

UNIVERZITA KARLOVA  
FAKULTA TĚLESNÉ VÝCHOVY A SPORTU  
Katedra anatomie a biomechaniky

**Funkční důsledky perinatální hypoxie–ischémie  
u potkana**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

**Doc. MUDr. Jakub Otáhal, Ph.D.**

Vypracovala:

**Bc. Eva Nováková**

Praha, březen 2019

## **Prohlášení**

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

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce doc. MUDr. Jakubu Otáhalovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a cenné připomínky. Mé poděkování dále patří RNDr. Anně Mikulecké, Ph.D. za odborné rady a pomoc při provádění a vyhodnocování behaviorálních testů. Dále děkuji Mgr. Janu Svobodovi za technickou pomoc při vyhodnocování nasbíraných dat.

## **Abstrakt:**

**Název:** Funkční důsledky perinatální hypoxie–ischémie u potkana

**Cíle:** Cílem diplomové práce je sestavit sadu behaviorálních testů pro efektivní zhodnocení motorických a kognitivně–behaviorálních schopností dospělých zvířat po experimentálně vyvolaném hypoxicko–ischemickém inzultu v perinatálním období (P7). Předpokládaným přínosem této práce je etablovat model motorických a kognitivně–behaviorálních deficitů po prodělané perinatální hypoxicko–ischemické atace.

**Metody:** Předložená práce má teoreticko–empirický charakter. Praktická část diplomové práce byla provedena formou experimentu. Do experimentu bylo zahrnuto 32 potkanů kmene Long Evans. Potkani byli náhodně rozděleni na dvě skupiny: skupina experimentální (HIE) a kontrolní (Ctrl). Hypoxicko–ischemický inzult byl proveden u sedmidenních potkanů uzavřením pravé arterie carotis communis s následnou systémovou hypoxií 8% kyslíkem a 92% dusíkem. Dospělá zvířata (stáří 55–75 dní) byla testována pomocí behaviorálních testů. Vybrány byly tyto testy: Bar holding test, Rotarod test, Ladder rung walking test, Reaching test, Open field test and Morris water maze test. Pro analýzu a statistické vyhodnocení dat byly použity programy Sigma Plot a Microsoft Excel 2010.

**Výsledky:** Na základě výsledků Open Field testu, Ladder rung walking testu a Morris water maze testu bylo zjištěno, že hypoxicko–ischemický inzult ovlivňuje emocionální stav v podobě zvýšené anxiozity. Pomocí Morris water maze testu byla odhalena porucha dlouhodobé prostorové paměti a behaviorální flexibility. Při testování behaviorální flexibility byl rozdíl mezi HIE a Ctrl skupinou signifikantní ( $p < 0,05$ ). Oproti tomu nebylo u HIE potkanů prokázáno téměř žádné poškození v testech hodnotících lokomoci a senzo–motorické funkce: Rotarod test, Bar holding test a Ladder rung walking test.

**Klíčová slova:** hypoxicko–ischemická encefalopatie, periventrikulární leukomalacie, motorický deficit, kognitivní deficit, funkční test

## **Abstract:**

**Title:** Functional consequences of perinatal hypoxia–ischemia in rat

**Objectives:** The aim of this diploma thesis is to design a set of behavioral tests which provide an effective assessment of motor and cognitive–behavioural deficits in adults rats after experimental hypoxic–ischemic insult during the perinatal period (P7). Supposed benefit is to establish a model of motor and cognitive–behavioural abilities of individuals after this procedure.

**Methods:** The present thesis has a theoretical–empirical character. The practical part describes how the experiment was performed. 32 long Evans Rats were randomly divided into two groups: experimental group (HIE) and control group (Ctrl). The method to produce hypoxic–ischemic brain damage in the 7 day–old rats consisted of right common carotid ligation followed by systemic hypoxia by the inhalation of 8% oxygen and 92% nitrogen. The adult animals (55–75 days old) were tested by the following list of behavioral tests: Bar holding test, Rotarod test, Ladder rung walking test, Reaching test, Open field test and Morris water maze test. Sigma Plot and Microsoft Excel 2010 were the programs used for statistical analysis.

**Results:** Results of Open field test, Ladder rung walking test and Morris water maze test confirmed that hypoxic–ischemic insult affects the emotional state in the form of increased anxiety. Morris water maze resulted in the reduction of long–term memory and behavioural flexibility. There was a significant difference ( $p < 0,05$ ) between the HIE and the Ctrl groups in testing of behavioural flexibility. No deficits were found while performing the locomotor and senso–motor tests: Rotarod test, Bar holding test and Ladder rung walking.

**Key words:** hypoxic–ischemic encephalopathy, periventricular leukomalacia, motor deficit, cognitive deficit, functional assessment

# Obsah

1	Úvod .....	11
2	Teoretická východiska práce .....	12
2.1	Perinatální poškození mozku .....	12
2.2	Hypoxicko–ischemická encefalopatie.....	12
2.2.1	Příčiny vzniku .....	13
2.2.2	Patofyziologie .....	14
2.2.2.1	Popis procesu.....	15
2.2.2.2	Tvorba volných radikálů a cytokinů.....	16
2.2.2.3	Role mitochondrií a endoplazmatického retikula.....	16
2.2.2.4	Apoptóza.....	17
2.2.3	Typy poškození dle gestačního období.....	18
2.2.3.1	Periventrikulární leukomalacie.....	19
2.2.4	Poškozené mozkové struktury .....	20
2.2.4.1	Hipokampální formace .....	21
2.2.5	Neuroplasticita .....	23
2.2.1	Klinický obraz.....	25
2.2.1.1	Mozková obrna.....	26
2.2.2	Prognóza a diagnostika .....	28
2.2.2.1	Zobrazovací metody .....	29
2.2.2.2	Škála dle Sarnatových .....	29
2.2.2.3	Biomarkery .....	29
2.2.2.4	Apgar skóre .....	30
2.2.3	Terapeutické možnosti.....	32
2.2.3.1	Neuroprotektivní léčba – hypotermie a farmakologie.....	32
2.2.3.2	Fyzioterapeutické přístupy .....	33
2.3	Experimentální testování.....	35

2.3.1	Ontogeneze potkana.....	35
2.3.1.1	Vývoj senzorického systému.....	37
2.3.1.2	Vývoj nervové soustavy.....	38
2.3.2	Experimentální vyvolání perinatální hypoxie.....	40
3	Experimentální část.....	42
3.1	Cíl práce.....	42
3.2	Hypotézy.....	42
3.3	Metodika práce.....	43
3.3.1	Charakter výzkumu.....	43
3.3.2	Výzkumný soubor.....	43
3.3.3	Použité metody a sběr dat.....	43
3.3.4	Zpracování a statistické vyhodnocení dat.....	45
3.3.5	Experimentální vyvolání hypoxicko–ischemického inzultu.....	45
3.3.6	Behaviorální testy.....	47
3.3.6.1	Bar holding test.....	47
3.3.6.2	Rotarod test.....	48
3.3.6.3	Ladder rung walking test.....	49
3.3.6.4	Reaching test.....	50
3.3.6.5	Open field test.....	51
3.3.6.6	Morris water maze.....	52
3.4	Výsledky.....	55
3.4.1	Bar holding test.....	55
3.4.2	Rotarod test.....	55
3.4.3	Ladder rung walking test.....	56
3.4.4	Reaching test.....	58
3.4.5	Open field test.....	60
3.4.6	Morris water maze test.....	62

4	Diskuse .....	65
4.1	Evaluace hypotéz .....	72
5	Závěr.....	74



## Seznam použitých symbolů a zkratek

ADHD – Attention Deficit Hyperactivity Disorder – porucha pozornosti s hyperaktivitou

aEEG – integrovaná amplituda elektroencefalografie

AMPA – glutamátový receptor  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalon

ATP – adenosintryfosfát

AV ČR – Akademie věd České republiky

CIMT – constraint-induced movement therapy

cm – centimetr

CNS – centrální nervová soustava

CPG – central pattern generators

CVI – cerebral visual impairment

$\text{Cl}^-$  – chloridový anion

$\text{Ca}^{2+}$  – vápenatý ion

DNA – deoxyribonukleová kyselina

E – dny embryonálního vývoje

EEG – elektroencefalografie

HI – hypoxie–ischémie

HIE – hypoxicko–ischemická encefalopatie

$\text{H}_2\text{O}$  – molekula vody

IQ – inteligenční kvocient

JIP – jednotka intenzivní péče

K – kontrolní skupina

$\text{K}^+$  – draselný ion

LTD – mechanismus dlouhodobé deprese

LTP – mechanismus dlouhodobá potenciace

m – musculus

MO – mozková obrna

MR – magnetická rezonance

Na<sup>+</sup> – sodný ion

NMDA – glutamátový receptor N-methyl-D-aspartát

NO – oxid dusnatý

PVL – periventrikulární leukomalacie

P – dny postnatálního vývoje

P7 – 7. postnatální den

PT – probe trial (testování bez platformy)

RAP – rapid auditory processing (poruchy zpracování zvukových signálů)

s – sekunda

USG – ultrasonografie

# 1 Úvod

Hypoxie s následnou ischemií je nejčastějším typem perinatálního poškození mozku u plně vyvinutých i nedonošených novorozenců. Následkem hypoxicko–ischemického (HI) infarktu může být smrt novorozence a dlouhodobý neurologický deficit motorických či kognitivních funkcí, včetně mozkové obrny. Vzhledem k výrazným pokrokům v oblasti perinatální medicíny došlo k významnému snížení počtu úmrtí novorozenců. Nicméně, počet dětí s narušeným psychomotorickým vývojem a mozkovou obrnou neklesá, dokonce v posledních letech došlo k jeho zvýšení. U dětí s narušeným psychomotorickým vývojem je velmi důležitá včasná diagnostika, terapie a fyzioterapeutická intervence.

Klinický stav po HI infarktu je velmi variabilní. Míra poškození je ovlivněna zejména dobou trvání infarktu, místem infarktu a gestačním věkem. Již v raném novorozeneckém stádiu chtějí rodiče znát odpověď na otázku, zda jejich dítě bude schopno chůze, zda bude umět mluvit a vést nezávislý život. Bohužel, zatím není možné přesně stanovit, v jaké míře bude HI infarkt narušovat další vývoj dítěte. Nutno dodat, že v dnešní době neexistuje žádná farmakologická ani terapeutická léčba, která by dokázala následky HI infarktu plně eliminovat.

Prostudováním odborné literatury bylo zjištěno, že pro objasnění mechanismů neonatální hypoxie–ischemie a jejich následků je potřeba dalších výzkumů. Doposud je zveřejněno jen velmi málo pediatrických i experimentálních zvířecích studií, které jsou zaměřeny na dlouhodobé neurobehaviorální následky po perinatálním HI infarktu. Studium dlouhodobých následků umožňuje zkoumání vývojové plasticity mozkové tkáně od narození, dětství až po dospělého jedince. Z tohoto důvodu jsou další experimentální studie na zvířatech nezbytné. Experimentální přístup je důležitý pro rozvoj metod prevence, včasné diagnostiky a strategie pro korekci následků tohoto poškození. Za typická experimentální zvířata jsou považováni laboratorní potkani. Potkan je jedním z nejlépe prostudovaných savců. Stejně jako lidský novorozenec se rodí s nezralou centrální nervovou soustavou a nedokončeným motorickým vývojem. Dalším společným rysem je podobnost v oblasti jemné motoriky a úchopu.

## **2 Teoretická východiska práce**

### **2.1 Perinatální poškození mozku**

Perinatální období hraje důležitou roli ve vývoji neuropsychologických funkcí. V tomto období intenzivního vývoje je mozek nejzranitelnější vůči působení negativních faktorů. Poškození mozku v perinatálním období může vést k rozvoji funkčních poruch, které se projevují během celého života. Perinatální období zahrnuje vývoj od 22. gestačního týdne, dobu porodu a 7 dní postnatálního vývoje (Sukhanova et al., 2016).

K perinatálnímu poškození mozku dochází ve vyspělých i rozvojových zemích. Incidence výskytu je 1–3 z 1000 (Hagberg et al., 2016) nebo 1–6 z 1000 (Armstrong–Wells et al., 2010; Gonzalez a Miller, 2006) narozených novorozenců. Nejčastější typem poškození je hypoxie s následnou ischemií, dále se objevuje perinatální arteriální ischemický infarkt, intrakraniální krvácení a méně často infarkt vyvolaný trombózou žilního sinu (Hagberg et al., 2015; Weeke et. al., 2015). Výsledkem téměř všech perinatálních poškození mozku je novorozenecká encefalopatie. Neonatální encefalopatie je hlavním důvodem neurovývojové disability. 15–20 % zasažených dětí umírá během postnatálního období a 25 % přeživších má závažný permanentní klinický deficit (Gonzalez a Miller, 2006).

### **2.2 Hypoxicko–ischemická encefalopatie**

Incidence výskytu hypoxicko–ischemické encefalopatie (HIE) je u 1–2 z 1000 narozených novorozenců v západních zemích, zejména v zemích rozvojových (Groenendaal a Vries, 2015; Huang, Wen a Liu, 2015). HI inzult může být vyvolán kyslíkovou nedostatečností během těhotenství, porodu a raného novorozeneckého období (Groenendaal a Vries, 2015). Hypoxie je stav nedostatečného zásobení mozku a krve kyslíkem. Kompletní přerušení dodávky kyslíku se nazývá anoxie. Ischémie je pojem, který představuje částečné nebo úplné přerušení krevního průtoku v orgánech (Groenendaal a Vries, 2015; Sukhanova et al., 2016).

Akutní hypoxie je charakterizována dočasným snížením dodávky kyslíku. Nejčastěji se vyskytuje během porodu předčasně narozených dětí s nízkou porodní váhou a plicní nebo srdeční dysfunkcí (Sukhanova et al., 2016).

HI inzult mohou během porodu a raného postnatálního období prodělat i děti zralé, narozené ve správném termínu (Alexander et al., 2014; Groenendaal a Vries, 2015). Chronická hypoxie znamená trvalé snížení dodávky kyslíku z různých důvodů. Nejčastějším důvodem je placentární insuficience. Výsledkem chronické hypoxie je nízká váha novorozence, snížení celkového objemu mozku, mozkové kůry, nervových buněk a porucha myelinizace (Sukhanova et al., 2016).

### 2.2.1 Příčiny vzniku

Hlavní příčinou vzniku HIE je perinatální asfyxie. Perinatální asfyxie je stav, který je vyvolán před porodem nebo během porodu sníženou výměnou krevních plynů přes placentu a pupeční šňůru. Plod má nedostatek kyslíku, dochází k retenci oxidu uhličitého a postupnému vývoji metabolické acidózy (Groenendaal a Vries, 2015; Ježová a Feit, 2013). Příčiny vzniku perinatální asfyxie jsou uvedeny v tabulce 1.

Děložní kontrakce při porodu vedou ke změnám cirkulace krve v uteroplacentárním řečišti. Pokud je porod i plod fyziologický, je přísun okysličené krve při děložních kontrakcích dostatečný. Za patologických situací je úspěšná adaptace na porodní kontrakce znemožněna (Ježová a Feit, 2013).

Tabulka 1: Příčiny vzniku perinatální asfyxie

Stav matky	Uteroplacentární úroveň	Stav plodu	Mechanické faktory
Srdeční zástava	Abrupce placenty	Srdeční arytmie	Protrahovaný porod
Asfyxie	Prolaps pupeční šňůry	Fetomaternal hemorrhage*	Nadměrná děložní činnost
Vážná anafylaktická reakce Hypovolemický šok	Ruptura dělohy	Twin-to-twin transfusion syndrom**	Patologie malé pánve
Status epilepticus	Hyperstimulace oxytoxickými látkami	Vážné isoimunitní hemolytické onemocnění ***	Předčasný porod

(Groenendaal a Vries, 2015; Ježová a Feit, 2013; Sukhanova et al., 2016)

*\*Propojení krevního oběhu plodu a matky. Krevní buňky plodu se dostávají do oběhu matky. Častá příčina smrti.*

*\*\*Propojení krevního oběhu dvojčat, sdílejících jednu placentu. Vznik nerovnováhy krevního toku od jednoho plodu (dárce) k druhému (příjemce). U dárce je snížen krevní objem, zpomalen vývoj a růst. Dále je snížena tvorba moči a množství plodové vody. Krevní objem příjemce je zvýšený, což může vést k nadměrnému množství plodové vody, nadměrné tvorbě moči a selhání srdce.*

*\*\*\*Reakce na protilátky matky.*

## 2.2.2 Patofyziologie

HIE je postupně se rozvíjející proces. Průběh HI poškození mozku je možné rozdělit do několika fází (Hagberg et al., 2015; Roztočil et al., 2017). Roztočil et al. (2017) uvádí tři fáze: časnou fázi (nekróza buněk = primární smrt buněk), latentní fázi a pozdní fázi (sekundární smrt buněk = apoptóza). Hagberg et al. (2015) rozlišuje čtyři fáze: primární fáze, latentní fáze, sekundární fáze a terciární fáze.

Primární fáze představuje samotný ischemický a asfyktický inzult. Dochází ke snížení průtoku krve, vyčerpání energetických zásob tkáně a smrti buněk v ohnisku inzultu. Některé buňky tuto primární fázi přežívají. V latentní fázi (délka trvání 6–15 hodin) probíhá u méně závažných inzultů obnova buněčného metabolismu a regenerace přeživších buněk v penumbrální zóně v podobě reperfuze a reoxygenace. Dochází k téměř kompletnímu obnovení využití glukózy, stabilizace mozkové cirkulace, mitochondriálního dýchání a vysokoenergetických fosfátových zdrojů (Roztočil et al., 2017). Terapie za účelem neuroprotektce by měly být provedeny právě v této době „terapeutického okna“ (Groenendaal a Vries, 2015). V případě rozsáhlého HI inzultu pokračuje proces do sekundární fáze energetického selhání (Roztočil et al., 2017). V experimentálních studiích bylo dokázáno, že terapeutické okno může být posunuto až za sekundární fázi do takzvané fáze terciární (Fleiss a Gressens, 2012).

Ve fázi sekundárního poškození mozku dochází k zániku buněk, které přežily primární fázi. Probíhá zde složitá kaskáda intracelulárních procesů, které vedou k apoptóze buněk a neuronálním ztrátám. V experimentálních podmínkách bylo prokázáno, že sekundární energetická porucha nastává za 6–8 hodin po primárním inzultu a může trvat až 72 hodin. Buňky zasažené při primárním poškození produkují NO a cytokiny, které se podílejí na zvětšování poškozené oblasti (Groenendaal a Vries, 2015; Sukhanova et al., 2016).

V oblastech vystavených mírnějším hypoxicko–ischemickým inzultům mohou neurony podléhat smrti s časovým zpožděním. Reparace a kompenzační mechanismy tkáně moduluji rozsah primární a sekundární léze a funkční následky. Z tohoto důvodu není možné hodnotit strukturální a funkční následky ihned po proběhlém inzultu (Bona et al., 1997).

### 2.2.2.1 Popis procesu

Patofyziologický proces začíná snížením krevního průtoku v mozkové tkáni s postupným rozvojem hypoxémie. Výsledkem je snížená utilizace glukózy prostřednictvím oxidativní fosforylace a nižší tvorba energie ve formě ATP. Při oxidativní fosforylaci fyziologicky vzniká z jedné molekuly glukózy 36–38 molekul ATP. Tento proces je postupně nahrazen anaerobní fosforylací, jejímž produktem je laktát, a z jedné molekuly glukózy vznikají pouze 2 molekuly ATP (Smrčka, 2007).

Následkem tohoto patofyziologického procesu je:

- nadměrná neurotoxikační aktivita,
- narušená mikrocirkulace,
- narušená funkce  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  – adenosintrifosfátové pumpy,
- nižší počet procesů produkujících energii,
- extreacelulární acidóza,
- porucha mitochondriální funkce,
- spuštění kaskády zánětlivých mediátorů,
- lipoperoxidace a tvorba volných radikálů (Groenendaal a Vries, 2015; Smrčka, 2007).

Za hlavní excitační aminokyseliny a neurotransmitery v mozku je považován glutamát a asparát. Vedle excitačního účinku je znám jejich toxický efekt na neurony a prekuzory oligodendroglíí v centrální nervové soustavě. Po HI inzultu je v mozku zvýšené množství excitotoxických prvků (Hagberg et al., 2016). Postupně je vyčerpán adenosintrifosfát a dochází k narušení iontových transmembránových gradientů, výtoku  $\text{K}^+$ , vtoku a hromadění  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{H}_2\text{O}$  v buňkách. Zvýšené množství extracelulárního glutamátu a  $\text{K}^+$  depolarizuje membrány a aktivuje extrasynaptické a intrasynaptické receptory NMDA a AMPA. Tyto receptory vyvolají neregulovatelné otevření vápenatých kanálů a nadměrné hromadění intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nadměrný vtok  $\text{Ca}^{2+}$  ovlivňuje funkci buněčných organel, zejména mitochondrií a endoplazmatického retikula (Groenendaal a Vries, 2015; Hagberg et al., 2016; Fišar, Hroudová a Raboch, 2011). Výsledkem je cytotoxický edém. Tato metabolická změna je energeticky neefektivní, vede k aktivaci lipáz, proteáz, endonukleáz a fosfolipázy C, které poškozují membrány, proteiny a nukleové kyseliny buněčných organel. Tímto vznikne řada abnormálních procesů a dochází k uvolnění volných radikálů (NO, superoxidové ionty). Radikály mají nepříznivé účinky na buněčné membrány, dochází k selhání mitochondrií, uvolnění kaspázy-3, fragmentaci DNA a uvolnění poly (ADP-ribosy) polymerázy. Tyto děje vyvolávají další energetická selhání intracelulárních membránových funkcí a buněčnou apoptózu (Hagberg et al., 2016).

