou to, že zde není

třeba žádné speciální vybavení a testy jsou jednoduché. Naopak nevýhodou je nízká senzitivita a možnost výskytu falešně pozitivního výsledku u testu odezvy (*contact response placing testu*).

U Elektrofyziologických testů a fMRI dochází k elektrické stimulaci svalů či motorických částí neokortexu. Výhodou těchto testů je vysoká míra objektivity a zároveň zvířata nejsou předtestována. Ovšem jako velká nevýhoda se jeví nutnost chirurgického zákroku a potřeba drahého speciálního vybavení.

Vzhledem k tomu, že každý test je zaměřen na určitou specifickou oblast, je třeba během experimentu správně skloubit více testů dohromady, aby data byla objektivní a měla určitou výpovědní hodnotu. Všeobecně platí, že čím obecnější test je, tím širší je možnost jeho použití, čímž se ovšem snižuje jeho přesnost. Kromě toho, čím větší je použitelnost testu, tím méně je tato metoda citlivá. Pro úspěch studie je tedy rozhodující správný výběr testovacích metod.

# 11. Seznam použité literatury

- Arvanian, V. L., Manuzon, H., Davenport, M., Bushell, G., Mendell, L. M., & Robinson, J. K. (2006). Combined treatment with neurotrophin-3 and LSD facilitates behavioral recovery from double-hemisection spinal injury in neonatal rats. *J. Neurotrauma*, 23(1), 66–74.
- Barbizan, R., Castro, M. V., Rodrigues, A. C., Barraviera, B., Ferreira, R. S., & Oliveira, A. L. (2013). Motor recovery and synaptic preservation after ventral root avulsion and repair with a fibrin sealant derived from snake venom. *PLoS ONE*, 8(5), e63260.
- Basso, D. M. (2000). Neuroanatomical substrates of functional recovery after experimental spinal cord injury: implications of basic science research for human spinal cord injury. *Phys Ther*, 80(8), 808–817.
- Basso, D. M. (2004). Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J. Neurotrauma*, 21(4), 395–404.
- Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J. Neurotrauma*, 12(1), 1–21.
- Beattie, M. S., Bresnahan, J. C., Komon, J., Tovar, C. A., Van Meter, M., Anderson, D. K., Faden, A. I., Hsu, C. Y., Noble, L. J., Salzman, S., & Young, W. (1997). Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp. Neurol.*, 148(2), 453–463.
- Beaumont, E., Guevara, E., Dubeau, S., Lesage, F., Nagai, M., & Popovic, M. (2014). Functional electrical stimulation post-spinal cord injury improves locomotion and increases afferent input into the central nervous system in rats. *J Spinal Cord Med*, 37(1), 93–100.
- Becker, D., Sadowsky, C. L., & McDonald, J. W. (2003). Restoring function after spinal cord injury. *Neurologist*, 9(1), 1–15.
- Behrmann, D. L., Bresnahan, J. C., Beattie, M. S., & Shah, B. R. (1992). Spinal cord injury produced by consistent mechanical displacement of the cord in rats: behavioral and histologic analysis. *J. Neurotrauma*, 9(3), 197–217.
- Bioseb (2017). Bioseb: Grip strength test. [http://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item\\_id=48.php](http://www.bioseb.com/bioseb/anglais/default/item_id=48.php). Přístupováno 12.5.2017.

- Carlson, S. L., Parrish, M. E., Springer, J. E., Doty, K., & Dossett, L. (1998). Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.*, 151(1), 77–88.
- Casha, S., Yu, W. R., & Fehlings, M. G. (2001). Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, 103(1), 203–218.
- Centenaro, L. A., da Cunha Jaeger, M., Ilha, J., de Souza, M. A., Balbinot, L. F., do Nascimento, P. S., Marcuzzo, S., & Achaval, M. (2013). Implications of olfactory lamina propria transplantation on hyperreflexia and myelinated fiber regeneration in rats with complete spinal cord transection. *Neurochem. Res.*, 38(2), 371–381.
- Donatelle, J. M. (1977). Growth of the corticospinal tract and the development of placing reactions in the postnatal rat. *J. Comp. Neurol.*, 175(2), 207–231.
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., & Dumont, A. S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol*, 24(5), 254–264.
- Fehlings, M. G. & Tator, C. H. (1995). The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 132(2), 220–228.
- Ferrier, J., Marchand, F., & Balayssac, D. (2016). Assessment of Mechanical Allodynia in Rats Using the Electronic Von Frey Test. *Bio-protocol*, 6(18), e1933.
- Fitch, M. T., Doller, C., Combs, C. K., Landreth, G. E., & Silver, J. (1999). Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J. Neurosci.*, 19(19), 8182–8198.
- Gale, K., Kerasidis, H., & Wrathall, J. R. (1985). Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp. Neurol.*, 88(1), 123–134.
- Gensel, J. C., Tovar, C. A., Hamers, F. P., Deibert, R. J., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (2006). Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *J. Neurotrauma*, 23(1), 36–54.