### 2.2.2.2 Tvorba volných radikálů a cytokinů

Volné radikály vznikají za přítomnosti oxidu dusnatého a volného železa. Volné železo katalyzuje nereaktivní a středně reaktivní druhy kyslíku na toxické radikály. Po HI inzultu množství volného železa stoupá během prvních 24 hodin. Tato zvýšená hladina přetrvává několik týdnů (Groenendaal a Vries, 2015). Volné radikály kyslíku vyvolávají peroxidaci nenasycených mastných kyselin. Mozek, který obsahuje velké množství polynenasycených fosfolipidů, je na jejich působení velmi citlivý. V nezralém mozku nejsou mechanismy, které produkují inhibici volných radikálů dostatečně vyvinuty.

Po HI inzultu jsou aktivovány prozánětlivé cytokiny. V mikroglích bylo nalezeno vysoké zastoupení kaspasy-1 a interleukinu 18 (Groenendaal a Vries, 2015).

### 2.2.2.3 Role mitochondrií a endoplazmatického retikula

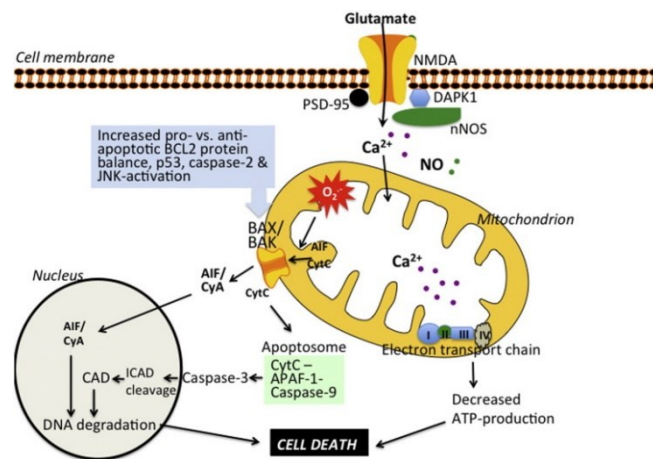
Hlavní funkcí mitochondrií je tvorba ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace a enzymů citrátového cyklu. Další funkcí je produkce reaktivního kyslíku, regulace nitrobuněčného kalcia, termogeneze a iniciace apoptózy (Fišar, Hroudová a Raboch, 2011). Během HI inzultu se snižuje rychlost proudění elektronů v transportním řetězci a klesá gradient  $\text{H}^+$  přes vnitřní membránu. Následkem je menší produkce ATP (Sanderson et al., 2013).

Endoplazmatické retikulum se významně podílí na udržení intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy. Při HI inzultu je funkce endoplazmatického retikula narušena a dochází k nadměrnému uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$ .



Tyto ionty jsou poté ve zvýšené míře přijímány mitochondriemi. Akumulace  $\text{Ca}^{2+}$  v mitochondriální matrix aktivuje mitochondriální fosfatázy vedoucí k uvolnění cytochromu c (apoptózu indukující faktor) a patologické hyperpolarizaci mitochondriální membrány (Sanderson et al., 2013).

Hyperpolarizace vnitřní mitochondriální membrány, nedostatečná tvorba ATP a zvýšená produkce NO provokují zvýšenou tvorbu reaktivního kyslíku, uvolnění cytochromu c a proteinu AIF z vnitřní membrány do intermembránového prostoru (Murphy, 2009). Výsledkem je ztráta membránového potenciálu na vnitřní membráně, která vede k permeabilizaci vnější membrány, uvolnění proapoptotických faktorů – Bcl-2 a Bcl-xL a zahájení programované buněčné smrti (Fišar, Hroudová a Raboch, 2011). Propustnost vnější stěny mitochondriální membrány je regulována prostřednictvím rodiny Bcl-2 proteinů (BAX a BAK protein) (Burke, 2008). Cytochrom c vytváří apoptosom aktivující výkonné kaspázy, které štěpí cytoskelet a buněčná jádra, což je příčinou fragmentace DNA a apoptické smrti buňky (Fišar, Hroudová a Raboch, 2011). Protein AIF je z cytosolu přenesen do buněčného jádra, kde se naváže na DNA a přispívá k jeho degradaci (Burke, 2008). Patofyziologický proces po HI je znázorněn na obrázku 1.



Obrázek 1: Role mitochondrií při HI poškození mozku

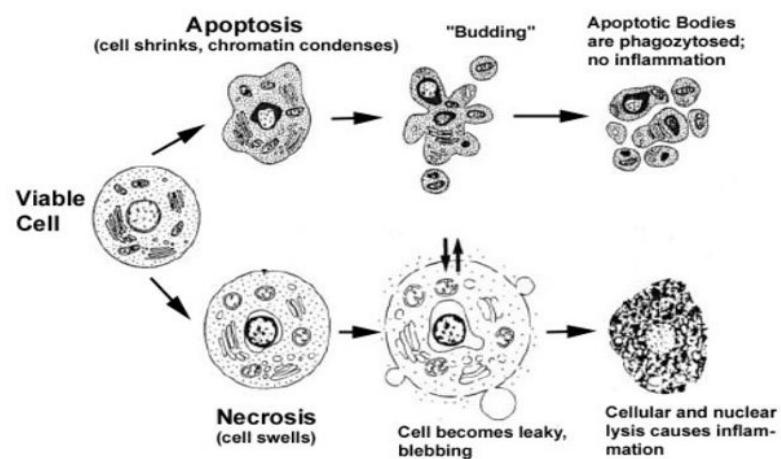
(Hagberg et al., 2016)

#### 2.2.2.4 Apoptóza

Apoptóza je nejvýznamnější příčinou neuronální smrti u novorozenců po HI infultu. Z histologického hlediska je charakteristickými morfologickými změnami odlišitelná od nekrózy.

U apoptózy dochází ke smrštění buňky, degradaci cytoskeletu, zachování cytoskeletální membrány a rozpadu buněk na apoptická tělíska, která jsou fagocytována. Buňky jsou fagocytovány dříve, než dojde k uvolnění jejich obsahu do extracelulárního prostředí. Z tohoto důvodu není apoptóza doprovázena vznikem zánětu. Nekróza je naopak charakteristická rupturou buněk, vyliáním obsahu buněk do extracelulárního prostředí a rozvojem dalších zánětlivých procesů v dané tkáni (Groenendaal a Vries, 2015; Gewies, 2003). Zobrazeno na obrázku 2.

Apoptóza je genově regulovaný proces, jehož průběh je ovlivněn proapoptickými a antiapoptickými proteiny z rodiny Bcl-2 (Groenendaal a Vries, 2015). Podrobnější patofyziologický popis apoptózy je nad rámec této práce a je uveden v práci Gewies (2003).



Obrázek 2: Charakteristické znaky apoptické a nekrotické smrti buněk (Gewies, 2003)

### 2.2.3 Typy poškození dle gestačního období

Rozsah a typ poškození neurálních struktur závisí na stáří novorozence. U nezralých novorozenců se ve většině případů jedná o poškození především bílé hmoty mozkové. Poškození neokortikálních a subkortikálních neuronálních buněk je typické pro zralé novorozence. Hypoxické a ischemické poškození hluboké mozkové šedi (bazálních ganglií, thalamu, mozkového kmene) postihuje jak zralé, tak nezralé novorozence (Fang et al., 2013; Sukhanova et al., 2016).

Praktická část práce se zabývá funkčními důsledky HI infarktu u sedmidenních potkanů, kteří zralostí nervové soustavy odpovídají lidskému plodu ve 30.–34. týdnu těhotenství. Z tohoto důvodu je níže popisováno poškození mozku u nezralých novorozenců.

### 2.2.3.1 Periventrikulární leukomalacie

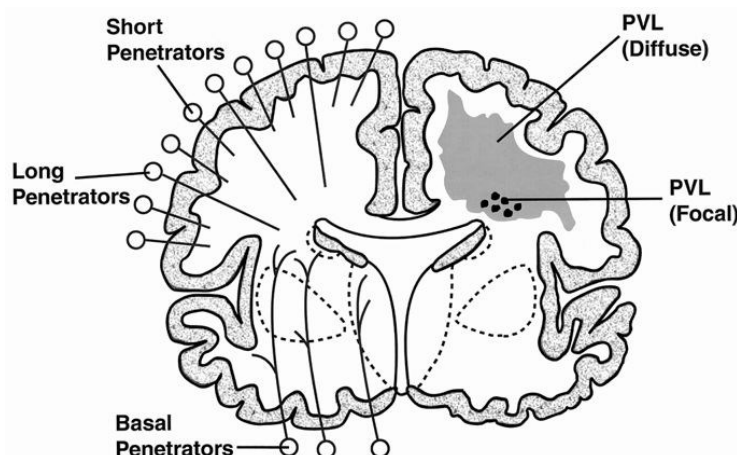
Periventrikulární leukomalacie je nejčastějším výsledkem poškození mozku u předčasně narozených dětí s nízkou hmotností (< 1500 g) (Hüppi and Gressens, 2015; Volpe, 2001). Toto poškození nyní přežívá 90 % předčasně narozených dětí. U 10 % z těchto dětí je později diagnostikována mozková obrna a u 25–50 % dětí jsou přítomny výrazné kognitivní poruchy a poruchy chování (Hüppi and Gressens, 2015).

Mozek je nejcitlivější na nedostatek kyslíku v období mezi 23.–32. gestačním týdnem (Huang et al., 2009). Důvodem je přítomnost prekurzorů oligodendrocytů, známých jako preoligodendrocyty, které jsou citlivé na excitotoxické a oxidační poranění. K dozrávání oligodendroglíí dochází po 32. gestačním týdnu (Hüppi and Gressens, 2015). Následkem periventrikulární leukomalacie je snížení objemu bílé hmoty mozkové, ventrikulomegalie, ztenčení corpus callosum a úbytek myelinu (Zaghloul, Patel a Ahmed, 2017). Největšímu riziku poškození je vystavena bílá hmota při postranních komorách mozkových a zadních rozích capsuly interny (Volpe, 2001).

Pod termínem periventrikulární leukomalacie jsou schovány dva neuropatologické principy – fokální cystická léze a difúzní necystická léze (Huang et al., 2009; Volpe, 2001). Fokální a multifokální léze jsou lokalizované v hluboké bílé hmotě vedle postranních komor. Charakteristickým znakem je lokální nekróza všech buněčných elementů a tvorba cyst (Hüppi and Gressens, 2015; Volpe, 2001; Zhu et al., 2013). Klasickým klinickým obrazem je spastická diplegie. Difúzní poškození je méně závažné poškození bílé hmoty a preoligodendrocytů. Poškozením preoligodendrocytů dochází ke zpomalení vývoje oligodendrocytů s výslednou poruchou tvorby myelinu. Difúzní poškození se dle dostupných studií vyskytuje častěji. Obvyklým následkem difúzního poškození je kognitivní a behaviorální deficit (Volpe, 2001). Fokální a difúzní léze je zobrazena na obrázku 3.

Přívod krve do bílé hmoty mozkové je zajišťován krátkými subkortikálními a dlouhými hlubokými tepnami. Fokální ložisko se nejčastěji nachází v koncové zóně dlouhých penetrujících arterií. Při difúzním poškození dochází k poškození mezi jednotlivými dlouhými ventrikulopetálními a ventrikulofugálními tepnami a v koncových zónách krátkých penetrujících arterií. Důvodem je nedokončená vaskularizace a to, že penetrující arterioly nemají kolaterály, které by zásobování zajistily (Volpe, 2001).

HI inzult je příčinou otoku axonů a proliferace mikrogliaálních buněk. V subakutní a chronické fázi oteklé axony kalcifikují, hromadí se železo a dochází k hyperplazii astrocytů, aktivaci makrofágů a degeneraci buněk především v bílé hmotě na periférii fokálního inzultu. Další drobné změny se vyskytují také v šedé hmotě mozkové, v hipokampu a cerebelárních Purkyněho buňkách (Volpe, 2001; Zaghloul, Patel a Ahmed, 2017).



Obrázek 3: Schematické znázornění sekce mozku s fokálními a difuzními složkami PVL (Volpe, 2001)

#### 2.2.4 Poškozené mozkové struktury

Poškození nervových struktur po HI inzultu je velmi variabilní, záleží na gestačním stáří jedince a intenzitě inzultu. Dle výsledků magnetické rezonance je poškození bílé hmoty následkem parciální asfyxie, zatímco poškození bazálních ganglií a hlubokých šedých mozkových struktur je spojeno s hlubokou akutní asfyxií (Armstrong–Wells et al.; 2010).

Z pohledu histologického a neurochemického je prokázáno zvýšení objemu mozkových komor a snížení neuronální hustoty v neokortexu ipsilaterální hemisféry, hipokampu, corpus callosum, thalamu a striatu. Dále je potvrzena degenerace axonů a porucha myelinizace (Lubics et al., 2005; Rice et al., 1981). Ve studii Jansen a Low (1996) je popsána pouze 6% velikost dorzálního hipokamu, zmenšení striata o 29 % a zmenšení sensorimotorického kortexu o 26 % v porovnání s fyziologickou normou.

### 2.2.4.1 Hipokampální formace

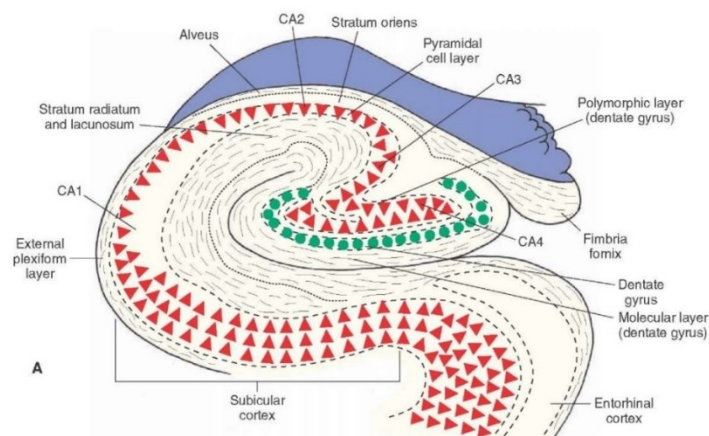
Hipokampus je spolu s amygdalou a hypothalamem zapojen do limbického systému. Limbický systém ovlivňuje motivaci, emoce, náladu, bolest, paměť, sexuální apetenci, pocity hladu a chuť k jídlu. Hipokampus má vliv na průběh tělesných procesů. Společně s mediální prefrontální kůrou hrají důležitou roli v procesu učení a zpracování deklarativní a prostorové paměti. Hipokampus dále ovlivňuje emoční chování, reguluje strach, úzkost a hypothalamické funkce. Je nezbytný pro rychlé vytváření nových a ucelených vzpomínek, zajišťuje jejich přechodné uchování a mění krátkodobé vzpomínky na dlouhodobé. Vzpomínky jsou poté uchovávány v neokortexu (Anand a Dhikav, 2012; Preston a Eichenbaum; 2014).

Deklarativní paměť obsahuje paměť sémantickou a epizodickou. Sémantická paměť není vázána na prostor a čas, jejím prostřednictvím si člověk vybaví vědomosti, fakta, pojmy, zeměpisné znalosti či matematické vzorce. Epizodická paměť se vztahuje k určité době, času a prostoru, pomáhá při vybavení si událostí, které člověk sám prožil (Tulvig, 1972).

Hipokampus je rozdělen na hlavu, tělo a taile (Destrieux et al., 2013). Podrobněji je hipokampální formace členěna na několik částí: cornu ammonis, gyrus dentatus, subiculum a entorhinální, perirhinální a parahipokampální kůru (Anand a Dhikav, 2012). Toto dělení je zobrazeno na obrázku 4. Na základně histologického vyšetření je hlavní část hipokampu cornu ammonis rozdělena na čtyři části (CA<sub>1</sub>–CA<sub>4</sub>), které jsou kryty tenkou bílou vrstvou – alveus a fimbria (Anand a Dhikav, 2012; Destrieux et al., 2013). Oblasti CA<sub>1</sub>–CA<sub>4</sub> se liší charakteristikou neuronů a propojením s okolními oblastmi. Hipokampus má bohatý aferentní i eferentní systém. Pro proces učení a paměti jsou důležité dvě nervové dráhy: polysynaptická dráha a přímá dráha. Prostřednictvím polysynaptické dráhy přichází do hipokampu informace z parietálního, temporálního a okcipitálního laloku kůry mozkové. V hipokampu jsou tyto informace přeneseny do gyrus dentatus → CA<sub>3</sub> → CA<sub>1</sub> → subiculum → alveus hipokampu → fimbria hipokampu → fornix → tractus mamilothalamicus → anteriorní thalamus → cingulum posterior → retrosplenální cortex. Tato dráha je důležitá pro sémantickou paměť. Přímá dráha vede informace z temporální části kortexu přes perirhinální a entorhinální oblast do CA<sub>1</sub>. Tato dráha je důležitá pro epizodickou a prostorovou paměť (Anand a Dhikav, 2012).

Podle longitudinální (septo–temporální) osy se hipokampus rozděluje na ventrální, intermediální a dorzální (Bannerman et al., 2004). Mezi ventrálním a dorzálním hipokampem existuje funkční disociace. Poškození dorzálního hipokampu (CA<sub>1</sub> oblast) vede k poruše prostorového učení a paměti (Pothuizen et al., 2004; Bannerman et al., 2004; Zhang et al.; 2004). Ventrální hipokampus je zodpovědný za emoce, stres a pocit strachu a úzkosti. Při poškození ventrálního hipokampu je snižená míra „hyponeofagie“ (snížená mobilita z důvodu strachu z nového prostředí) (Bannerman et al., 2004).

Hipokampus obsahuje místové buňky, které vytváří kognitivní mapu a zajišťují prostorovou paměť. Nejvyšší hustota místových buněk je v dorzální části hipokampu (CA<sub>1</sub>). Bylo prokázáno, že pokud se zvíře nachází na známém místě, tyto buňky se aktivují. Místní buňky se podílejí na fungování kognitivních funkcí. Nedávné studie prokázaly, že se v hipokampu nachází i takzvané buňky časové, které se podílejí na uspořádání každodenních činností a zkušeností. Tyto místní a časové buňky umožňují pozdější přehrávání prostorově časových sekvencí (Preston a Eichenbaum, 2014). HI inzultem je nejčastěji poškozena oblast CA<sub>1</sub>, CA<sub>3</sub> a gyrus dentatus. Jeden měsíc po inzultu pozoroval Morales et al. (2008) zvýšenou apoptózu v CA<sub>3</sub> oblasti a zvýšenou proliferaci suprapyramidálních buněk v gyrus dentatus.



Obrázek 4: Diferenciace hipokampu z anatomického hlediska  
(The – Limbic System (Integrative Systems) Part 1, online)

## 2.2.5 Neuroplasticita

V praktické části práce se zabýváme zkoumáním dlouhodobých funkčních následků po HI inzultu. Z tohoto důvodu je na místě zmínit schopnost plasticity a neurogeneze centrální nervové soustavy.

Plasticita znamená schopnost adaptace na daný úkol v určitém prostředí. Neuroplasticita je schopnost nervového systému měnit svůj vývojový vzorec, fenotyp a chování v závislosti na fyziologických i patologických podmínkách vnitřního a vnějšího prostředí. Nervový systém se mění také na základě zkušeností a opakujících se procesů (Kolář et al., 2009; Rocha–Ferreira a Hristova, 2016). Mechanismus plasticity probíhá u zdravého i poškozeného nervového systému a je zajišťován pečlivě kontrolovanými molekulárními, buněčnými a fyziologickými procesy (Rocha–Ferreira a Hristova, 2016).

Mechanismy reparace po poškození mozku nejsou zcela jasné. Nervové buňky mozkové tkáně jsou schopny neuroanatomické reorganizace a funkční adaptace prostřednictvím aktivity substitučních mozkových oblastí, které nebyly při inzultu poškozeny. Nezralý mozek představuje vysoce dynamický systém, na jehož reparaci se podílí synaptogeneze, arborizace dendritů, myelinizace, větvení axonů a přestavba neuronálních okruhů (Kirton a Veber, 2013).

Krátkodobým cílem neuroplasticity při poškození mozku je posílení synaptických spojů. Dlouhodobým cílem je strukturální změna v organizaci a počtu spojů mezi neurony. Těchto změn je dosaženo pomocí mechanismu dlouhodobé potenciace (LTP) a dlouhodobé deprese (LTD). Podstatou synaptogeneze je přítomnost glutamátových AMPA a NMDA receptorů, které umožňují vstup  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Na}^{2+}$  do buňky. LTP zajišťuje dlouhodobé zvýšení synaptické síly mezi dvěma neurony. Pokud je buňka vysokofrekvenčně stimulována dochází ke zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů. Tento jev vede k externalizaci nových AMPA receptorů a uvolnění proteinů, které zvýší senzitivitu synapse nebo vytvoří synapse úplně nové. LTD je vyvolán nízkofrekvenční stimulací, kdy nízký nárůst  $\text{Ca}^{2+}$  iontů vede k internalizaci AMPA receptorů a snížení synaptické síly (Gál, Hoskovicová a Jech, 2015).

Restituce může probíhat na úrovni lokální, intra–hemisferické a inter–hemisférické. Mezi lokální se řadí sprouting a synaptogeneze. Při časně reperfuzi je mechanismem restituce obnova funkce v penumbře.

Na intra-hemisferické úrovni dochází ke zvýšené aktivaci sekundárních motorických oblastí, řízení se přesouvá na extrapyramidové dráhy a probíhá remodelace a aktivace nepoškozené kortikální tkáně v okolí léze (Gál, Hoskovcová a Jech, 2015). Následkem je ztráta jemné motoriky a koordinace, ztráta selektivního pohybu a zvýšená námaha při iniciaci pohybu (Basu et al., 2015; Gál, Hoskovcová a Jech, 2015). K provedení přesného a cíleného pohybu musí být kortikospinální dráha složena z intaktních zkřížených vláken a nezkřížených vláken kontralaterální hemisféry. Inter-hemisferické reakce na lézi zahrnují reorganizaci a supranormální aktivitu nepostižené kontralaterální hemisféry. V případě poškození kortikospinální dráhy je pohyb řízen přes nezkřížená vlákna z kontralaterální hemisféry. Možné je řízení i přes zkřížená vlákna, která se sproutingem na míšní úrovni znovu zkříží a napojí se na denervované  $\alpha$ -motoneurony (Basu et al., 2015; Gál, Hoskovcová a Jech, 2015; Lubics et al., 2005).

Restituce a regenerace po poškození mozku je většinou samovolná, ke zlepšování stavu dochází s časem. Je prokázán trend k vyšší míře zlepšení motorických funkcí při časném zahájení rehabilitace (Gál, Hoskovcová a Jech, 2015).

Na ipsilaterální straně mozkové tkáně byly po závažném HI inzultu zobrazeny buňky a axony podléhající degeneračním procesům i jeden měsíc po inzultu. Zároveň byl objeven růst nových axonů, dendritů a tvorba nových synapsí. Sprouting nových neuritů, tvorba synapsí a myelinizace mnoha malých axonů naznačují, že všechny komponenty a buněčné procesy potřebné pro funkční zotavení jsou v ipsilaterální hemisféře přítomny. Pravděpodobnou příčinou dlouhodobých funkčních deficitů je přítomnost abnormálních typů buněk v poškozené hemisféře a neschopnost nově bujících axonů dosáhnout běžných cílových struktur (Skoff et al., 2007). U středně těžké neonatální HIE je myelinizace na ipsilaterální straně zpočátku snížena, ale během dvou týdnů dochází k její obnově. U závažnějších forem zůstává myelinizace narušena. Oligodendroglie jsou v místech fokálního a difúzního poškození generovány od 3. do 5. týdne po lézi (Skoff et al., 2007).



## 2.2.1 Klinický obraz

Klinický obraz a rozsah poškození mozku po HI inzultu je heterogenní a je ovlivněn několika faktory: dobou trvání, místem inzultu, gestačním věkem, přídatným infekčním nebo metabolickým onemocněním a traumatickým poraněním (Groenendaal a Vries, 2015). Perinatální hypoxie má negativní vliv na vývoj centrální nervové soustavy (Sukhanova et al., 2016).

Častým následkem HI inzultu je mozková obrna s poškozením motorických a kognitivních funkcí. Další typem klinického nálezu po HI inzultu je izolované poškození kognitivních funkcí bez funkčních motorických deficitů (Gonzalez a Miller, 2006; Lindström et al., 2010). Ve většině případů jsou přítomny epileptické záchvaty, poruchy zraku (cerebral visual impairment (CVI)) a poruchy zpracovávání zvukových signálů a informací (rapid auditory processing (RAP)). Jedinci s RAP mají funkčně a strukturálně sluchový aparát vyvinutý, ale nejsou schopni dané informace rozpoznat, zpracovat a interpretovat. Porucha zpracování informací vede k poruše řeči. Tento deficit mají zejména děti s periventrikulární leukomalacií (Alexander et al., 2014). Při perinatálním poškození mozku dochází často k útlaku a poškození zrakových drah, následkem je CVI. CVI je definováno jako bilaterální poškození zraku, při kterém je snížena zraková ostrost, porucha fixace a užší zorné pole. Dalším projevem mohou být sakadické oční pohyby (Alimovic, Juric a Bošnjak, 2014).

Dysfunkce motorických funkcí jsou rozpoznatelné již v raném věku, několik dní po porodu. Narušení kognitivních funkcí je většinou rozpoznáno až ve věku školním (Armstrong–Wells et al., 2010; Handel et al., 2007).

Vývoj kognitivních funkcí u dětí se středně těžkou mozkovou encefalopatií je oproti zdravým vrstevníkům opožděn. Do kognitivních poruch se řadí mentální retardace, poruchy učení, poruchy jazykových dovedností, poruchy exekutivních funkcí a narušená schopnost socializace (Gonzalez a Miller; 2006).

Tíže poškození kognitivních a motorických funkcí závisí na závažnosti neonatální encefalopatie (Armstrong–Wells et al., 2010; Gonzalez a Miller, 2006; Lindström et al., 2010; Huang, Wen a Liu, 2015). Při poškození bazálních ganglií jsou výrazně narušeny kognitivní i motorické funkce (Gonzalez a Miller, 2006). Naopak pouze při poškození bílé hmoty je motorický deficit mírný. Jedinci s lehkou formou novorozenecké encefalopatie mají normální neurokognitivní vývoj.

Klinický nález u dětí se středně těžkou encefalopatií je nejvíce heterogenní. Podle dostupných studií tyto děti (Gonzalez a Miller, 2006; Lindström et al., 2010; Handel et al., 2007) mohou mít narušené chování a kognitivní funkce, a to i bez přítomnosti motorického deficitu.

HIE je jedna z nejčastějších příčin záchvatů (Weeke et al., 2015). Novorozenecké epileptické záchvaty má více než polovina dětí po HI inzultu (Robertson a Perlman, 2006). Incidence epileptických záchvatů může být přesně monitorována pouze s využitím aEEG nebo běžného EEG (Hagberg et al., 2015; Weeke et al., 2015). Epileptické záchvaty se častěji vyskytují u dětí se spastickou kvadruparézou a hemiparézou než u dětí se spastickou diplegií či ataxií (Aisen et al., 2011). Dlouhodobá přítomnost záchvatů vede k narušení vývoje mozku a zvyšuje riziko rozvoje epilepsie (Shalak a Perlman, 2004).

Ve studii Marlow et al. (2005) je uvedena hyperaktivita a hyperkineze u dětí se středně těžkou mozkovou encefalopatií. Predilekčně poškozený hipokampus a striatum se podílejí na rozvoji patogeneze ADHD, autismu a schizofrenie (Badawi et al., 2006; Handel et al., 2007). Děti se středně těžkou a závažnou formou encefalopatie mají větší sklony k agresivitě, pasivitě a úzkosti (Moster, Lie a Markestad, 2002).

### **2.2.1.1 Mozková obrna**

Mozková obrna je neurovývojové, neprogresivní postižení hrubých motorických funkcí, vzniklých na podkladě, již proběhlého a ukončeného prenatálního, perinatálního či časně postnatálního poškození mozku. Motorické poruchy jsou často doprovázeny poruchami čítí, kognitivních funkcí, komunikace, chování a inteligence a přítomností epileptických záchvatů (Bax et al., 2005; Novak et al., 2012). Mozková obrna se vyskytuje u 2–2,5 z 1000 narozených dětí. 34 % až 64 % dětí s mozkovou obrnou má snížený inteligenční kvocient ( $IQ < 70$ ) (Novak et al., 2012). Poškození mozku je neprogresivní, ale klinické projevy se mění časem v závislosti na růstu a vývoji dítěte (Aisen et al., 2011).

Klasifikace MO je velmi složitá z důvodu heterogenity projevů, etiologie, funkčních omezení, přítomnosti komorbidit a potřeby asistence. Klinické projevy MO jsou obrazem poškozené mozkové struktury, liší se u postižení bílé kůry mozkové, šedé kůry mozkové nebo jejich kombinací (Aisen et al., 2011). Po HI inzultu je možný vývoj všech typů MO (Lindström et al., 2010).

Nálezky poškozování na magnetické rezonanci jsou různorodé. Kvalitativní studie naznačují, že spastický typ MO je především následkem periventrikulární leukomalacie a dysknetický typ je spojen s poškozováním bazálních ganglií a thalamu (Bax et al., 2005). Mozková obrna je diagnostikována pouze 10 % dětí s periventrikulární leukomalacií (Hüppi and Gressens, 2015). Ballester-Plané (2016), který se zabýval výškou IQ u dětí s dysknetickou formou MO uvádí, že hodnota IQ odpovídá objemu bazálních ganglií a thalamu. Dále byly sledovány změny v zóně fronto-striálních spojů, v oblasti bílé hmoty fasciculus longitudinalis superior, corona radiata superior a retrolentrikulární části capsula interna.

Příznaky mozkové obrny závisí na typu poškozování, ovlivněn je svalový tonus, hrubá a jemná motorika, stabilita, kontrola a koordinace pohybu. Dále je přítomna zvýšená výbavnost šlacho-okosticových reflexů, porucha polykání, příjmu potravy, mluvení a chudá aktivita mimických svalů. V dětském věku je viditelný opožděný motorický vývoj oproti zdravým dětem a abnormální výskyt dětských primitivních reflexů (Aisen et al., 2011).

Ve výzkumné studii ze 126 přeživších dětí, po mozkové novorozenecké encefalopatii s lézí thalamu, bazálních ganglií a mozečku, mělo 71 % MO. Tyto děti byly narozeny plně vyvinuté. V 54 % případů se jednalo o spastický typ, v 35 % případů o dystonický nebo spasticko-dystonický typ a u 11 % případů se projevovala atetóza. Pouze dvě děti měly hemiplegii a u žádného dítěte nebyla zjištěna diplegie. U dětí, které infarkt nepřežily, bylo pomocí MR zjištěno poškozování mozkového kmene. Pokud došlo k poškozování mozečku, byly následky infarktu závažnější v porovnání s dětmi s poškozováním bazálních ganglií a thalamelem (Martinez-Biarge et al., 2011).

Ve studii Lindström et al. (2010) byly testovány děti se středně těžkou formou HIE. U 30 % dětí byla diagnostikována mozková obrna, u 51 % dětí byly zjištěny kognitivní dysfunkce bez MO a pouze 19 % dětí bylo bez následků. U dětí se závažnějšími kognitivními dysfunkcemi bez MO byla diagnostikována mentální retardace, porucha pozornosti, motorické kontroly a percepce. Děti s méně závažným porušením kognitivních funkcí měly problémy s učením, pozorností, plánováním, krátkodobou pamětí, vnímáním času a s navázáním společenských vztahů.

## 2.2.2 Prognóza a diagnostika

Novorozenci jsou nejrizikovější skupinou pro výskyt ischemických cévních mozkových příhod, ale prognóza reziduálních deficitů je výrazně lepší než u dospělých jedinců. Důvodem je vyšší adaptabilita a plasticita dětského mozku (Šlapal, 2012). Stupeň zralosti plodu při porodu je nejdůležitějším prognostickým faktorem zranitelnosti. Dle Nelsona (2002) je počet úmrtí vyšší u předčasně narozených dětí, ale riziko výskytu MO je vyšší u dětí plně vyvinutých. Nezralý mozek je častěji poškozen HI inzultem v porovnání se zralým mozkem. Oproti tomu jsou následky HI inzultu u přeživších nedonošených novorozenců méně závažné. Důvodem je pomalejší mozkový metabolismus, nižší senzitivita k toxickým neurotransmiterům a větší plasticita nezralého mozku (Groenendaal a Vries, 2015; Sanches et al., 2013). Některé studie tento názor vyvracejí (Bennet et al., 2013; Kirton a Veber, 2013). Dle těchto autorů je nezralý mozek zranitelnější a klinické následky mohou být také velmi závažné. Vždy musí být bráno v potaz, že klinický a funkční projev nemusí odpovídat strukturálním nálezům (Skoff et al., 2007).

Stanovení prognózy pro jednotlivé novorozence je velmi složité, ale určité nálezy spolu s perinatální asfyxií představují vysokou pravděpodobnost neurologických deficitů.

### **Typické nálezy:**

- klinické příznaky
  - nízké Apgar skóre
  - prolongovaná nepřítomnost spontánního dýchání
  - abnormální neurologické vyšetření
- laboratorní abnormality
  - přítomnost potencionálních biomarkerů
  - ph pupeční šňůry < 7
- abnormální nález na MR
- abnormální nález na protonové spektroskopii
- abnormální nález na kraniální ultrasonografii a EEG (aEEG)

(Groenendaal a Vries, 2015; Martinez–Biarge et al., 2011; Shalak a Perlman, 2004)

Jedním z prognostických faktorů je závažnost motorického poškození a přítomnost komorbidit v podobě postižení dalších tělesných systémů (Novak et al., 2012).

Prvním důležitým krokem pro řešení následků po HI inzultu je správná a včasná diagnostika. Identifikace novorozenců s HI inzultem musí být opravdu rychlá, protože doba vhodná pro neuroprotektivní intervenci a zlepšení dlouhodobých následků (terapeutické okno) je pouze 2–6 hodin po proběhlém inzultu (Shalak a Perlman, 2004).

#### **2.2.2.1 Zobrazovací metody**

Ze zobrazovacích metod se u HIE využívá magnetická rezonance a kraniální ultrasonografie. Nálezy na magnetické rezonanci jsou popsány v kapitole 2.2.4. Poškozené mozkové struktury Magnetickou rezonancí a kraniální ultrasonografií nelze použít u nestabilních pacientů a často není zajištěno její včasné provedení (ve fázi terapeutického okna). Účinnost později zahájené neuroprotektce je snížena (Douglas–Escobar a Weiss, 2012; Shah et al., 2018).

#### **2.2.2.2 Škála dle Sarnatových**

Nejužívanější stupnicí, která hodnotí závažnost HI inzultu je škála dle Sarnatových (tabulka č. 2). Tato škála rozděluje neonatální encefalopatii dle intenzity na mírnou, středně těžkou a těžkou (Armstrong–Wells et al., 2010).

#### **2.2.2.3 Biomarkery**

V současné době neexistují žádné zavedené krevní biomarkery, které by umožnily včasný screening dětí s HIE. Prostřednictvím jasně daných biomarkerů by bylo možné zachytit jedince s HIE ihned po porodu, identifikovat poškozené oblasti a dobu poškození, objasnit patofyziologii daného inzultu, sledovat průběh onemocnění a posuzovat efekt neuroprotektivních studií. Stanovené biomarkery by pomohly klinickým pracovníkům při rozhodování, zda je pro daného novorozence vhodná hypotermie nebo jiná neuroprotektivní terapie. Tímto by bylo zabráněno vystavováním novorozenců neúčinným terapiím a bylo by možné včasné zahájení hypotermické či farmakologické léčby (Douglas–Escobar a Weiss; 2012). Na základě dostupných studií jsou za potencionální biomarkery po poškození mozku považovány určité složky plazmy (množství neurofilament) (Shah et al., 2018), mozkomíšního moku, plodové vody, krve, slin a moči (Douglas–Escobar a Weiss; 2012).

Tabulka 2: Klasifikace hypoxicko ischemické encefalopatie dle Sarnatových

	<b>Stupeň 1 – mírná HIE</b>	<b>Stupeň 2 – středně těžká HIE</b>	<b>Stupeň 3 – těžká HIE</b>
<b>Otok mozku</b>	Mírný	Lehký s ireverzibilním poškozením některých neuronů	Těžký s ireverzibilním poškozením neuronů s jejich zánikem
<b>Svalový tonus</b>	Normotonie / hypertonie	Hypotonie	Hypotonie až atonie
<b>Vědomí</b>	Dráždivý stav, neklid	Apatie, letargie	Koma
<b>Sací reflex</b>	Lehce oslabený	Slabě výbavný	Nepřítomný
<b>Šlachookosticové reflexy</b>	Zvýšená výbavnost	Zvýšená výbavnost	Nevýbavné
<b>Moro reflex</b>	Silný	Nekompletní	Nepřítomný
<b>Dýchání</b>	Pravidelné	Apnoické pauzy	Selhání dýchání
<b>Srdeční frekvence</b>	Normální/tachykardie	Bradykardie	Bradykardie
<b>Myoklonus</b>	Ano	Ano	Ne
<b>Křeče</b>	Ne	Ano	Záchvaty křečí
<b>Oči</b>	Mydriáza	Mióza	Proměnlivé, nepravidelné
<b>Vyšetření (USG, EEG)</b>	Bez nálezu	Mírná patologie, změny základní aktivity	USG – edém s těžkou patologií, EEG – křeče nebo nízká až nulová bazální aktivita
	Úprava do 48 hodin, bez trvalých následků, vhodné sledování na JIP	Patologické pohyby, úprava 1–2 týdny, trvalé následky 15–30 % dětí, vhodné sledování na JIP	Orgánové selhání, metabolický rozvrat až mozková smrt, 50 % novorozenců zemře, 50 % má trvalé neurologické následky

(Janota a Straňák, 2013; Groenendaal a Vries, 2015)

#### 2.2.2.4 Apgar skóre

Dodnes používané Apgar skóre bylo navrženo Virginii Apgar v roce 1952 (Casey et al., 2001). Skóre dle Apgarové popisuje stav novorozence krátce po porodu (Casey et al., 2001; Natarajan et al., 2013). Toto skóre hodnotí pět znaků: srdeční frekvenci, dýchání, svalový tonus, reakci na podráždění a barvu. Hodnotící systém je uveden v tabulce č. 3. Celkové skóre je rovno součtu bodů z jednotlivých kritérií.

Pokud je hodnota součtu vyšší než 7, je dítě považováno za zdravé. Hodnocení je provedeno v 1. a 5. minutě po porodu. Skóre v 5. minutě je považováno za lepší prediktor pro přežití (Casey et al., 2001). Riziko špatného vývoje se zvyšuje, pokud je nízké Apgar skóre zjištěno v 10. minutě po porodu a později (Natarajan et al., 2013).

Apgar skóre je celosvětově používáno jako ukazatel vitality dítěte bezprostředně po narození, ale jeho hodnota jako prediktor pozdějších postižení je diskutována (Moster, Lie a Markestad, 2002). Tato škála není původně určena pro hodnocení neurologického vývoje ani k identifikaci perinatální asfyxie (Casey et al., 2001). Apgar skóre může být ovlivněno vrozenými abnormalitami, perinatálními infekcemi nebo užíváním sedativ matkou (Casey et al., 2001; Moster, Lie a Markestad, 2002). V některých studiích je prokázána korelace mezi nízkým Apgar skóre v 5. Minutě a smrtí nebo mozkovou obrnou, ale korelace s budoucím neurologickým vývojem je velmi nízká (Casey et al., 2001; Natarajan et al., 2013). Korelace mezi Apgar skóre v 10. minutě po porodu a neurologickým vývojem je vyšší (Natarajan et al., 2013).

Tabulka 3: Apgar skóre

<b>Kritérium</b>	<b>2 body</b>	<b>1 bod</b>	<b>0 bodů</b>
<b>Appearance</b> (Vzhled, barva kůže)	Růžová	Akrocyanóza	Bledá nebo modrá
<b>Pulse</b> (akce srdeční)	Nad 100/min	Pod 100/min	Pod 60/min
<b>Grimace</b> (reakce na podráždění)	Kašel, kýčání	Bradypnoe	Apnoe
<b>Activity</b> (tonus, spontánní aktivita)	Aktivní pohyby	Slabá flexe končetin	Bez pohybu
<b>Respiration</b> (dýchání)	Silný pláč	Pomalé, mělké a nepravidelné dýchání	Nedýchá

(Muntau, 2009)

### 2.2.3 Terapeutické možnosti

Dnes neexistuje žádná farmakologická ani terapeutická léčba, která by dokázala plně upravit stav po perinatální hypoxii. Péče o novorozence po HI inzultu zahrnuje zejména podpůrnou terapii a symptomatickou léčbu komplikací. Farmakologická i nefarmakologická léčba by měla být zahájena v době terapeutického okna (2–6 hodin po inzultu) (Sukhanova et al., 2016).

Podpůrná péče se zaměřuje na udržení adekvátní ventilace, zabránění hypoglykémie, hyperglykémie, hypotenze a na léčbu záchvatů (Shalak a Perlman, 2004).