- Gharbawie, O. A., Whishaw, P. A., & Whishaw, I. Q. (2004). The topography of three-dimensional exploration: a new quantification of vertical and horizontal exploration, postural support, and exploratory bouts in the cylinder test. *Behav. Brain Res.*, 151(1-2), 125–135.
- Gillis, G. B. & Biewener, A. A. (2001). Hindlimb muscle function in relation to speed and gait: in vivo patterns of strain and activation in a hip and knee extensor of the rat (*Rattus norvegicus*). *J. Exp. Biol.*, 204(Pt 15), 2717–2731.
- Gorska, T., Majczyński, H., & Zmysłowski, W. (1998). Overground locomotion in intact rats: contact electrode recording. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 58(3), 227–237.
- Gris, D., Marsh, D. R., Oatway, M. A., Chen, Y., Hamilton, E. F., Dekaban, G. A., & Weaver, L. C. (2004). Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function. *J. Neurosci.*, 24(16), 4043–4051.
- Hamers, F. P., Lankhorst, A. J., van Laar, T. J., Veldhuis, W. B., & Gispen, W. H. (2001). Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. *J. Neurotrauma*, 18(2), 187–201.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32(1), 77–88.
- Hejčl, A., Jendelová, P., Sameš, M., & Syková, E. (2015). Experimental treatment of spinal cord injuries. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 78/111(4), 377–392.
- Hicks, S. P. & D'Amato, C. J. (1975). Motor-sensory cortex-corticospinal system and developing locomotion and placing in rats. *Am. J. Anat.*, 143(1), 1–42.
- Hofstetter, C. P., Schweinhardt, P., Klason, T., Olson, L., & Spenger, C. (2003). Numb rats walk - a behavioural and fMRI comparison of mild and moderate spinal cord injury. *Eur. J. Neurosci.*, 18(11), 3061–3068.
- Jones Lab - Behavioral Neuroscience (2017). Jones Lab - Behavioral Neuroscience. <https://labs.la.utexas.edu/jones/research-summary/>. Přístupováno 12.5.2017.

- Kim, D., Schallert, T., Liu, Y., Browarak, T., Nayeri, N., Tessler, A., Fischer, & Murray, M. (2001). Transplantation of genetically modified fibroblasts expressing BDNF in adult rats with a subtotal hemisection improves specific motor and sensory functions. *Neurorehabil Neural Repair*, 15(2), 141–150.
- Kwon, B. K., Oxland, T. R., & Tetzlaff, W. (2002). Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, 27(14), 1504–1510.
- Lee, B. H., Lee, K. H., Yoon, D. H., Kim, U. J., Hwang, Y. S., Park, S. K., Choi, J. U., & Park, Y. G. (2005). Effects of methylprednisolone on the neural conduction of the motor evoked potentials in spinal cord injured rats. *J. Korean Med. Sci.*, 20(1), 132–138.
- Liebscher, T., Schnell, L., Schnell, D., Scholl, J., Schneider, R., Gullo, M., Fouad, K., Mir, A., Rausch, M., Kindler, D., Hamers, F. P., & Schwab, M. E. (2005). Nogo-A antibody improves regeneration and locomotion of spinal cord-injured rats. *Ann. Neurol.*, 58(5), 706–719.
- Liu, S., Ruenes, G. L., & Yeziarski, R. P. (1997a). NMDA and non-NMDA receptor antagonists protect against excitotoxic injury in the rat spinal cord. *Brain Res.*, 756(1-2), 160–167.
- Liu, X. Z., Xu, X. M., Hu, R., Du, C., Zhang, S. X., McDonald, J. W., Dong, H. X., Wu, Y. J., Fan, G. S., Jacquin, M. F., Hsu, C. Y., & Choi, D. W. (1997b). Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 17(14), 5395–5406.
- Marsala, M., Kakinohana, O., Yaksh, T. L., Tomori, Z., Marsala, S., & Cizkova, D. (2004). Spinal implantation of hNT neurons and neuronal precursors: graft survival and functional effects in rats with ischemic spastic paraplegia. *Eur. J. Neurosci.*, 20(9), 2401–2414.
- Merkler, D., Metz, G. A., Raineteau, O., Dietz, V., Schwab, M. E., & Fouad, K. (2001). Locomotor recovery in spinal cord-injured rats treated with an antibody neutralizing the myelin-associated neurite growth inhibitor Nogo-A. *J. Neurosci.*, 21(10), 3665–3673.
- Metz, G. A., Dietz, V., Schwab, M. E., & van de Meent, H. (1998). The effects of unilateral pyramidal tract section on hindlimb motor performance in the rat. *Behav. Brain Res.*, 96(1-2), 37–46.
- Metz, G. A., Merkler, D., Dietz, V., Schwab, M. E., & Fouad, K. (2000). Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Res.*, 883(2), 165–177.