#### 2.2.3.1 Neuroprotektivní léčba – hypotermie a farmakologie

Cílem léčby v akutním stádiu je:

- snížení metabolismu mozku,
- snížení tvorby volných toxických radikálů,
- snížení peroxidace buněčných membrán,
- inhibice influxu kalcia do nervových buněk,
- zvýšení eliminace akumulovaných neurotransmiterů,
- zvýšení počtu přeživších neuronů v bazálních gangliích,
- potlačení aktivace kaspáz,
- zánětlivých cytokinů,
- minimalizace otoku mozku (Cerio et al., 2013; Vázquez–Borsetti et al., 2019).

Hypotermie je považována za nejúčinnější metodu pro snižování následku HI inzultu a stala se standardem léčby po perinatálním poškození mozku. V experimentálních zvířecích i humánních studiích bylo prokázáno pozitivní ovlivnění klinického nálezu a EEG záznamu po aplikaci hypotermie (Higgins et al., 2011; Vázquez–Borsetti et al., 2019).

Účinek hypotermie závisí na době expozice a na výsledné teplotě. Terapeutická hypotermie má pozitivní efekt, pouze pokud je aplikována v prvních hodinách po porodu (Vázquez–Borsetti et al., 2019). V dostupných studiích na humánních novorozencích (Jacobs et al., 2011; Simbruner et al., 2010; Zhou et al., 2010) byla hypotermie aplikována do šesti hodin po hypoxicko–ischemickém poranění, doba aplikace byla 12–72 hodin. Teplota mozku byla snížena na 32–34 °C.



Výsledkem tohoto zásahu bylo snížení sekundárního energetického vyčerpání, buněčné smrti a zlepšení funkčního stavu jedince. Používají se dva typy hypotermie: celotělová hypotermie (Jacobs et al., 2011) a pouze hlavu chladící hypotermie (coolcap) (Zhou et al., 2010). Po celou dobu hypotermie je tělesná teplota jedince monitorována. Účinnost hypotermie byla prokázána u lehkých, středně těžkých i závažných HI inzultů (Simbruner et al., 2010).

Další možností léčby je vyvolání hyperkapnie. V experimentální studii na zvířecích modelech bylo prokázáno, že hyperkapnie redukuje poškození plic a zvyšuje proudění krve mozkem (Vannucci et al., 2001).

Využití a účinnost neuroprotektivních farmak je velmi diskutabilní. Neuroprotektivní farmaka by měla být podána ihned po inzultu a zahrnují například: melatonin, allopurinol a síran hořečnatý. Po reperfuzi a ve fázi sekundárního energetického selhání by měly být podávány kanaboidy, erythropoetin, kmenové buňky, melatonin nebo N-acetylcystein. Tyto léky mají protizánětlivý a anti-apoptický efekt (Cerio et al., 2013). Dále jsou ve studiích zkoumány účinky inhibitorů volných kyslíkových radikálů, inhibitory uvolňování glutamátu, inhibitory tvorby oxidu dusnatého, blokátory vápenatých kanálů a další (Shalak a Perlman, 2004).

### **2.2.3.2 Fyzioterapeutické přístupy**

Do péče fyzioterapeutů se často dostávají pacienti, u kterých se následkem HIE rozvinula mozková obrna. Pacienti s mozkovou obrnou vyžadují péči multidisciplinárního týmu (Aisen et al., 2011). Jak bylo uvedeno výše v textu, studovaná populace je velmi rozmanitá. Terapie musí být vždy přizpůsobena typu léze, věku, kognitivním a smyslovým schopnostem pacienta (Basu et al., 2015). Cílem rehabilitace je zlepšení kvality života pacienta, dosažení nejvyššího možného stupně samostatnosti a začlenění do společnosti (Aisen et al., 2011).

Byla vyvinuta řada fyzioterapeutických přístupů zaměřených na zlepšení hybnosti a funkčnosti dítěte s mozkovou obrnou. Většina přístupů je založena na principech motorického učení a neuroplasticity. Využitím daných rehabilitačních postupů se snažíme o obnovení funkce pomocí cílených proprioreceptivních, exteroceptivních, akustických či vizuálních stimulů (Kolář et al., 2009).

Prostřednictvím experimentálních studií na zvířatech bylo zjištěno, že obohacené prostředí (enrich–environment) zlepšuje behaviorální chování, kognitivní funkce, zvětšuje neuronální projekci a zvyšuje počet dendritů (Rocha–Ferreira a Hristova, 2016).

U pacientů s MO je využívána celá řada technik, ale žádná není označena za nejlepší. Nejpoužívanější je Vojtova reflexní lokomoce a Bobath koncept. Neustále probíhá výzkum nových metod, přístupů a technologií, které podporují zapojení dětí do různorodých aktivit v různém prostředí. Z novějších technologií je možné zmínit dynamické ortézy. Pojem dynamická ortéza je označení pro různé druhy terapeutických oblečků například Therasuit, Adelisuit nebo TheraTogs. Metoda Therasuit využívá speciální obleček, který pomáhá v nastavení a udržení jednotlivých částí těla a kloubů do optimálních a přesných pozic. Tyto oblečky umožňují terapii ve vertikální poloze, čímž je ovlivněna vestibulo–proprioceptivní aferentace. Vestibulární systém vyhodnocuje vzruchy ze svalů, kloubů a šlach a na základě zpětnovazebního systému ovlivňuje svalové napětí a držení těla v prostoru. Terapeutické oblečky jsou v pediatrické rehabilitaci velice populární. Z rešeršních studií z roku 2016 a 2017 vyplývá, že dostupné vědecké studie jsou nedokonalé a jejich výsledky sporné. Účinnost dynamických ortéz není prozatím adekvátně vědecky podložena (Almeida et al., 2017; Martins et al., 2016).

Basu et al. (2015) v přehledu možných přístupů zaměřených na horní končetiny u pacientů s mozkovou obrnou uvádí využití mirror therapy, CIMT (metoda nuceného používání postižené horní končetiny), bimanuální terapii, možnost ortézování, dlahování a elastického tejpování. Účinky těchto metod u novorozenců a malých dětí jsou neustále předmětem výzkumů. Mezi další vhodné intervence u dětí s MO samozřejmě patří protahování zkrácených a spastických svalů a posilování oslabených svalů. Dále může být zařazena hydroterapie, muzikoterapie, hipoterapie, postupy zaměřené na orální oblast či chůzi na treadmillu (Novak et al., 2013). Detailní popisy uvedených metod jsou nad rámec této práce.

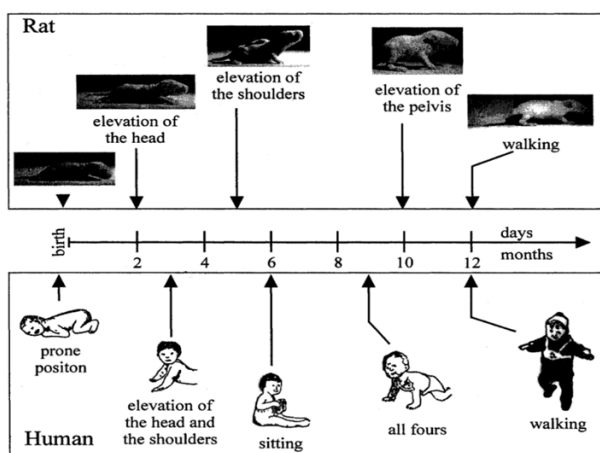
## 2.3 Experimentální testování

Experimentální přístup je důležitý pro rozvoj metod prevence, včasné diagnostiky a strategie pro korekci následků těchto poruch (Sukhanova et al., 2016; Levine, 1960). Nejčastěji používaná experimentální zvířata jsou laboratorní potkani. Potkan je z pohledu anatomie, farmakologie a fyziologie jedním z nejlépe prostudovaných savců (Clarac et al., 1998). Analýza fyziologických a patofyziologických parametrů u mladých potkanů významně přispívá k porozumění vrozených a získaných chorob humánních novorozenců (Calamandrei, 2004).

### 2.3.1 Ontogeneze potkana

Na první pohled se vývoj potkana a člověka jeví zcela odlišně. Za největší rozdíl je považována doba trvání prenatálního a postnatálního vývoje (Vinay et al., 2005). Těhotenství a prenatální vývoj u humánní populace trvá 40 týdnů (280 dní), dospělosti jedinec dosahuje ve 20 letech. U potkanů prenatální období trvá pouze 3 týdny (21–22 dní) a postnatální zrání lokomotorických funkcí probíhá další 3 týdny. Poté je potkan označován za dospělého (Altman & Sudarshan, 1975; Clarac et al., 1998).

Společným rysem je nezralost centrální nervové soustavy a nedokončený motorický vývoj humánního novorozence i potkana při porodu. Tento nedokončený vývoj může být pozorován na senzomotorických funkcích, posturální kontrole a chudém pohybovém projevu novorozence (Jamon, 2006). Jeden den vývoje motorických a posturálních dovedností v postnatálním období potkana koresponduje s jedním měsícem vývoje člověka (obr. 5).



Obrázek 5: Schématické srovnání motorického vývoje potkana a člověka (Vinay et al., 2005)

Předpokladem pro efektivní lokomoci po zemském povrchu je dobře vyvinutá nervová soustava, muskuloskeletální systém a posturální kontrola (Jamon, 2006). Zvíře musí být schopno provádět lokomotorické pohyby končetinami (střídání flexe a extenze na kontralaterálních končetinách), změny pohybových vzorců (přizpůsobit se charakteru terénu, změnit směr chůze) a udržení stabilní postury (Muir, 2000). Dynamická komponenta pohybu je vyvinuta již při porodu (Vinay et al., 2005). Funkce tonické složky se vyvíjí v prvním postnatálním týdnu. Nedostatečně vyvinutá posturální kontrola se stává limitujícím faktorem lokomoce (Clarac et al., 1998; Geisler et al., 1993; Jamon, 2006; Vinay et al., 2005).

V období po narození zajišťuje CNS motorické projevy v podobě střídavých rytmických pohybů, které podléhají řízení na míšní úrovni = central pattern generators (vysvětleno níže). Potkan je schopen pohybu s vyloučením gravitace. Příkladem je plavání (Clarac et al., 1998; Geisler et al., 1993; Muir, 2000).

V 8.–10. postnatálním dni se potkan dokáže postavit na všechny čtyři končetiny. Od tohoto období dochází k výraznému zrání zadních končetin. Zrak potkana ještě není vyvinutý. Slepý potkan není schopen izolovaných pohybů hlavy vůči páteři (Clarac et al., 1998). Dle Geislera et al. (1993) se již v tomto období objevují náznaky nezralé lokomoce – hlava směřuje dolů a nos je v kontaktu s podložkou. Během lokomoce jsou zadní končetiny v abdukcii a zevní rotaci. Takovéto postavení končetin znázorňuje nedostatečnou aktivitu posturálních svalů. Během švihové fáze zůstávají prsty zadních končetin v kontaktu s podložkou. Zvíře je schopno stoje na zadních končetinách s oporou o stěnu (Geisler et al., 1993). Jamon a Clarac (1998) uvádějí, že pokud je potkan obklopován silnými čichovými a vysoce motivačními stimuly, je schopen primitivní chůze již 3.–4. den po narození. Autoři se shodují na tom, že spontánní aktivita mláďat nereflektuje kapacitu jejich potenciálních možností.

12.–13. postnatální den zvíře začíná vidět, jeho oči jsou otevřené (Clarac et al., 1998). Od poloviny druhého týdne je potkan schopen pomalé chůze s nedostatečnou kontrolou trupu. Páteř je konkávní a při chůzi se pohupuje ze strany na stranu (Geisler et al., 1993). Chůze je pomalá, nejistá, doprovázená třesem. Kroky jsou krátké a nepravidelné (Vinay et al., 2005; Clarac et al., 1998). Zde opět vidíme korelaci s humánním vývojem, kdy je dítě schopno chůze ve 12. měsících (Vinay et al., 2005). Od 15. dne jsou pohyby výrazně plynulejší a efektivnější.

Dochází k výraznému vývoji posturálních svalů, zejména stabilizátorů páteře (m. longissimus, mm. multifidy). Rychlost chůze je vyšší a krok potkana je delší. Zvíře je schopno cvalu.

### 2.3.1.1 Vývoj senzorického systému

Potkan se rodí hluchý a slepý. Ostatní senzorické systémy jsou nevyzrálé (Clarac et al., 1998).

Čichové funkce se rozvíjí již v prenatalním období, ale při porodu nejsou plně vyvinuty. Mláďata nejsou schopna rozlišit jemné odchylky mezi jednotlivými pachy (Clarac et al., 1998). Časný rozvoj čichu má velký vliv na neurobehaviorální vývoj potkana. Zápachy, které potkan vnímá během raného vývoje, se uchovávají v paměti do dospělosti ovlivňují sociální, sexuální a později rodičovské chování. V prvním týdnu života je vyvinuta silná preference zápachů souvisejících s hnízdem. Tato preference vytváří trvalé fyziologické a neuroanatomické změny v glomerulární vrstvě olfaktorických bulbů. Vyjmutí potkana z mateřského prostředí může významně narušit vývoj a chování dospělého potkana (Calamandrei, 2004). Zrak se plně zapojuje do funkce při otevření očních štěrbin ve 12.–13. postnatálním dni, ve stejné době dochází k vývoji lokomoce (Clarac et al., 1998; Muir, 2000).

Vestibulární aparát se vyvíjí v prenatalním období a od 1. postnatálního dne začíná plnit svoji funkci. Ve 2.–3. postnatálním týdnu dosahují vláskové buňky absolutní zralosti (Muir, 2000). Správná funkce vestibulárního aparátu je důležitá pro motorické chování jedince. Pokud jsou vestibulární funkce porušeny, objevují se deficity v oblasti motorického vývoje. Výsledkem je porucha rovnovážných a posturálních funkcí, které slouží k udržení stabilního trupu během pohybu. Bilaterální poškození vestibulárního aparátu je příčinou oscilace hlavy při pohybu (Clarac et al., 1998).

Vyvolání monosynaptických napínavých reflexů je možné již v prenatalním období. Množství svalových vřetének se zvyšuje postnatálně. Postupnou myelinizací nervové soustavy se zvyšuje vodivost v axonech a snižuje se latence výbavnosti reflexů (Clarac et al., 1998). Snižování latence probíhá do 12. postnatálního dne. V tomto období končí vývoj svalových vřetének (Jamon, 2006).

### 2.3.1.2 Vývoj nervové soustavy

Vývoj nervové soustavy u člověka je postupný a dlouhodobý, tím se významně liší od myši a potkanů. U potkana dochází k nejdůležitější fázi zrání nervové soustavy během prvních postnatálních dní (Clarac et al., 1998; Vinay et al., 2005; Sukhanova et al., 2016). Schéma (obr. 5), které porovnává postnatální motorický vývoj potkana a člověka, není platné pro rozvoj centrální nervové soustavy (Vinay et al., 2005). Porovnání zralosti centrální nervové soustavy v určitém vývojovém stádiu potkana a člověka je uvedeno v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Porovnání zralosti CNS v určitém vývojovém stádiu potkana a člověka

Potkan	Člověk
1. postnatální den	20. týden těhotenství
3. postnatální den	24.–28. týden těhotenství (4. stupeň předčasného narození)
7. postnatální den	30.–34. týden těhotenství (1.–2. stupeň nezralosti)
12.–14. postnatální den	novorozence (38.–40. týden)
21.–22. postnatální den	10.–12. Měsíc
35.–40. postnatální den	10.–14. rok (pubertální období)
54.–60. postnatální den	16.–18. rok

(Sukhanova et al., 2016)

Procesy proliferace a migrace neuronů v míše a v mozkovém kmeni probíhají u člověka od 5. do 30. týdne prenatalního vývoje. Proces synaptogeneze je zahájen během prvního měsíce těhotenství a pokračuje do adolescence. Myelinizace začíná uprostřed těhotenství a pokračuje také do začátku adolescence. U potkanů probíhá proliferace a migrace mezi 11. a 16. týdnem těhotenství. U potkanů je synaptogeneze zahájena v posledním týdnu těhotenství a dokončena během prvních tří týdnů postnatálního života. Myelinizace u potkanů začíná v prvních postnatálních dnech a trvá jeden měsíc. Mezi 10.–14. dnem života potkana je počet myelinizovaných vláken v CNS stejný jako u humánního novorozence narozeného v termínu (Sukhanova et al., 2016).

Jak bylo uvedeno výše, nedokonalá supraspinální kontrola je přítomna již od narození a ovlivňuje takzvané central pattern generators (CPG), produkované míšními okruhy (Muir, 2000). CPG jsou tvořeny dvěma laterálními hemi–neurálními sítěmi, které prostřednictvím glutaminergních synapsí aktivují motoneurony agonistů a inhibují motoneurony ipsilaterálních antagonistů. Současně pomocí glycinergních komisurálních interneuronů inhibují aktivitu kontralaterálních agonistů (Jamon, 2006). Tyto vzorce podléhají kontrole postupně se vyvíjejících vyšších řídicích center a také informacím přinesených afferenty z periferních receptorů. Supraspinální řízení a informace z periferních receptorů jsou důležité pro koordinovaný pohyb předních a zadních končetin, pro schopnost náhlé změny směru a přizpůsobení se okolnímu terénu (Muir, 2000).

Sestupné motorické dráhy, které zajišťují supraspinální kontrolu, se začínají formovat během posledního týdne prenatálního vývoje. V prenatálním období (E15–E18) se vyvíjí dráha retikulospinální, vestibulospinální a intersticio–spinální. Tyto dráhy dozrávají během raného postnatálního období (Clarac et al., 1998). Kortikospinální dráha dozrává jako poslední. Ke krční a hrudní míše dosahuje v 3. postnatálním dni, k bederní páteři až v 6. postnatálním dni (Clarac et al., 1998). Její vývoj pokračuje do 15. postnatálního dne (Muir, 2000). Na základě postupného formování kortikospinální dráhy se rozvíjí hybnost a posturální adaptace novorozenců proximodistálním směrem (Clarac et al., 1998; Vinay et al., 2005).

Ke správnému motorickému vývoji jsou nezbytné monoaminergní systémy. K udržení správné postury a rozvoji fyziologické lokomoce je důležitý serotoninergní systém (Vinay et al., 2005). Ihned po porodu bylo nalezeno pouze několik terminálních serotoninergních zakončení v motoneuronech antigravitačních svalů. Během 1. postnatálního týdne se množství přítomných zakončení zvýšilo (Vinay et al., 2005; Tanaka, Mori a Kimura, 1992).

Čerstvě po narození je přítomno pouze malé množství motoneuronů s velmi krátkými dendrity. Těla neuronů jsou ve srovnání s motoneurony dospělých jedinců malá. Během 1.–2. postnatálního týdne se průměrná velikost motoneuronů zvětšuje a dochází k výraznému větvení dendritů (Tanaka, Mori a Kimura, 1992). Délka dendritů je v přímé korelaci s rozvojem samostatné lokomoce (Muir, 2000).

V prenatálním a časném postnatálním vývoji je jedno svalové vlákno inervováno z více motoneuronů, což znamená, že motorické jednotky jsou heterogenní. Podmínkou pro cílené pohyby a lokomoci je přeměna z heterogenní inervace jednoho svalového vlákna na zásobení pouze jedním motoneuronem. Tato přeměna probíhá v 1.–2. postnatálním týdnu s vývojem lokomotorického systému (Muir, 2000).

### 2.3.2 Experimentální vyvolání perinatální hypoxie

Pro perinatální HI inzult je nejčastěji používaný model uvedený ve studii Rice et al. (1981), vycházející z modelu dle Levine (1960), který se zabýval poškozením bílé a šedé hmoty mozkové po HI inzultu u dospělých potkanů. Rice et al. (1981) a později Vannucci a Vannucci (1997) provedli testování na sedmidenních potkanech. Výběr sedmidenních mláďat je odůvodněn tím, že takto staří potkani mají stejně vyvinutou centrální nervovou soustavu (stejný počet synapsí, kortikální organizaci, neurochemický vývoj) jako plod člověka ve 3. trimestru (32.–34. týdnů gestace). V tomto období dochází k zániku zárodečné matrix, postupné myelinizaci bílé hmoty a k dokončení rozvrstvení kůry mozkové. Tento model je aplikovatelný i na jiná vývojová stadia potkana (Vannucci a Vannucci, 1997). Sanches et al. (2013) a Huang et al. (2009) provedli hypoxickou–ischémii dle Levine (1960) na třídenních mláďatech. Model třídenních mláďat odpovídá vysoce nezralým novorozencům narozených mezi 23.–32. týdnem gestace s vysokým stupněm nezralosti (Sukhanova et al., 2016).

Dle Levine (1960) a Rice et al. (1981) je potkanům provedena jednostranná ligace arterie carotis communis s následnou systematickou hypoxií 8% kyslíkem a 92% dusíkem ve vzduchotěsném prostoru při konstantní teplotě 37 °C. Tento postup je nejrozšířenější, ve své studii ho použil například Huang, Wen a Liu (2015), Alexander et al. (2014); Sanches et al. (2013) a Jansen a Low (1996). Pro poškození potkanů v rámci našeho experimentu byla také použita tato metoda.

Další možností vyvolání HI inzultu je bilaterální ligace arterie carotis communis, použita například ve studii Zhang et al. (2013). Zhang et al. (2013) uvádí, že samotná deprivace kyslíku je dostatečná k tomu, aby způsobila stejné poškození mozku jako postup dle Rice et al. (1981). Při poškození tímto způsobem není proveden žádný invazivní chirurgický zákrok. Úmrtnost zvířat je snížena a během zákroku jsou zvířata vystavena minimálnímu stresu. Tento model slouží k testování akutní i chronické hypoxie.



Pro vyvolání chronické hypoxie jsou potkani dušeni opakovaně (Sukhanova et al., 2016). V experimentálních studiích se dále objevuje provedení císařského řezu během posledního dne březosti a vyjmutí dělohy s nenarozenými potkany z těla matky. Hypoxie mláďat je následně provedena ponořením dělohy s mláďaty do vodní lázně o teplotě 37 °C. Po takto vyvolané hypoxii jsou rohy rozříznuty, potkani jsou vyjmuti a stimulováni k dýchání (Vázquez–Borsetti et al., 2019).

## **3 Experimentální část**

### **3.1 Cíl práce**

Cílem práce je sestavit sadu behaviorálních testů, které zajistí efektivní zhodnocení motorických a kognitivně–behaviorálních schopností u dospělých zvířat po experimentálně vyvolaném hypoxicko–ischemické inzultu v perinatálním období (P7).

Předpokládaným přínosem této práce je etablovat model motorických a kognitivně–behaviorálních deficitů po prodělané perinatální hypoxicko–ischemické atace.

### **3.2 Hypotézy**

H01: Na základě výsledků dostupných dlouhodobých studií na humánních i zvířecích probandech se motorické chování dospělých zvířat s experimentálně vyvolaným perinatálním hypoxicko–ischemickým inzultem nebude výrazně lišit ve své kvalitě v porovnání s kontrolní skupinou.

H02: Z důvodu přednostního zasažení hipokampu (CA<sub>1</sub> oblast) po hypoxicko–ischemickém inzultu bude u experimentální skupiny narušena prostorová paměť, kognitivní funkce a zpomalena schopnost učení.

H03: U experimentálních zvířat budou výrazné behaviorální změny ve smyslu zvýšené anxiety a hyperaktivity oproti kontrolní skupině.

## 3.3 Metodika práce

### 3.3.1 Charakter výzkumu

Charakter výzkumu byl experimentální. Celý experiment a péče o zvířata byly provedeny dle zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání a dle vyhlášky č. 419/2012 o ochraně pokusných zvířat. Experimentální protokol byl schválen odbornou komisí Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (AV ČR) (příloha č. 1).

### 3.3.2 Výzkumný soubor

Výzkumný soubor tvořili potkani kmene Long Evans z chovu Fyziologického ústavu AV ČR ( $n = 32$ ). Z důvodu vlivu hormonálních změn byli do studie zahrnuti pouze samci. Potkani byli náhodně rozděleni na skupinu experimentální ( $n = 17$ ) a skupinu kontrolní (sham-operated) ( $n = 15$ ). Všechna sedmidenní mláďata podstoupila operační zákrok, ve kterém bylo provedeno uzavření pravé arterie carotis communis. U experimentální skupiny byla následně vyvolána systémová hypoxie umístěním mláďat do uzavřené skleněné nádoby. Do nádoby byl po dobu 90 minut povolna pouštěn 8% kyslík s 92% dusíkem. Behaviorální testy byly provedeny u dospělých potkanů (staří 55–75 dnů). Váha potkanů se pohybovala mezi 200–356 g.

### 3.3.3 Použité metody a sběr dat

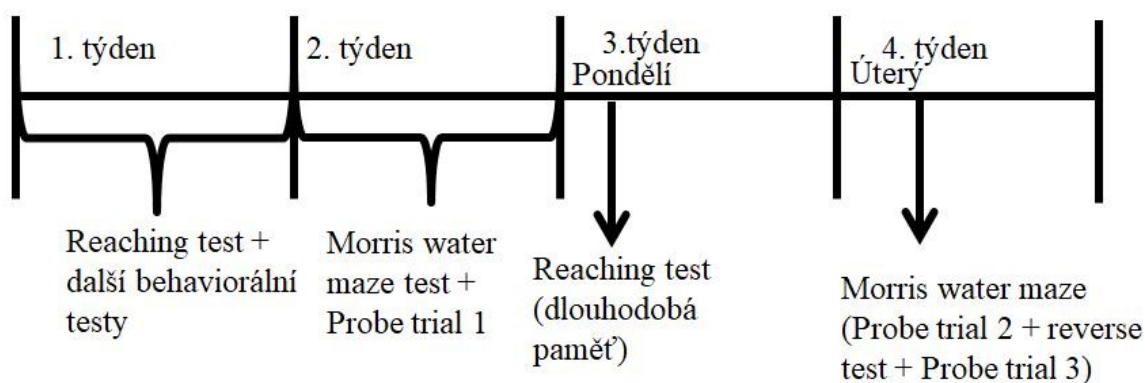
Data byla získána formou experimentu, ve kterém byla porovnávána experimentální (HIE) a kontrolní (Ctrl) skupina.

Pro zhodnocení následků HI inzultu byla zvolena baterie behaviorálních testů, které jsou standardně používány v laboratoři vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR (Mikulecká et al., 2014; Brima, Mikulecká a Otáhal, 2013). Vybrány byly tyto testy: Bar holding test, Rotarod test, Ladder rung walking test, Reaching test, Open field test a Morris water maze test.

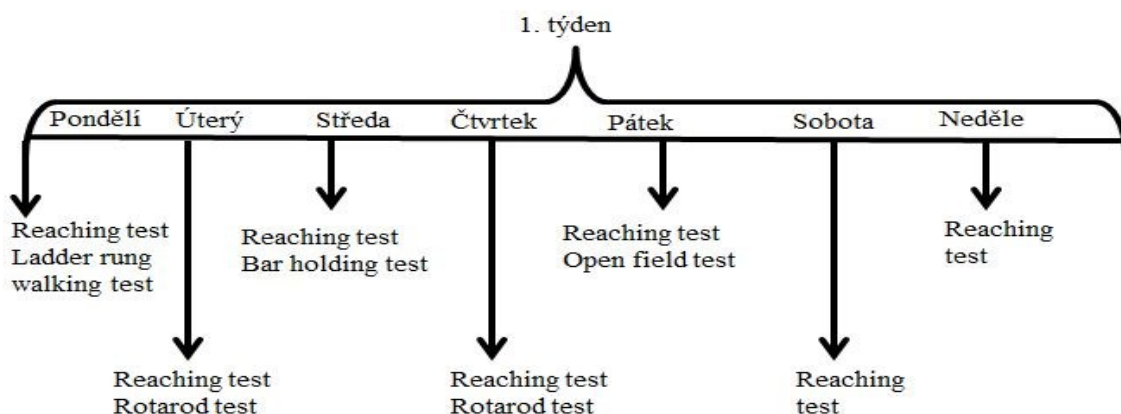
Testování bylo rozvrženo do čtyř týdnů (obr. 6). 1. týden byla zvířata testována v Reaching testu. V prvních pěti dnech po provedení Reaching testu, byla zvířata testována v jednom z dalších behaviorálních testů (obr. 7). 2. týden byla zvířata testována v Morris water maze testu. Na konci tohoto týdne byl proveden Probe trial 1 (plavba bez platformy).

Následující týden byla zvířata opět testována v Reaching testu pro zjištění dlouhodobé paměti. Na začátku 4. týdne byl v Morris water maze testu proveden Probe trial 2, pro zjištění dlouhodobé prostorové paměti. Ten samý den byla testována schopnost reverzního učení s platformou umístěnou v jiném kvadrantu. Poté byl proveden Probe trial 3.

Behaviorální testování probíhalo vždy mezi 9:00–15:00 hod. Testy byly provedeny ve speciální místnosti s konstantní teplotou ( $22 \pm 2$  °C) a osvětlením (35–45 lx). Zvířata byla před zahájením experimentu zvážena a označena čísly, která jim byla napsána fixem na ocas. Každý den byla zvířata, z důvodu adaptace na nové prostředí, umístěna do laboratoře 30 minut před zahájením experimentu.



Obrázek 6: Časová osa celého experimentu



Obrázek 7: Časová osa 1. týdne experimentu

### 3.3.4 Zpracování a statistické vyhodnocení dat

K analýze dat, statistickému vyhodnocení a tvorbě grafů byl použit program Sigma Plot a Microsoft Excel 2013. Data získaná z Ladder rung testu, Bar holding testu, Rotarod test a Open Field testu nespĺňovala požadavky parametrické statistiky (nebylo zachováno normální rozložení dat). Ke statistickému porovnání skupin byl použit neparametrický Mann–Whitney Rank Sum Test. K porovnání rozdílu mezi 1. a 2. pokusem u Rotarod testu byl také použit neparametrický Mann–Whitney Rank Sum Test. Data z Reaching testu a z Probe Trial plaveb z Morris Water maze testu byla statisticky vyhodnocena pomocí Anova testu (Kruskal–Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks). K porovnání výsledků z reverzního testování v Morris water maze testu byl opět použit Mann–Whitney Rank Sum Test. Hodnota statistické signifikance byla stanovena na  $p = 0,05$ .

Ve sloupcových i spojnicových grafech jsou zobrazeny průměrně hodnoty a standartní chyby průměru (SEM). Popisy grafů jsou psány anglickým jazykem z důvodu předpokládané publikace výsledků práce v mezinárodním vědeckém časopise.

### 3.3.5 Experimentální vyvolání hypoxicko–ischemického inzultu

Použitá metoda pro vyvolání HI inzultu vychází z modelu dle Levine (1960), Vannucci a Vannucci (1997) a Rice et al. (1981), s určitými modifikacemi.

Klec s mládřaty a matkou byla umístěna do laboratorní místnosti. Po 30 minutách byla všechna mládřata od matky separována do průhledného boxu z plexiskla. Boxy byly z důvodu nedostatečné termoregulace mládřat zahřívány prostřednictvím termoregulačních podložek (obr. 8). Tělesná teplota zvířat byla udržována na konstantní teplotě (37 °C). Před začátkem operace byla mládřata zvážena. Následně podstoupila anestezii pomocí inhalace isofluranu, která probíhala po celou dobu operace. Účinek anestezie byl zesílen nitrožilní aplikací mezokainu. Na ventrální straně krku byl proveden longitudinální řez, následovalo odpreparování pravé arterie carotis communis. Tato arterie byla poté prostřednictvím elektrokoagulace uzavřena. Operační rána byla externě sešita. Na dorzální stranu trupu (mezi lopatky) byl experimentálním zvířatům aplikován čip, který později sloužil k evidenci zvířat. Po probuzení z anestezie byla zvířata na hodinu navracena zpět do mateřské klece. Matka je nakrmila a očistila. Následně byla všechna zvířata znovu od matky separována a rozdělena na kontrolní a experimentální skupinu.

Experimentální skupina byla umístěna do uzavřeného skleněného boxu, do kterého byl po dobu 90 minut pozvolna pouštěn 8% kyslík s 92% dusíkem (obr. 9). Po celou dobu hypoxie byla pomocí termoregulačních podložek udržována konstantní tělesná teplota zvířat mezi 32–34 °C. Dle Levine je vhodná teplota 37 °C. Zde byla udržována teplota 34 °C z důvodu použitého kmene Long Evans. U tohoto kmene zvířat je pro zachování základních životních funkcí doporučována nižší teplota (Aujla et al., 2009). Kontrolní skupina byla po dobu dušení experimentální skupiny, umístěna do otevřeného skleněného boxu. Během hypoxie byly u zvířat pozorovány záchvatovité stavy s následnou ztrátou vědomí. Po proběhlém zákroku byla zvířata navrácena zpět k matce. Do zahájení testování byl jejich zdravotní stav periodicky kontrolován. Klece se zvířaty byly umístěny do místnosti s pravidelným denním režimem (12 hodin světlo/12 hodin tma), konstantní teplotou ( $22 \pm 1$  °C) a vlhkostí (50–60 %). Zvířata měla volný přístup k vodě a potravě. Od matky byli samci separováni do samostatných klecí ve stáří 28 dnů. Do každé klece byli umístěni 3–4 potkani.



Obrázek 8: Zvířata (P7) v boxu před operací



Obrázek 9: Experimentální skupina zvířat v uzavřeném skleněném boxu při hypoxii

### 3.3.6 Behaviorální testy

#### 3.3.6.1 Bar holding test

Bar holding test byl použit k testování svalové síly předních a zadních končetin i celého těla zvířete. Zvíře bylo předními končetinami přiloženo k tyči (dlouhé 25 cm, průměr 1 cm), upevněné na stole 25 cm nad boxem s pilinami (obr. 10, obr. 11). Zaznamenána byla délka výdrže na tyči (maximálně 60 s) a schopnost zvířete přitáhnout k tyči zadní končetiny.



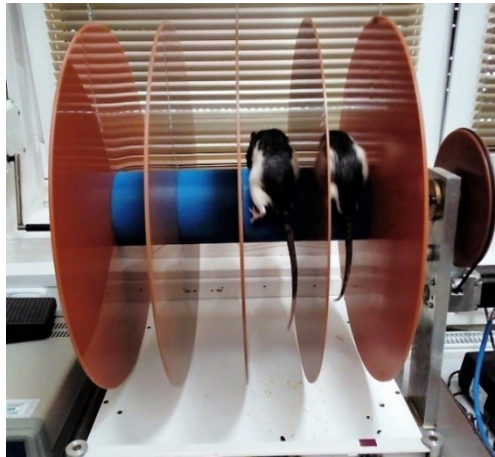
Obrázek 10: Bar holding test – nepřitažené zadní končetiny



Obrázek 11: Bar holding test – přitažené zadní končetiny

### 3.3.6.2 Rotarod test

K hodnocení motorické koordinace a rovnovážných funkcí zvířat v Rotarod testu byl použit otáčivý treadmill. Zvířata byla jednotlivě pokládána na rotující horizontální tyč (10 cm široká, 11 cm dlouhá) proti směru otáčení. Válec byl umístěný 30 cm nad platformou (obr. 12). Měřena byla doba, po kterou se zvíře udrželo na rotujícím válci. Maximální doba výdrže byla 60 s. Testování bylo provedeno při dvou rychlostech otáčení: 20 otáček za minutu (rpm) a 30 otáček za minutu (rpm). Měření bylo po dvou dnech zopakováno pro zjištění schopnosti motorického učení.



Obrázek 12: Rotarod test



### 3.3.6.3 Ladder rung walking test

Ladder rung walking test byl použit k hodnocení motorických dovedností: schopnost chůze, udržení rovnováhy, umístění končetin a koordinace mezi předními a zadními končetinami. Pro testování byl použit horizontálně položený žebřík ohraničený deskami z čistého plexiskla. Šířka průchodu byla upravena dle velikosti zvířete, aby nebylo možné otočení zvířete proti danému směru. Žebřík byl umístěn mezi dvě klece, 30 cm nad stolem (obr. 13). Klec na začátku žebříku byla prázdná. Na druhém konci žebříku byla domácí klec se sourozenci testovaného zvířete pro zvýšení motivace. Měřen byl čas, za který bylo zvíře schopno přejít žebřík s pravidelně a nepravidelně uspořádanými kovovými příčkami. Při pravidelném uspořádání byly příčky umístěny 2 cm od sebe. Při nepravidelném umístění se vzdálenost pohybovala mezi 1 až 5 cm. Druhým sledovaným parametrem byly chyby zadních končetin při přechodu žebříku. Maximální doba přechodu žebříku byla 60 s. Zvířata přecházela vždy ve stejném směru.



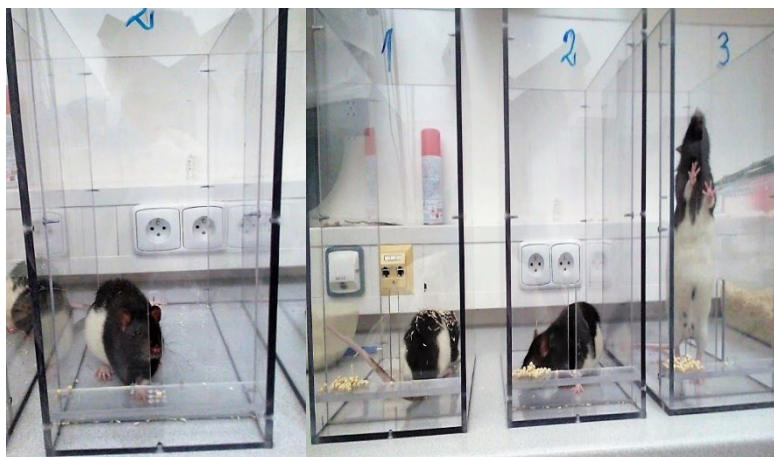
Obrázek 13: Ladder rung walking test

### 3.3.6.4 Reaching test

Prostřednictvím Reaching testu byla hodnocena schopnost učení a motorický deficit horních končetin po proběhlém HI infarktu. V tomto testu bylo využito schopnosti potkanů provádět úchop předními končetinami, který je velmi podobný úchopu primátů.

Tři dny před začátkem testování měla zvířata omezený přístup k běžné potravě, protože hladová zvířata mají vyšší motivaci pro plnění úkolu. Zvířata dostávala pouze malé množství pelet, které byly použity při testování. Seznámení s experimentálními peletami bylo provedeno z důvodu adaptace taktilních, vizuálních a olfaktorických vlastností a redukce neophobie z nové potravy. Po skončení Reaching testu dostala zvířata zpět svou běžnou potravu.

Zvířata byla umístěna do testovacího boxu (35 x 14 x 45 cm) z čistého plexiskla. Na přední stěně boxu se nacházel otvor: šířka – 10 mm, výška – 10 cm. Úkolem zvířete bylo skrz otvor dosáhnout na pult (3 cm nad zemí), kde byly umístěny pelety (obr. 14). Za úspěšný byl považován ten pokus, při kterém zvíře uchopilo peletu jednou přední končetinou, vložilo ji do úst a snědlo ji. Při neúspěšném pokusu zvíře peletu neuchopilo nebo mu peleta při vkládání do úst vypadla. Úspěšné i neúspěšné pokusy pravou i levou končetinou byly zaznamenány do protokolu. Zvířata byla do boxu vkládána každý den na 15 minut. Trénink tohoto testu probíhal celý týden (7 dní).



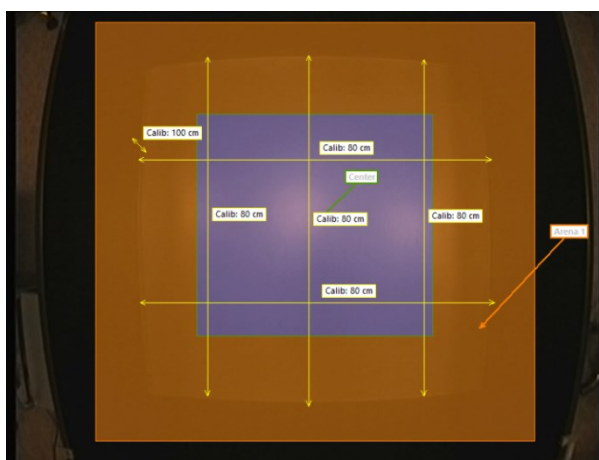
Obrázek 14: Reaching test

### 3.3.6.5 Open field test

Open field test byl použit ke zkoumání obecných lokomotorických dovedností a anxiозity zvířete. Testování bylo provedeno v černé čtvercové aréně (45 x 45 x 30 cm), s kamerou nainstalovanou nad centrem arény (obr. 15) V okamžiku umístění zvířete do arény bylo automaticky spuštěno počítačově řízené (program EthoVision Noldus Information Technology) snímání trajektorie pohybu. Trajektorie pohybu byla snímána po dobu 10 minut. Výsledkem tohoto testu byla změřená lokomoční aktivita, vyjádřena ušlou vzdáleností (v cm). Dalším sledovaným parametrem byla délka času stráveného v centru arény, latence vstupu do středu arény a frekvence vstupů do centra arény. Na obrázku 16 je zobrazena centrální a okrajová část arény. Po každém zvířeti byla aréna vyčištěna, aby se zabránilo přítomnosti čichových podnětů.