- Metz, G. A. & Whishaw, I. Q. (2002). Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. *J. Neurosci. Methods*, 115(2), 169–179.
- Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., & Riley, M. T. (1979). A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol*, 1(3), 233–236.
- Mills, C. D., Hains, B. C., Johnson, K. M., & Hulsebosch, C. E. (2001). Strain and model differences in behavioral outcomes after spinal cord injury in rat. *J. Neurotrauma*, 18(8), 743–756.
- Muir, G. D. & Webb, A. A. (2000). Mini-review: assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 12(9), 3079–3086.
- Norrie, B. A., Nevett-Duchcherer, J. M., & Gorassini, M. A. (2005). Reduced functional recovery by delaying motor training after spinal cord injury. *J. Neurophysiol.*, 94(1), 255–264.
- Novotný, I. & Hruška, M. (2010). *Biologie člověka pro gymnázia*. 3. vydání. Praha: Fortuna.
- Oyinbo, C. A. (2011). Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 71(2), 281–299.
- Pearse, D. D., Lo, T. P., Cho, K. S., Lynch, M. P., Garg, M. S., Marcillo, A. E., Sanchez, A. R., Cruz, Y., & Dietrich, W. D. (2005). Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *J. Neurotrauma*, 22(6), 680–702.
- Popovich, P. G., Guan, Z., Wei, P., Huitinga, I., van Rooijen, N., & Stokes, B. T. (1999). Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 158(2), 351–365.
- Renno, W. M., Saleh, F., Klepacek, I., Al-Khaledi, G., Ismael, H., & Asfar, S. (2006). Green tea pain modulating effect in sciatic nerve chronic constriction injury rat model. *Nutr Neurosci*, 9(1-2), 41–47.
- Seki, T., Hida, K., Tada, M., Koyanagi, I., & Iwasaki, Y. (2002). Graded contusion model of the mouse spinal cord using a pneumatic impact device. *Neurosurgery*, 50(5), 1075–1081.