Obrázek 15: Open field test – zvíře v testovacím boxu



Obrázek 16: Open field test – centrální a okrajová část arény

### 3.3.6.6 Morris water maze

Pomocí Morris water maze testu byla hodnocena krátkodobá i dlouhodobá prostorová paměť, schopnost prostorového a reverzního učení. Morris water maze test není bludištěm v pravém slova smyslu. Pro provedení tohoto testu byl využit černý kulatý bazén (180 x 50 cm) naplněný bíle zakalenou vodou o teplotě 20–22 °C (obr. 17). Voda byla zakalená z důvodu kontrastního rozlišení testovaných zvířat. Úkolem zvířat bylo najít kruhovou platformu z plexiskla (průměr 10 cm), která byla ponořena 1,5cm pod hladinou v severo–západním kvadrantu bazénu. Na tomto místě se nacházela po celou dobu tréninku. První den byla platforma viditelná pro zjištění vizuální diskriminace a motorických dovedností. Pokud zvířata první den platformu našla, byla považována za způsobilá k provedení tohoto testu. Zrakové i motorické dovednosti všech testovaných zvířat byly dostatečné. Žádné zvíře nebylo z experimentu vyloučeno. Zvířata se učila hledat platformu pět po sobě jdoucích dní. Každý den zvíře absolvovalo osm plaveb z různých výchozích míst. Plavba byla započata umístěním zvířete do jednoho ze čtyř výchozích kvadrantů (sever (N), východ (E), jih (S), západ (W)). Rozdělení bazénu do kvadrantů a umístění platformy je zobrazeno na obrázku 18. Manuál k pětidennímu testování s výchozími místy plavby je uveden v příloze 2. Výchozí místa byla navržena tak, aby se zvíře nebylo schopno naučit jejich určité pořadí a směr plavby. Pohyb zvířete byl snímán kamerou umístěnou nad středem bazénu. Plavba byla zaznamenána jako trajektorie v počítačovém programu EthoVision Noldus Information Technology (obr. 19, obr. 20). Vyhodnocen byl čas, za který zvíře platformu objevilo. Zvíře by mělo být schopno se umístění platformy naučit a pomocí orientačních bodů z vnějšího prostředí plavat přímo k platformě. Pokud zvíře nenalezlo platformu do 60 s, bylo umístěno na platformu experimentátorem na dobu 15 s. Po absolvování všech plaveb bylo zvíře osušeno ručníkem a navraceno do suché klece.

Po pátém dni učení bylo provedeno testování krátkodobé referenční prostorové paměti (PT1). Při tomto testování byla platforma odebrána a zvířata plavala v bazénu po dobu 60 s. Měřen byl čas, po který se zvíře pohybovalo v kvadrantu, kde se dříve nacházela platforma. Po deseti dnech bylo provedeno testování dlouhodobé prostorové paměti (PT2). Ten samý den proběhlo dalších osm plaveb s platformou umístěnou v opačném kvadrantu než při předchozím tréninku (reverse test). Cílem bylo vyhodnotit behaviorální a kognitivní flexibilitu zvířat (reverzní učení).

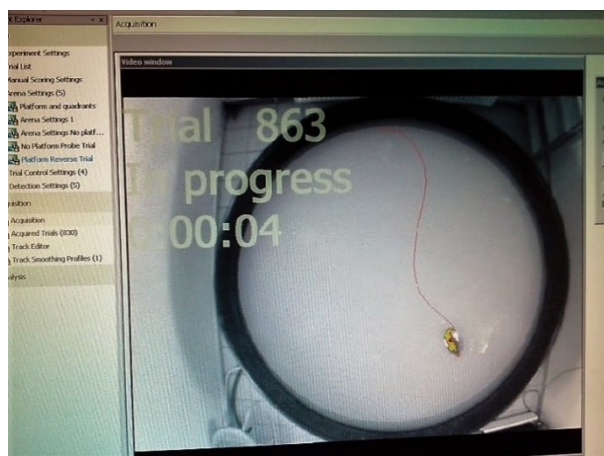
Po tomto krátkém učení bylo provedeno testování krátkodobé reverzní paměti (PT3). Opět byla platforma odebrána. Při všech plavbách bez platformy plavala zvířata z kvadrantu, který je přímo naproti původně umístěné platformě. Světelné podmínky, ticho a uspořádání okolního prostředí bylo během celého experimentu konstantní.



Obrázek 17: Pomůcky pro Morris water maze test



Obrázek 18: Rozdělení kvadrantů a umístění platformy



Obrázek 19: Záznam uplavané trajektorie v počítačovom softwaru

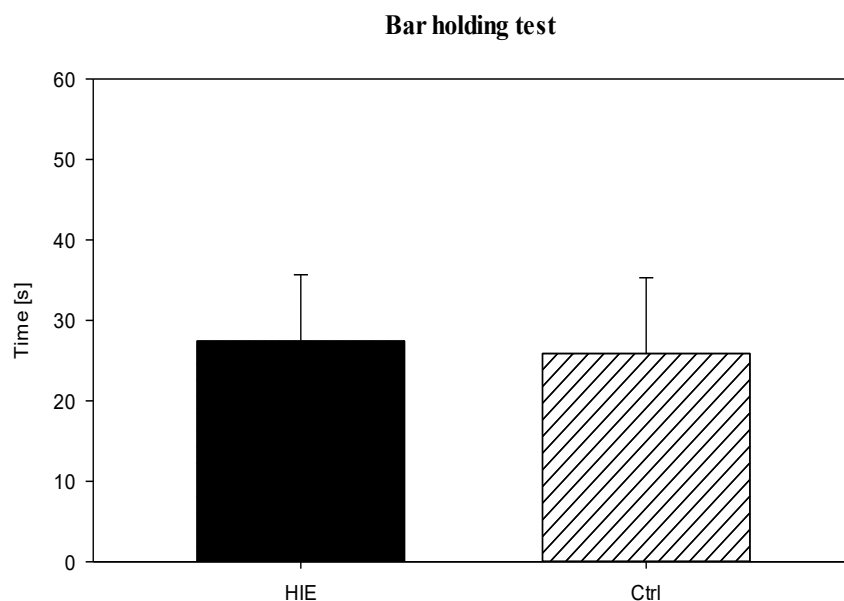


Obrázek 20: Záznam uplavané trajektorie v počítačovom softwaru II.

## 3.4 Výsledky

### 3.4.1 Bar holding test

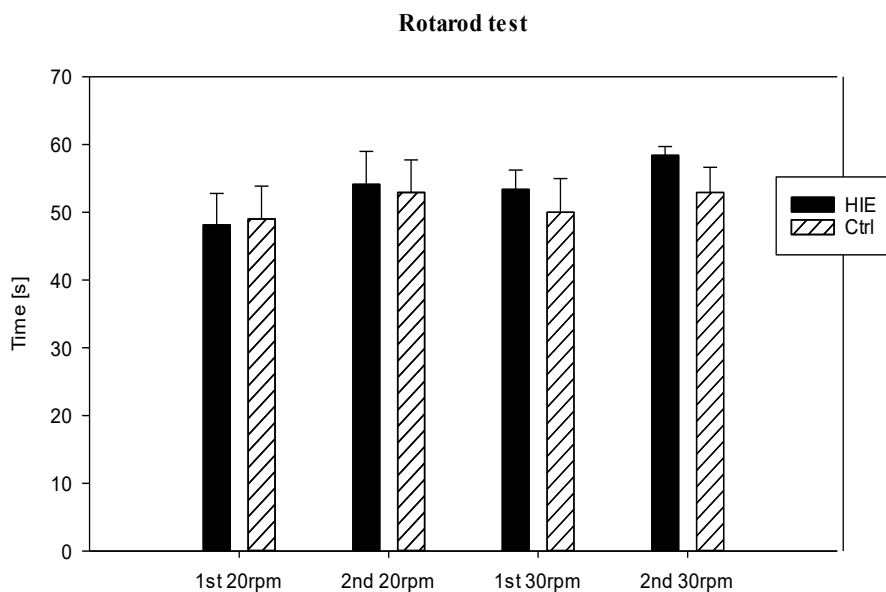
Experimentální i kontrolní skupina se udržela na tyči přibližně stejnou dobu (graf 1). Rozdíly skupin nejsou statisticky významné ( $p = 0,835$ ). Zadní končetiny dokázalo přitáhnout 7 ze 17 potkanů po hypoxicko–ischemickém inzultu a 6 z 15 potkanů ze skupiny kontrolní. Ani v této dovednosti nebyly výrazné rozdíly mezi HIE a kontrolními zvířaty.



Graf 1: Bar holding test (n = 32)

### 3.4.2 Rotarod test

Při 1. i 2. pokusu (20rpm/30rpm) nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v motorickém výkonu mezi experimentálními a kontrolními zvířaty (graf 2). Zvířata vydržela na rotujícím válci přibližně stejnou dobu. Při 2. pokusu (20rpm/30rpm) provedeném za dva dny, měl výkon zvířat z obou skupin tendenci ke zlepšení. Zvířata byla prostřednictvím motorického učení schopna zdokonalit svůj výkon a při opakovaném testování se udržela na válci delší dobu.



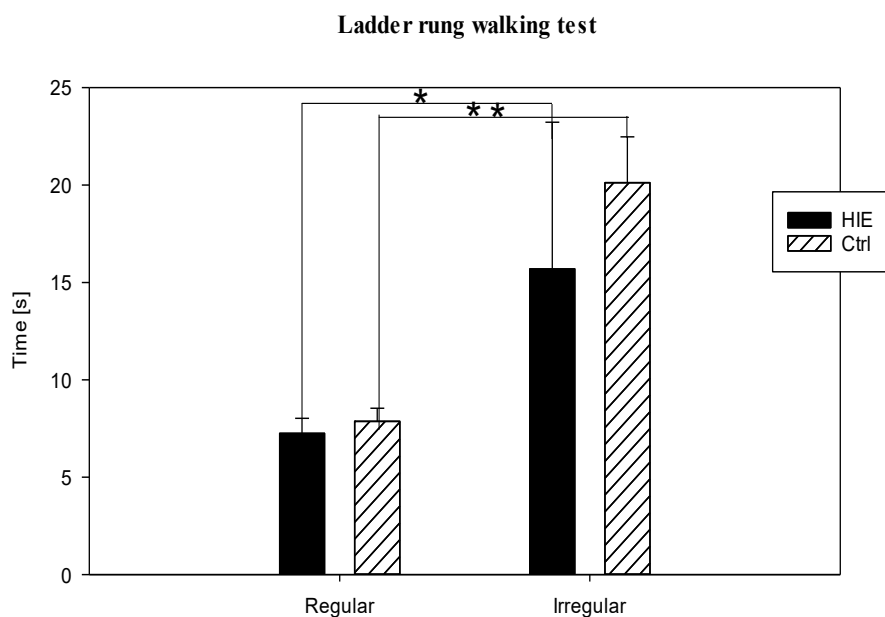
Graf 2: Rotarod test – 1. a 2. testování při rychlosti 20rpm a 30rpm (n = 32)

### 3.4.3 Ladder rung walking test

Při přecházení pravidelného i nepravidelného horizontálně položeného žebříku nebyly mezi časy experimentální a kontrolní skupiny zjištěny žádné statisticky signifikantní rozdíly (graf 3). Výrazně rychlejší byla HIE skupina při přecházení nepravidelného žebříku. Jediná statistická signifikance v časové rozdílnosti byla prokázána mezi 1. pokusem pravidelným a 1. pokusem nepravidelným u experimentální i kontrolní skupiny ( $p = 0,001$ ). Při přecházení nepravidelného žebříku se doba přejití výrazně zvýšila.

Při přecházení pravidelného žebříku více chybovala kontrolní skupina. Při přecházení nepravidelného žebříku chybovala více zvířata s HIE (graf 4). Jediná statistická signifikance v počtu chyb byla prokázána mezi prvním pokusem pravidelným a prvním pokusem nepravidelným u HIE skupiny ( $p = 0,002$ ). Zde došlo k výraznému nárůstu počtu chyb. Více potkanů chybovalo levou dolní končetinou. V kontrolní i experimentální skupině byla dvě zvířata bez stranového rozdílu (tabulka 5).

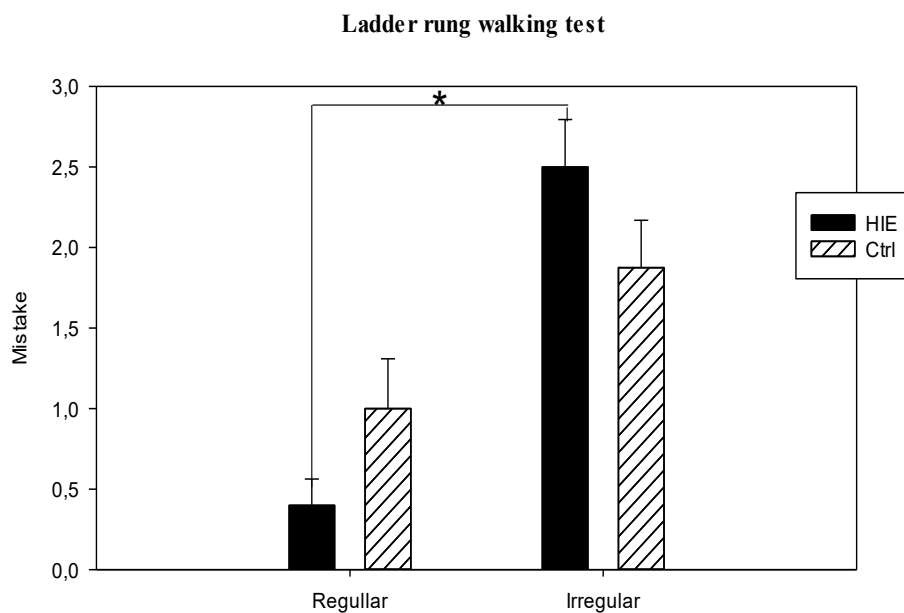




Graf 3: Ladder rung walking test – výkon v čase (n = 18)  
(pravidelné/nepravidelné uspořádání)

\*signifikantní rozdíl mezi výkonem při pravidelném a nepravidelném uspořádání mezer u HIE skupiny,  $p < 0,05$

\*\* signifikantní rozdíl mezi výkonem při pravidelném a nepravidelném uspořádání mezer u kontrolní skupiny,  $p < 0,05$



Graf 4: Ladder rung walking test – počet chyb (n = 18)  
(pravidelné/nepravidelné uspořádání)

\*signifikantní rozdíl mezi počtem chyb při pravidelném a nepravidelném uspořádání mezer u HIE skupiny,  $p < 0,05$

Tabulka 5: Ladder rung walking test – tabulka stranové chybovosti potkanů

	Postižená strana		
	Pravá	Levá	Není vyhraněn
<b>HIE</b>	3	5	2
<b>Ctrl</b>	2	4	2

### 3.4.4 Reaching test

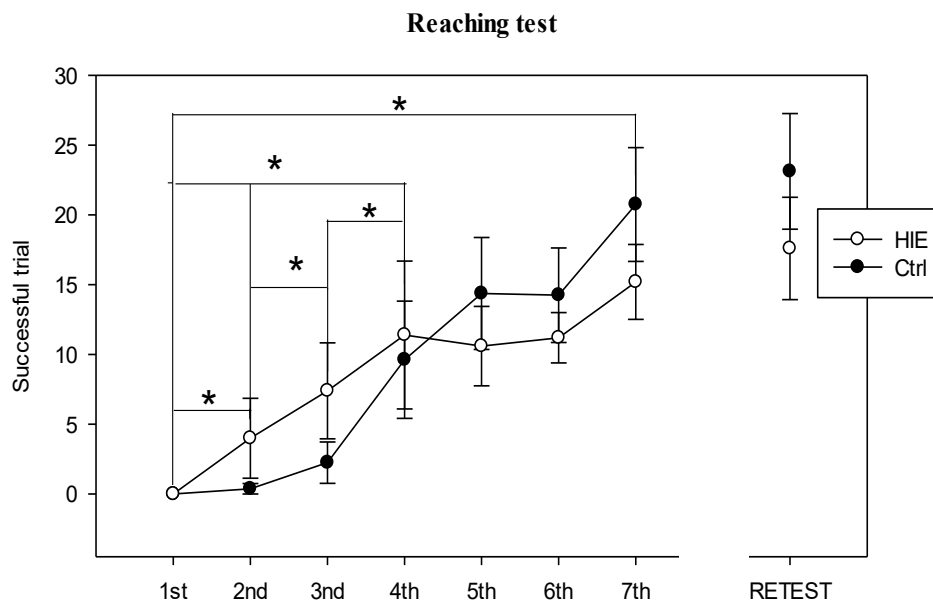
Výsledky Reaching testu ukázaly, že zvířata byla schopna se během týdenního tréninku naučit uchopit peletu předními končetinami, vložit ji do úst a sníst ji. Tento úkol bylo sedmý den testování schopno splnit 90 % zvířat z kontrolní skupiny a 90 % zvířat z experimentální skupiny.

U obou hodnocených skupin se výkon v průběhu celého týdne plynule zlepšoval (graf 5). Ze strměji stoupající křivky počtu úspěšných pokusů v prvních dnech testování (1.–4. den) u HIE skupiny vyplynulo, že potkani po HIE inzultu začali plnit tento úkol dříve než kontrolní skupina. U HIE skupiny byla nalezena statistická významnost ( $p < 0,05$ ) mezi 1.–2. dnem a 2.–3. dnem. U kontrolní skupiny byla nalezena statistická významnost až mezi 3.–4. dnem a 1. a 4. dnem ( $p < 0,05$ ). V následujících dnech se výkony potkanů ustálily. Rozdíl mezi 1. a 7. dnem byl u obou skupin statisticky významný ( $p < 0,05$ ). Po sedmi dnech bylo provedeno testování dlouhodobé paměti. Mezi posledním tréninkovým dnem a tímto testováním nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly ani v jedné testované skupině.

Korelační analýza neprokázala statisticky signifikantní rozdíl mezi kontrolní a HIE skupinou v počtu úspěšných pokusů v jednotlivých dnech i v celkovém součtu úspěšných pokusů. Kumulativní hodnoty za sedm dní tréninku neukázaly významné rozdíly mezi skupinami (graf 6).

Při pozorování úchopu zvířat byl u některých zástupců z HIE skupiny pozorován třes předních končetin. Některá zvířata si při úchopu dopomáhala druhou přední končetinou.

Počet úspěšných pokusů z celého týdne ukázal, že zvířata po HI inzultu i zvířata z kontrolní skupiny měla převážně levostrannou preferenci (tabulka 6). V kontrolní i HIE skupině byla dvě zvířata bez stranové preference. V každé skupině se nachází jedno zvíře, které neprovedlo ani jeden úspěšný pokus za celý týden.



Graf 5: Reaching test – počet úspěšných pokusů v týdenním tréninku (n = 18)

$p < 0,05$

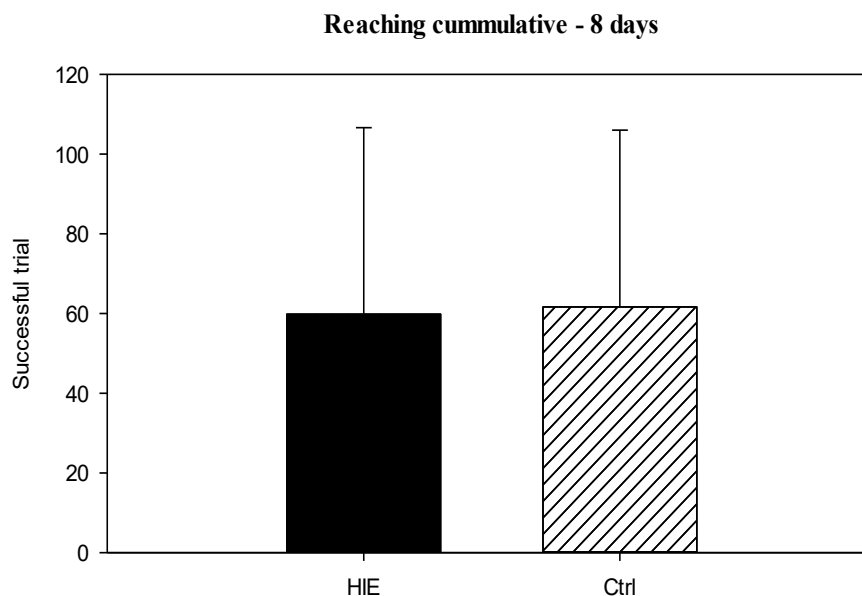
\* (1st–2nd) statisticky signifikantní rozdíl v počtu úspěšných pokusů u HIE skupiny,

\* (2nd–3rd) statisticky signifikantní rozdíl v počtu úspěšných pokusů u HIE skupiny,

\* (1st–4th) statisticky signifikantní rozdíl v počtu úspěšných pokusů u Ctrl skupiny,

\* (3rd–4th) statisticky signifikantní rozdíl v počtu úspěšných pokusů u Ctrl skupiny,

\* (1st–7th) statisticky signifikantní rozdíl v počtu úspěšných pokusů u Ctrl a HIE skupiny.



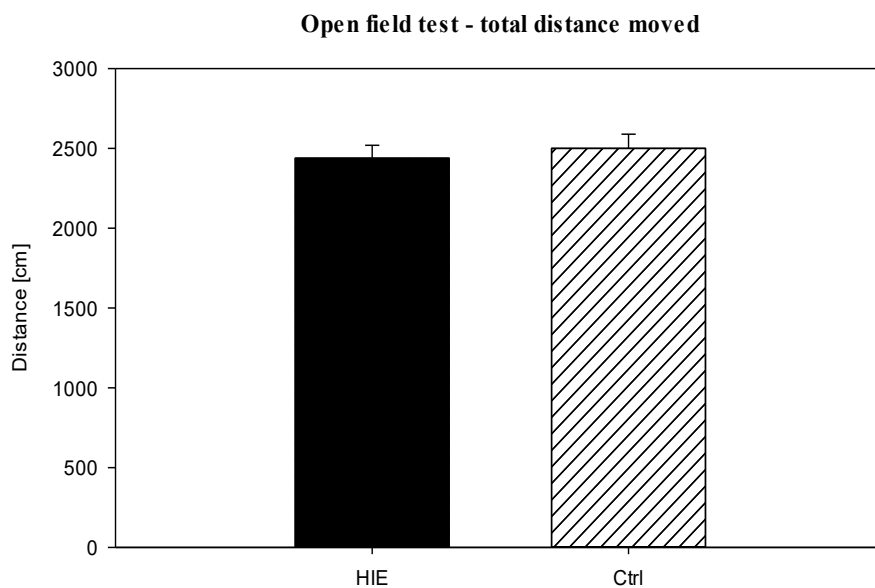
Graf 6: Reaching test – kumulativní hodnoty úspěšnosti (n = 18)

Tabulka 6: Reaching test – stranová preference

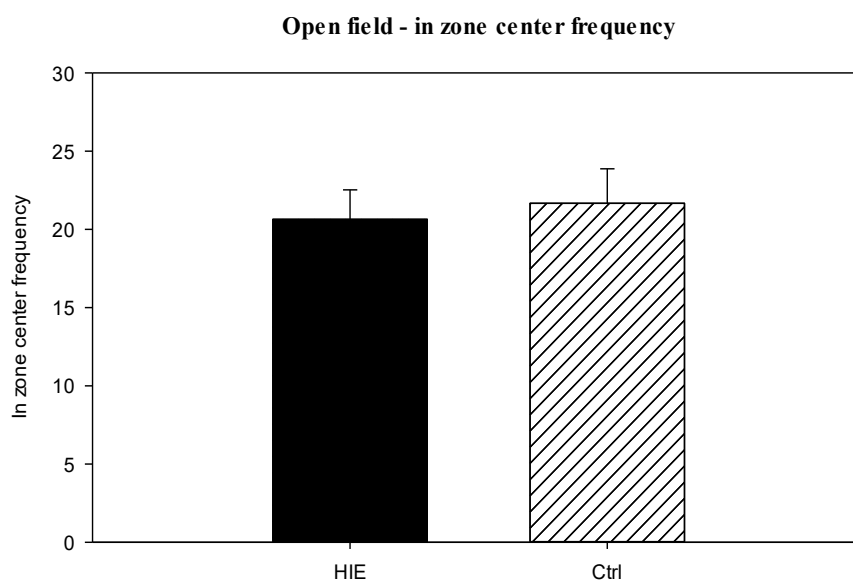
	Stranová preference		
	Pravá	Levá	Bez vyhraněné preference
<b>HIE</b>	2	6	2
<b>Ctrl</b>	2	4	2

### 3.4.5 Open field test

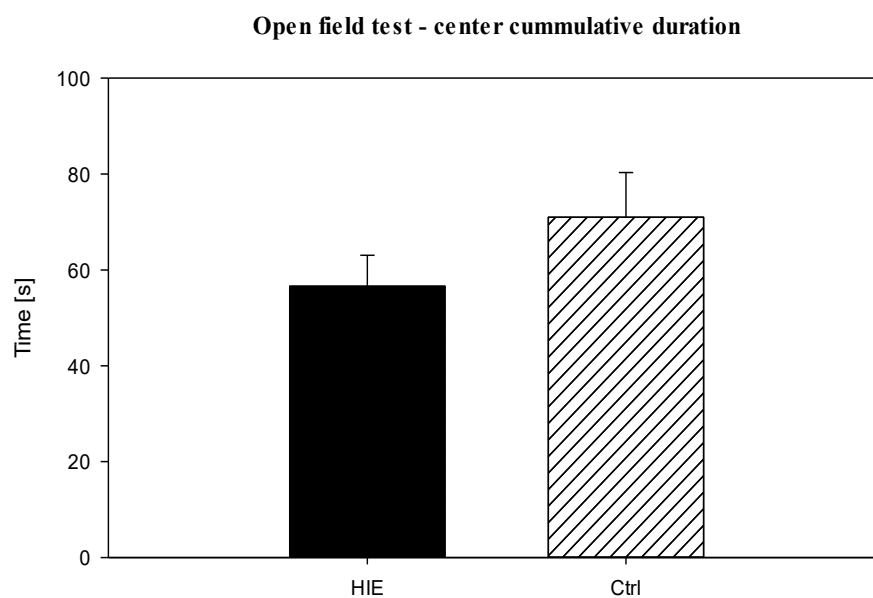
V Open field testu urazila zvířata z obou skupin téměř stejnou vzdálenost (graf 7). Frekvence vstupu do centra arény byla u experimentální a kontrolní skupiny téměř stejná (graf 8). HIE zvířata strávila v centru arény výrazně méně času oproti skupině kontrolní ( $p = 0,186$ ) (graf 9). Zvířata po HI inzultu čekala delší dobu, než poprvé vstoupila do centra arény (graf 10). Rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný ( $p = 0,597$ ).



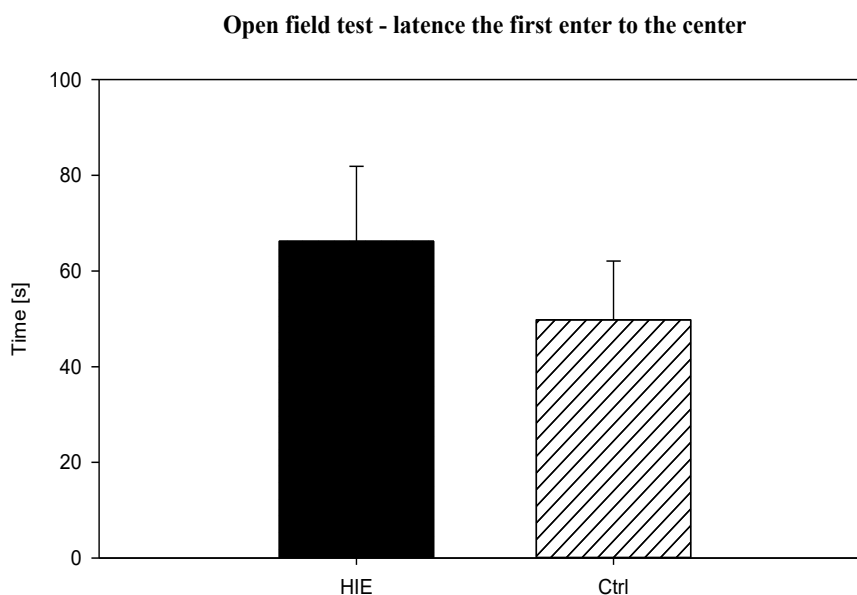
Graf 7: Open field test – lokomoční aktivita vyjádřena ušlou vzdáleností (n = 32)



Graf 8: Open field test – frekvence vstupu do centra arény (n = 32)



Graf 9: Open field test – čas strávený v centru arény (n = 32)

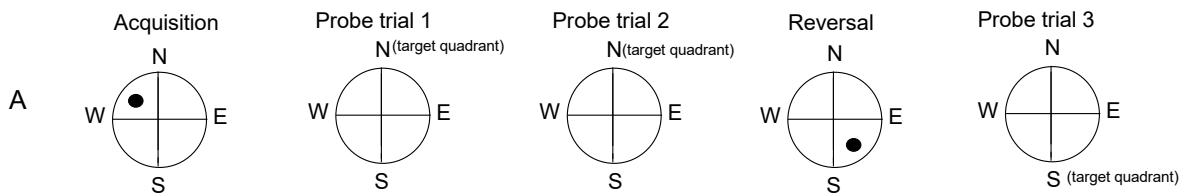


Graf 10: Open field test – latence vstupu do centra arény (n = 32)

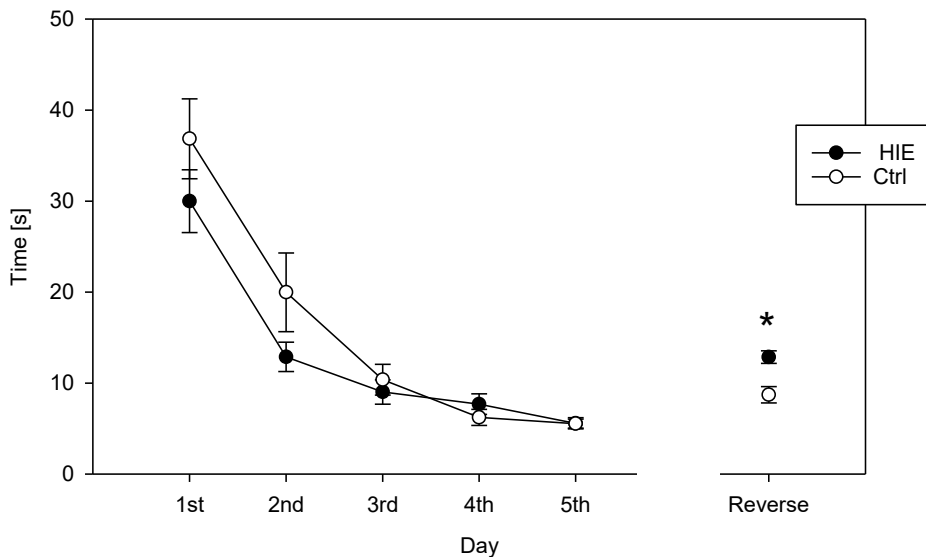
### 3.4.6 Morris water maze test

Potkani z obou skupin se byli schopni naučit umístění platformy v průběhu pětidenního tréninku a čas k nalezení platformy se postupně snižoval. Nejstrmější křivka je vidět mezi 1.–3. dnem u HIE i kontrolní skupiny (graf 11). V dalších dnech byl výkon obou skupin téměř konstantní. HIE skupina měla v prvních třech dnech kratší dobu latence k nalezení platformy oproti kontrolní skupině. Rozdíly mezi výkony skupin nedosáhli statistické významnosti.

Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) byl shledán při testování reverzní paměti mezi HIE a kontrolní skupinou. Z průměrné hodnoty vypočítané ze všech osmi plaveb při reverse testu vyplynulo, že potkanům po HI inzultu trvalo delší dobu, než našli platformu umístěnou v novém kvadrantu. Nejvýraznější rozdíl při hledání nové platformy byl při 1. plavbě (graf 12). Mezi 1. a 2. plavbou u HIE skupiny byla prokázána statistická signifikance ( $p < 0,05$ ). Hodnocení jednotlivých plaveb ukázalo, že HIE potkani měli při většině plaveb tendenci hledat platformu delší dobu oproti kontrolní skupině. Obě skupiny se po umístění na novou platformu byly schopny její nové umístění naučit. Na grafu 13 (PT1) je zobrazeno, že krátkodobá prostorová paměť nebyla u HIE skupiny výrazně poškozena ve srovnání s kontrolní skupinou. Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ) byl zjištěn mezi PT1 a PT2 u kontrolní i HIE skupiny při testování dlouhodobé paměti. Při PT3 se HIE skupina pohybovala ve správném kvadrantu kratší dobu než kontrolní skupina. Tento rozdíl není statisticky významný.

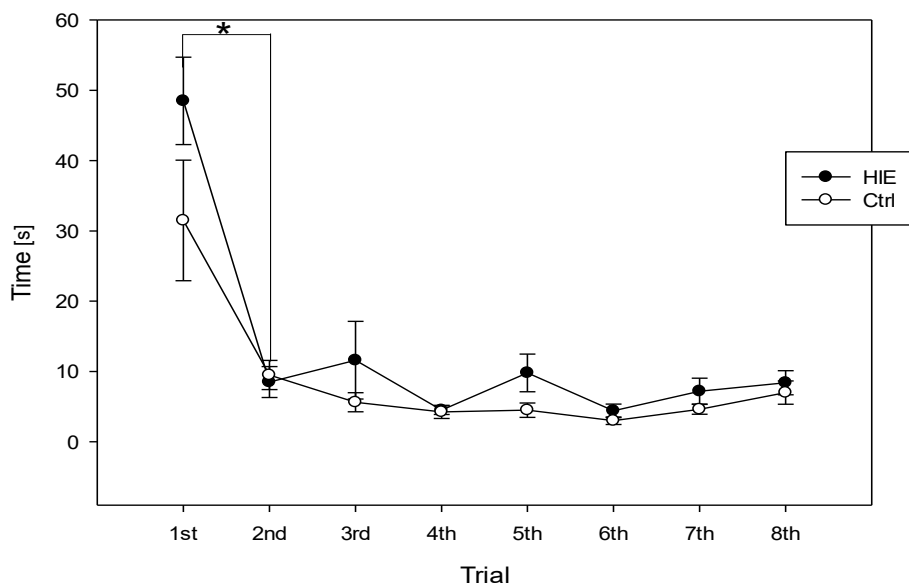


**Morris water maze test**

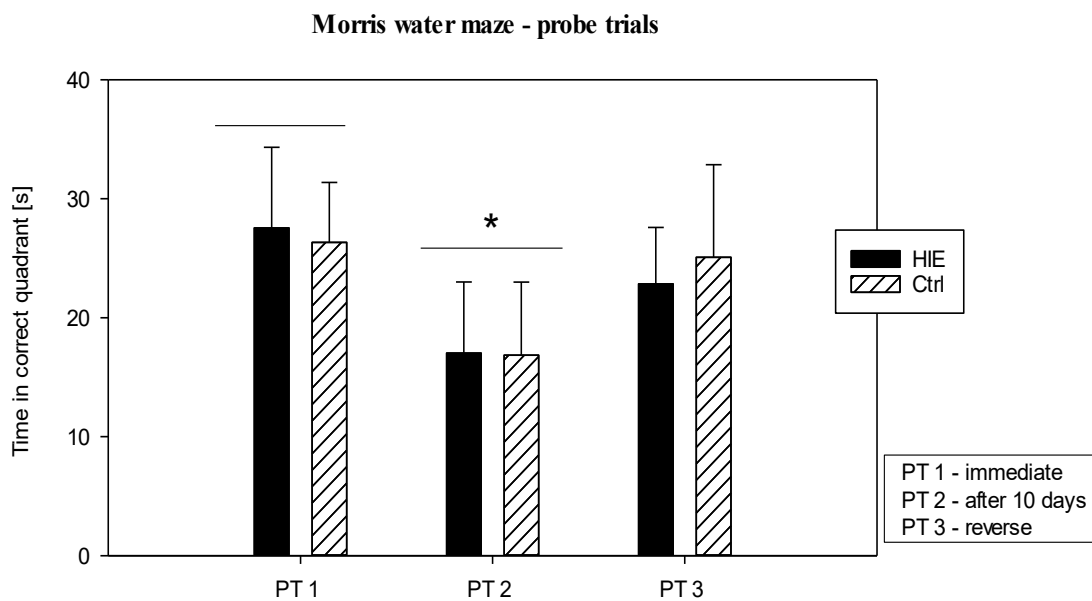


Graf 11: Morris water maze test – čas plaveb při tréninku a reverse testu (n = 18)  
\*signifikantní rozdíl mezi HIE a Ctrl skupinou při testování reverzní paměti,  $p < 0,05$

**Morris water maze - Reverse test**



Graf 12: Morris water maze – reverse test (jednotlivé plavby) (n = 18)  
\*signifikantní rozdíl mezi 1. a 2. plavbou HIE skupiny při testování reverzního učení,  $p < 0,05$



Graf 13: Morris water maze test – probetrials (n = 18)  
\*signifikantní rozdíl mezi PT1 a PT 2 u HIE i Ctrl skupiny,  $p < 0,05$



## 4 Diskuse

Perinatální hypoxická–ischémie je častou příčinou poškození mozku u zralých i nedonošených novorozenců a způsobuje dlouhodobé behaviorální, kognitivní a motorické deficity (Lubics et al., 2005). Klinický obraz a rozsah poškození mozku po HI inzultu je heterogenní a je ovlivněn několika faktory: dobou trvání, místem inzultu, gestačním věkem, přídatným infekčním nebo metabolickým onemocněním a traumatickým poraněním (Groenendaal a Vries, 2015). Mozková tkáň je schopna neuroanatomické reorganizace a funkční adaptace prostřednictvím augmentace aktivity substitučních mozkových oblastí, které nebyly při inzultu poškozeny (Kirton a Veber, 2013). Neurogeneze je nejintenzivnější v raném období života (do 2 let), ale v pomalejším tempu přetrvává i u dospělého jedince (Basu et al., 2015).

Experimentální zvířecí model hypoxické ischémie je standardizovaným postupem pro navození obdobného inzultu u novorozenců. Experimentální studie jsou velmi důležité pro porozumění patofyziologickým procesům a pro potenciální neuroprotektivní léčbu. Experimentální provedení HI inzultu v raném věku je velmi náročné. Nejčastěji používaným způsobem pro vyvolání perinatálního HI poškození je uzavření jedné arterie carotis communis u potkana v P7 a následné vyvolání systémové hypoxie. Tento postup byl použit i při provádění našeho experimentu. Nicméně funkční i histologické následky po takto vyvolaném inzultu jsou variabilní a rozporuplné (Lubics et al., 2005). Výsledkem je nekonzistentní objem infarktu (Maxwell a Dyck, 2005). Jednostranná trvalá okluze arterie carotis communis může výrazně komplikovat analýzu dlouhodobého efektu HI inzultu (Sukhanova et al., 2016).

Pro zjištění funkčních deficitů byly provedeny behaviorální testy na laboratorních potkanech. Jiné experimentální studie prokázaly nižší váhu, opožděný vývoj neurologických reflexů, opožděný somatický a motorický vývoj, hyperaktivitu a narušení kognitivních funkcí u potkanů po HI (Huang et al., 2009; Huang, Wen a Liu, 2015; Lubics et al., 2005; Sukhanova et al., 2016; Zhu et al., 2013). Výsledky behaviorálních testů jsou ovlivněny věkem, ve kterém jsou provedeny (Alexander et al., 2014; Huang, Wen a Liu, 2015).

V našem experimentu nebylo v prokázáno významné poškození senzo–motorických funkcí u potkanů po HI inzultu. Je potvrzeno, že neonatální HI inzult je příčinou cerebrální atrofie.

Na rozdíl od lidských novorozenců nemají potkani po HI inzultu hrubě narušeny spontánní posturální a lokomotorické funkce. Deficity se objevují až při složitějších funkčních testech. Tento jev může být vysvětlen vyšší plasticitou nervové tkáně potkanů v porovnání s humánními novorozenci (Jansen a Low, 1996).

Ve výkonu v Rotarod testu nebyl při prvním ani druhém pokusu (20 rpm/30 rpm) zjištěn signifikantní rozdíl mezi experimentálními a kontrolními zvířaty. Při druhém pokusu provedeném za dva dny měl výkon zvířat z obou skupin tendenci ke zlepšení. Zvířata jsou prostřednictvím motorického učení schopna svůj výkon zdokonalit a udržet se na válci delší dobu. Testování při vyšší rychlosti otáček výkon zvířat nezhoršilo. Obdobných výsledků bylo v tomto testu dosaženo ve studii Lubics et al. (2005) a Balduini et al. (2000).

Bar holding je jeden z nejnáročnějších motorických testů na spotřebu energie. Zvířata musí vynaložit velké množství energie, aby se byla schopna pomocí horních končetin udržet na tyči, a navíc přitáhnout zadní končetiny. V našem experimentu nebyly ani v tomto testu zjištěny rozdíly mezi kontrolní a HIE skupinou.

Výsledky Ladder rung walking testu opět neprokázaly významné rozdíly mezi kontrolní a HIE skupinou jak v čase, tak v počtu chyb při přecházení pravidelného a nepravidelného žebříku. Je možné říci, že zvířata po hypoxicko–ischemickém inzultu měla tendenci přebíhat žebřík rychleji a zejména u nepravidelného žebříku výrazněji chybovala. Spolu s výsledky Open field testu a Morris water maze testu, které budou diskutovány níže, může být rychlejší přebíhání experimentální skupiny přisuzováno zvýšené aktivitě a anxiozitě HIE zvířat. Anxiózní zvířata se snažila rychleji vrátit zpět do mateřské klece. S vyšší rychlostí koreluje větší počet chyb. Důvodem vyššího počtu chyb při nepravidelném žebříku je vyšší náročnost tohoto testu. Podle Jansen a Low (1996) se funkční deficity projevují až při složitějších testech, kterým nepravidelný žebřík bezpochyby je. Většina potkanů chybovala více levou dolní končetinou. Z důvodu uzavřené pravé arterie carotis communis a pravostranného poškození mozku byl tento výsledek očekáván. Chybování kontrolní skupiny může být odůvodněno tím, že zvířata při testování prováděla tento úkol poprvé, neznala dané prostředí a nebyla trénovaná. Pokud by byla zvířata testována opakovaně a dlouhodobě, bylo by vlivem motorického učení očekáváno snížení chybovosti.