- Shi, Q., Gao, W., Han, X., Zhu, X., Sun, J., Xie, F., Hou, X., Yang, H., Dai, J., & Chen, L. (2014). Collagen scaffolds modified with collagen-binding bFGF promotes the neural regeneration in a rat hemisectioned spinal cord injury model. *Sci China Life Sci*, 57(2), 232–240.
- Shrestha, B., Coykendall, K., Li, Y., Moon, A., Priyadarshani, P., & Yao, L. (2014). Repair of injured spinal cord using biomaterial scaffolds and stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 5(4), 91.
- Smith, R. R., Burke, D. A., Baldini, A. D., Shum-Siu, A., Baltzley, R., Bungler, M., & Magnuson, D. S. (2006). The Louisville Swim Scale: a novel assessment of hindlimb function following spinal cord injury in adult rats. *J. Neurotrauma*, 23(11), 1654–1670.
- SpinalCord.CZ (2017). SpinalCord.CZ. <http://spinalcord.cz/>. Přístupováno 12.5.2017.
- Streit, W. J., Semple-Rowland, S. L., Hurley, S. D., Miller, R. C., Popovich, P. G., & Stokes, B. T. (1998). Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp. Neurol.*, 152(1), 74–87.
- Sykova, E., Homola, A., Mazanec, R., Lachmann, H., Konradova, S. L., Kobylka, P., Padr, R., Neuwirth, J., Komrska, V., Vavra, V., Stulik, J., & Bojar, M. (2006). Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant*, 15(8-9), 675–687.
- Tatlisumak, T. & Fisher, M. (2006). *Handbook of Experimental Neurology: Methods and Techniques in Animal Research*. Cambridge University Press.
- Timoszyk, W. K., Nessler, J. A., Acosta, C., Roy, R. R., Edgerton, V. R., Reinkensmeyer, D. J., & de Leon, R. (2005). Hindlimb loading determines stepping quantity and quality following spinal cord transection. *Brain Res.*, 1050(1-2), 180–189.
- Totoiu, M. O. & Keirstead, H. S. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *J. Comp. Neurol.*, 486(4), 373–383.
- Urdzikova, L., Jendelova, P., Glogarova, K., Burian, M., Hajek, M., & Sykova, E. (2006). Transplantation of bone marrow stem cells as well as mobilization by granulocyte-colony stimulating factor promotes recovery after spinal cord injury in rats. *J. Neurotrauma*, 23(9), 1379–1391.

- van de Meent, H., Hamers, F. P., Lankhorst, A. J., Buise, M. P., Joosten, E. A., & Gispén, W. H. (1996). New assessment techniques for evaluation of posttraumatic spinal cord function in the rat. *J. Neurotrauma*, 13(12), 741–754.
- Vanicky, I., Urdzikova, L., Saganova, K., Cizkova, D., & Galik, J. (2001). A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J. Neurotrauma*, 18(12), 1399–1407.
- Vaquero, J., Zurita, M., Oya, S., & Santos, M. (2006). Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosci. Lett.*, 398(1-2), 129–134.
- von Euler, M., Seiger, A., & Sundstrom, E. (1997). Clip compression injury in the spinal cord: a correlative study of neurological and morphological alterations. *Exp. Neurol.*, 145(2 Pt 1), 502–510.
- Wanner, I. B., Anderson, M. A., Song, B., Levine, J., Fernandez, A., Gray-Thompson, Z., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2013). Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 33(31), 12870–12886.
- Whishaw, I. Q. (2000). Loss of the innate cortical engram for action patterns used in skilled reaching and the development of behavioral compensation following motor cortex lesions in the rat. *Neuropharmacology*, 39(5), 788–805.
- Whishaw, I. Q. & Pellis, S. M. (1990). The structure of skilled forelimb reaching in the rat: a proximally driven movement with a single distal rotatory component. *Behav. Brain Res.*, 41(1), 49–59.
- Whishaw, I. Q., Pellis, S. M., Gorny, B., Kolb, B., & Tetzlaff, W. (1993). Proximal and distal impairments in rat forelimb use in reaching follow unilateral pyramidal tract lesions. *Behav. Brain Res.*, 56(1), 59–76.
- Xu, W., Chi, L., Xu, R., Ke, Y., Luo, C., Cai, J., Qiu, M., Gozal, D., & Liu, R. (2005). Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*, 43(4), 204–213.
- Yoshihara, H., Shumsky, J. S., Neuhuber, B., Otsuka, T., Fischer, I., & Murray, M. (2006). Combining motor training with transplantation of rat bone marrow

stromal cells does not improve repair or recovery in rats with thoracic contusion injuries. *Brain Res.*, 1119(1), 65–75.

Zhang, C., Yuan, X. R., Li, H. Y., Zhao, Z. J., Liao, Y. W., Wang, X. Y., Su, J., Sang, S. S., & Liu, Q. (2014). Downregulation of dynamin-related protein 1 attenuates glutamate-induced excitotoxicity via regulating mitochondrial function in a calcium dependent manner in HT22 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443(1), 138–143.

Zhang, Y.-K., Liu, J.-T., Peng, Z.-W., Fan, H., Yao, A.-H., Cheng, P., Liu, L., Ju, G., & Kuang, F. (2013). Different tlr4 expression and microglia/macrophage activation induced by hemorrhage in the rat spinal cord after compressive injury. *Journal of neuroinflammation*, 10(1), 112.

Šedý, J., Urdzíkova, L., Jendelová, P., & Syková, E. (2008). Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(3), 550–580.