V Reaching testu byla hodnocena schopnost učení a úchopu předními končetinami. Zvířata byla sedm dní trénována k tomu, aby uchopila peletu, vložila ji do úst a snědla ji. Tento test může být použit jako diagnostický nástroj, ale také jako forma terapie. Výsledky Reaching testu ukázaly, že kontrolní i experimentální zvířata jsou schopna se během týdenního tréninku tento úkol naučit. Tím byla prokázána schopnost motorického učení a paměti kontrolní i HIE skupiny. Každým dnem začalo test provádět více zvířat a zvýšil se počet úspěšných pokusů. Na základě průběhu křivek je možné říci, že i HIE skupina byla schopna po takto vyvolaném inzultu svůj výkon zlepšovat. Při úchopu zvířat byl u některých zástupců z HIE skupiny pozorován třes předních končetin a některá zvířata si při úchopu dopomáhala druhou přední končetinou. Je možné uvažovat nad tím, že Reaching test není dostatečně citlivý k detekci drobných motorických deficitů. Lze předpokládat, že zvířata prováděla testovaný pohyb na základě kompenzace přes nižší regulační obvody extrapyramidového systému.

Výše uvedené testy jsou úspěšně používány k hodnocení motorických dovedností při jednostranné mozkové ischemii u dospělých potkanů (Vyletěllová, 2017). Ve studii Lubicse et al. (2005) byla většina motorických testů užitečným nástrojem k prokázání rozdílů mezi zdravými a hypoxickými mláďaty. Nicméně experimentální zvířata prokázala ve vyšším věku ve většině těchto testů vynikající zotavení. Naše studie a studie Lubics et al. (2005) a Balduini et al. (2000) ukazují, že i přes vážné poškození mozku mají tyto testy u dospělých jedinců s perinatálním HI inzultem sníženou citlivost. Potkani s 50% atrofií mozkové hemisféry na straně uzavřené arterie carotis communis dosahovali při motorickém testování v šestém postnatálním týdnu stejných výsledků jako kontrolní skupina. Výjimku tvořily výsledky footfault testu a vyšší aktivita v open-field testu (Lubics et al., 2005). Restituce a regenerace po poškození mozku je ve většině případů samovolná, ke zlepšování stavu dochází s časem (Gál, Hoskocová a Jech, 2015). I zvířata s jednostrannou ischemií v dospělém věku (CMP) prokazují určitou obnovu senzomotorického deficitu (Vyletěllová, 2017), ale obnova v novorozeneckém věku je prokazatelně vyšší. Toto tvrzení může být vysvětleno vyšší schopností plasticity novorozenecké CNS (Šlapal, 2012) a schopností kompenzačních změn v kontralaterální hemisféře. Potkani nebyli před prováděním těchto jednorázových testů (Rotarod test, Ladder rung walking test, Bar holding test) trénováni, neznali úkoly ani pomůcky potřebné pro jejich vykonání.

Dané podmínky ovlivnily i výkony potkanů z kontrolní skupiny. I toto může být považováno za jeden z důvodů, proč nebyly prokázány téměř žádné signifikantní rozdíly mezi HIE a kontrolní skupinou při rychlých jednorázových testech.

Dále se naše pozornost zaměřila na vyšší behaviorální a kognitivní procesy, včetně behaviorální flexibility. Vyšší procesy, přirozené tendence a chování zvířat byly testovány pomocí Open field testu a Morris water maze testu. Pomocí těchto testů je možné odhalit drobné změny ve výkonu poškozených zvířat oproti kontrolní skupině. Kognitivní a vyšší behaviorální procesy (učení, paměť, kódování nových informací, vytváření paměťových stop, behaviorální flexibilita) jsou zajištěny zejména hipokampem, mediální prefrontální kůrou a orbitálním frontálním kortexem. Na jejich správné funkci se podílejí i další neurální struktury, které obklopují hipokampus a představují jeho aferentní vstupy. Patří sem laterální entorhinální kůra, perirhinální kůra, parahipokampální kůra a amygdala (Preston a Eichenbaum, 2014).

Měření spontánní pohybové a explorační aktivity v novém prostředí bylo provedeno v Open field testu. U HIE zvířat nebyla prokázána hyperaktivita ani hypoaktivita oproti kontrolní skupině. Z výrazně delšího času stráveného mimo centrum arény a delší latence prvního vstupu do centra arény byla u HIE zvířat zjištěna zvýšená anxiozita. Přirozeně se zvířata u zdí cítí bezpečněji. Tento výsledek naznačuje změnu emocionálního stavu a zhoršenou adaptaci na nové prostředí po HI inzultu. Balduini et. al. (2000) uvádí hyperaktivitu u potkanů ve 3. postnatálním týdnu. V pozdějším testování (stáří 90 dní) se však spontánní aktivita experimentální skupiny od skupiny kontrolní neliší.

Morris water maze test je určen pro hodnocení souvislého učení a prostorové paměti. Tento test je vysoce validní. Velmi citlivě hodnotí učení a prostorovou i referenční paměť. Jeho využití je široké, nejčastěji je používán k detekci poškození hipokampálních obvodů, entorhinální a perirhinální kůry, prefrontální kůry, cingulátové kůry, neostriata a mozečku (Vorhees a Williams, 2006; D'Hooge a Deyn, 2001). Bylo prokázáno, že při HI inzultu u předčasně narozených dětí (potkan v P7) je poškozena bílá hmota mozková a některé struktury šedé hmoty mozkové, které přispívají ke kognitivním deficitům u dospělých potkanů (Pierson et al., 2007). K narušení prostorového učení stačí pouze poškození spojů, tedy bílé hmoty mozkové mezi jednotlivými strukturami (D'Hooge a Deyn, 2001).

Dalším důvodem zhoršení kognitivních funkcí může být narušená myelinizace preoligodendroglíí, astroglióza a mikroglíóza v akutní fázi a vznik gliálních jizev v pozdní fázi po HI inzultu (Huang et al., 2009). K provedení Morris water maze testu není potřeba dlouhodobý trénink. Je důležité zmínit, že horší výsledky v tomto testu nejsou způsobeny narušenými lokomotorickými dovednostmi. Snížená schopnost lokomotorické aktivity proti gravitaci neovlivňuje rychlost plavání (Vorhees a Williams, 2006). Toto je důležité brát v potaz i při hodnocení výsledků našeho experimentu, kde odlišné výkony v Morris water maze testu a Open field testu nebyly způsobeny motorickým deficitem.

Potkani z obou skupin se byli schopni během tréninku umístění platformy naučit. Čas k dosažení platformy se tréninkem postupně snižoval. Při první plavbě potkani z obou skupin plavali kolem stěn bazénu a snažili se u stěn najít únikovou cestu. Po umístění experimentátorem na platformu všechna zvířata pochopila smysl úkolu a v dalších plavbách platformu vyhledávala. Zvířata po HI inzultu měla v prvních třech dnech kratší dobu latence k nalezení platformy oproti kontrolní skupině. Tento jev může být vysvětlen zvýšenou anxiozitou HIE zvířat, protože anxiózní zvířata se snažila najít únik z bazénu rychleji. Schopnost navigace a krátkodobé prostorové paměti se u experimentální a kontrolní skupiny nelišila. Předchozí studie ukázaly, že k osvojení si úlohy Morris water maze testu postačuje relativně malá část tkáně dorzálního hipokampu. Prostorové učení bylo narušeno při lézi téměř celého dorzálního hipokampu a zachování 60 % intaktní tkáně ventrálního hipokampu. Při poškození ventrálního hipokampu jsou zvířata méně anxiózní, což není případ naší experimentální skupiny (Zhang et al., 2004).

Probe trial 1 (PT1 – testování bez platformy) byl proveden bezprostředně po posledním pokusu v rámci pětidenního tréninku. Experimentální skupina plavala ve správném kvadrantu téměř stejnou dobu jako kontrolní skupina. U experimentálních potkanů nebyla krátkodobá prostorová paměť ve srovnání s kontrolní skupinou poškozena. Nicméně, tento výsledek může být ovlivněn bezprostředním testováním po posledním tréninkovém dni (Vorhees a Williams, 2006). Zajímavější je hodnocení dlouhodobé paměti, které bylo provedeno po deseti dnech od posledního testování (PT2). Překvapivě byl u obou skupin prokázán deficit v udržení stabilní prostorové mapy. Zdraví potkani si pamatují umístění platformy dlouho dobu, například i po čtyřiceti dnech od tréninku (Mikulecká et al., 2014).

Jelikož ještě není provedena histologie mozkové tkáně experimentálních zvířat nelze vyloučit, že samotný uzávěr pravé arterie carotis communis nezpůsobil poškození. Ovšem z literatury je známo, že pouhé uzavření arterie carotis communis nevede k postižení, a proto jsou morfologická poškození málo pravděpodobná. Proces zapomínání je základním prvkem adaptivního paměťového systému, který zvyšuje behaviorální a kognitivní flexibilitu. Zapomenutí může odrážet skutečnou ztrátu paměti, ale může být také vysvětleno jako selhání při vybavení stávající paměti (interference). Záměrné pokusy zapomenout na konkrétní informace mohou zlepšit učení nových informací (Tello–Ramos et al., 2019).

Behaviorální (kognitivní) flexibilita znamená schopnost přizpůsobovat své chování a jednání změnám prostředí. Tato schopnost pomáhá lidem i zvířatům zvládat nepředvídatelné události ve známém prostředí a zvyšuje šance na přežití (Tello–Ramos et al., 2019). Flexibilita je zajišťována prefrontální kůrou, přesněji fronto–striato–thalamickým okruhem, který je úzce spjatý s limbickým systémem. Při poškození tohoto okruhu mají potkani, kteří jsou trénováni k použití jedné strategie potíže s vytvořením strategie nové (Rich a Shapiro, 2007). K otestování kognitivní flexibility může být využit „reversal learning task“, při kterém jsou původně naučené asociace změněny. Pro testování reverzního učení a flexibility chování byla platforma umístěna do opačného kvadrantu, než ve kterém byla umístěna při tréninku. Při reverzním učení je očekáváno, že flexibilní jedinec změní svou naučenou strategii, naučí se novou lokalitu platformy a přestane navštěvovat místo, které již nenabízí odměnu (platformu).

Při první reverse plavbě zvířata obvykle plavou na původní místo platformy a poté začnou prozkoumávat další kvadranty (Vorhees a Williams, 2006). Ve studii Vorhees a Walliams (2006) byli zdraví potkani schopni velmi rychlého přechodu z původní pozice platformy k novému umístění, aniž by trávili delší čas prohledáváním původního kvadrantu. Výsledná hodnota naší HIE skupiny, která byla vytvořena průměrem všech osmi plaveb při reverse testu, je signifikantně odlišná od výsledné hodnoty kontrolní skupiny. Největší rozdíl při hledání nové platformy byl při první plavbě. Většina zástupců z kontrolní skupiny plavala do původního kvadrantu. Pokud zde platformu nenašla, začala hledat platformu i v jiných kvadrantech. Většina zvířat po HI inzultu plavala při první plavbě, stejně jako kontrolní skupina, převážně v původním kvadrantu. Pokud platformu nenašla, snažila se najít únik u okrajů bazénu.

Tento jev může být opět vysvětlen zvýšenou anxiozitou a stresem HIE skupiny. Dva potkani z HIE skupiny se při první plavbě v původním kvadrantu pohybovali minimálně, prohledávali jiné kvadranty a drželi se u okraje bazénu. Toto může být následkem týdenní pauzy mezi tréninkem a reversem testem, při které potkani neudrželi stabilní prostorovou mapu pro nalezení původně umístěné platformy. Detailní hodnocení plaveb bylo provedeno na základě sledování zaznamenaných videí. Potkani, kteří platformu nenašli, byli na novou platformu umístěni experimentátorem. Při pozorování jednotlivých plaveb prokazují experimentální potkani tendenci k delšímu hledání platformy oproti kontrolní skupině a vrací se do původního kvadrantu. Rozdíly však nejsou signifikantní. Obě skupiny byly po umístění na novou platformu schopny vytvořit nové strategie pro její nalezení. Časy potkanů po HI inzultu jsou však delší. Z výsledků (PT3) vyplývá, že HIE skupina zvířat se pohybovala v kvadrantu, kde byla při reverse testu umístěna platforma, kratší dobu než kontrolní skupina. Rozdíl není statisticky významný. Na základě těchto výsledků je možné říci, že kognitivní flexibilita u HIE potkanů byla narušena. Pro podporu tohoto tvrzení a navýšení reliability výzkumu je potřeba provést podrobnější pozorování většího vzorku zvířat.

Deficit kognitivní flexibility patří mezi příznaky schizofrenie (Kleinmans a Bilkey, 2018), ADHD (Mary et al., 2016) nebo autismu (Badawi et al., 2006; Eylen et al., 2011), které jsou častým následkem hypoxicko–ischemické encefalopatie.

Jak bylo uvedeno výše, nálezy po experimentálně vyvolaném HI inzultu jsou variabilní a výsledky studií jsou rozporuplné. Jansen a Low (1996) a Bona et al. (1997) prokázali u HI potkanů senzomotorický deficit. O systematické hodnocení potkanů po HI inzultu se pokusil Zhu et al. (2013). U potkanů bylo hodnoceno neurologické chování, kognitivní funkce, neurofyziologické projevy (motorické evokované potenciály), histopatologie a cytologie. V této studii dosáhli HI potkani prokazatelně horších výsledků v motorických testech (beam walking testu a foot print analysis test) i v Morris Water maze testu. Potkani byli testováni ve stáří 28 dní. V tomto věku není potkan považován za dospělého a vývoj CNS ještě není zcela dokončen. Je možné, že obdobně jako ve studii Lubics et al. (2005) by dospíváním potkanů došlo k eliminaci funkčních deficitů po HI inzultu. Podobně ve studii Spreng et al. (2002) je prokázáno, že zdraví dospělí potkani dosahují lepších výsledků v Morris water maze testu než zvířata v preadolescentním věku (33 dní).

Naše kontrolní skupina podstoupila stejnou operaci (uzavření pravé arterie carotis communis) jako skupina experimentální, bez následné hypoxie. Například ve studii Zhu et al. (2013), Huang, Wen a Liu (2015) a Huang et al. (2009) byl u kontrolní skupiny proveden stejný operační zákrok jako u skupiny experimentální, bez uzavření arterie carotis communis. I přesto, že vliv uzavření arterie carotis communis není předpokládán, může to být jedním z důvodů, proč je v těchto studiích výraznější rozdíl mezi HIE a kontrolní skupinou. Odlišné výsledky mohou být také ovlivněny různými kmeny potkanů, které jsou ve studiích použity (Wistar, Sprague Dawley, Long Evans) a uzavřením pravé nebo levé arterie carotis communis. Dalším rozdílným parametrem je doba trvání systémové hypoxie.

Zvířata z našeho testování jsou nyní dlouhodobě sledována na EEG v rámci projektu „*Výzkum etiopatogeneze závažných neurologických a psychiatrických onemocnění se zaměřením na význam buněčných subpopulací CNS*“, který probíhá na půdě Fyziologického ústavu AV ČR. Poté je pro objasnění poškozených struktur nezbytné provést histologii mozku testovaných zvířat. V dalších studiích by bylo vhodné zkoumat behaviorální flexibilitu u potkanů po HI inzultu podrobněji, s kratší latencí mezi tréninkem a reverse testem. Dále by bylo jistě přínosné provést více testů zaměřených na kognitivní funkce, schopnost učení a flexibilitu paměti a provádět tyto testy v různých vývojových stádiích. Mezi vhodné testy se řadí například křížové nebo Y bludiště. Vhodným neprostorovým testem je například Attentional set shifting, vysvětlen ve studii Birell a Brown (2000). Vhodné by bylo i podrobnější hodnocení motoriky. Například pomocí kamerového systému, které by zajistilo zachycení drobných odchylek od fyziologické normy.

## 4.1 Evaluace hypotéz

**H01:** Na základě výsledků dostupných dlouhodobých studií na humánních i zvířecích probandech se motorické chování dospělých zvířat s experimentálně vyvolaným perinatálním hypoxicko–ischemickým inzultem nebude výrazně lišit ve své kvalitě v porovnání s kontrolní skupinou.

Hypotéza byla potvrzena pomocí výsledků Rotarod testu, Bar holding testu, Ladder rung walking testu a Reaching testu.



**H02:** Z důvodu přednostního zasažení hipokampu (CA<sub>1</sub> oblast) po hypoxicko–ischemickém inzultu bude u experimentální skupiny narušena prostorová paměť, kognitivní funkce a zpomalena schopnost učení.

Tato hypotéza byla částečně potvrzena. Ve Water maze testu a Reaching testu nebyla prokázána porucha procesu učení. Výkon HIE potkanů se v týdenním tréninku zlepšoval. Signifikantně bylo prokázáno pouze narušení dlouhodobé prostorové paměti a kognitivní flexibility.

**H03:** U experimentálních zvířat budou výrazné behaviorální změny ve smyslu zvýšené anxiety a hyperaktivity oproti kontrolní skupině.

Tato hypotéza byla potvrzena. Potvrzena byla zvýšená anxiety zvířat po HI inzultu v Open field testu, Ladder rung walking testu a Morris water maze testu. Zvýšená úzkost je prokázána i u dětí s HIE (Moster, Lie a Markestad, 2002). V Ladder rung walking testu a Morris water maze testu byla prokázána zvýšená aktivita zvířat. V Open field testu se hyperaktivita neprokázala. V Reaching testu byla prokázána zvýšená aktivita při uchopování pelet v prvních třech dnech a některá zvířata po HI inzultu během testování z testovacích boxů vyskakovala. Zvýšená aktivita zvířat koreluje s výskytem hyperaktivity a ADHD u dětí s HIE (Handel et al., 2007).

## 5 Závěr

Tato práce se zabývala funkčními důsledky po perinatálním HI inzultu. Pro úspěšnou léčbu a eliminaci neurologických deficitů je důležitá včasná diagnostika na základě neurologického vyšetření, specifických biomarkerů a zobrazovacích metod. Metody včasné diagnostiky a úspěšné léčby po této atace jsou neustále předmětem výzkumů. Dalším nedostatkem této problematiky je nedostatečná evidence dlouhodobých deficitů u jedinců s HIE. Z tohoto důvodu výzkumy v této oblasti vědy a medicíny považují za aktuální.

Hlavním cílem diplomové práce bylo sestavit sadu behaviorálních testů a etablovat model motorických a kognitivně–behaviorálních schopností dospělých zvířat po experimentálně vyvolaném hypoxicko–ischemickém inzultu v perinatálním období.

V teoretické části práce jsou předloženy dosavadní poznatky o HI inzultu: etiologie vzniku, patofyziologie procesu, typicky poškozené neurální struktury dle časového období, klinický obraz a diagnostika u humánních jedinců po HI inzultu, schopnost neurogeneze zasažené neurální tkáně a možnosti následné terapie. Závěrečná část teoretického úvodu byla věnována experimentálnímu vyvolání hypoxie–ischémie v laboratorních podmínkách a vývoji potkana v porovnání s vývojem humánního jedince. Na základě teoretických poznatků byla na půdě Fyziologického ústavu AV ČR provedena experimentální část. Pro získání dat v praktické části byly vybrány motorické a kognitivní testy rutinně používané v oddělení vývojové epileptologie AV ČR. Pomocí testů byla zhodnocena motorická zdatnost zvířat, schopnost učení, anxiety, prostorová paměť a kognitivní flexibilita.

Cíl práce byl splněn. Celý experiment proběhl bez výrazných komplikací. Dlouhodobé klinické následky po perinatálním HI inzultu jsou variabilní. I přesto byl na základě výsledků testů sestaven zvířecí model motorických a kognitivně–behaviorálních schopností po perinatální HI atace. Na základě obecného sledování a výsledků Open Field testu, Ladder rung walking testu a Morris water maze testu bylo zjištěno, že HI inzult ovlivňuje emocionální stav v podobě zvýšené anxiety. Pomocí Morris water maze testu byla odhalena porucha dlouhodobé prostorové paměti a behaviorální flexibility. Oproti tomu nebylo u HIE potkanů prokázáno téměř žádné poškození v testech hodnotících lokomoci a senzo–motorické funkce.

Jelikož nebylo provedeno histologické vyšetření mozkové tkáně, není možné říci, které neurální struktury byly poškozeny. Vzhledem k výsledkům testování předpokládáme vysokou schopnost plasticity mozkové tkáně při infultu u novorozených potkanů.

Výsledky našeho experimentu dávají podněty pro rozšíření této práce. Pro zvýšení reliability studie je potřeba provést testování většího vzorku zvířat. V dalších studiích by bylo vhodné zabývat se kognitivními funkcemi po HI infultu podrobněji a provést více testů zaměřených na testování paměti a behaviorální flexibility.

Předpokládáme, že etablovaný model zvířat z našeho experimentu bude využit např. pro testování účinnosti léků a dalších prostředků ke korekci negativních důsledků perinatální hypoxicko–ischemické encefalopatie. Tato zjištění by později mohla vést ke zlepšení léčby pacientů s HIE u lidské populace.

Výsledky této studie využitelné i pro klinickou praxi a zejména pro obor fyzioterapie. Získané poznatky (zvýšená anxiozita, deficit dlouhodobé paměti a narušená behaviorální flexibilita) mohou pomoci při volbě správné strategie léčby a vhodného terapeutického přístupu při práci s jedinci po perinatálním HI infultu, ať už je jeho následkem ADHD, schizofrenie, mozková obrna či autismus. Pacienti s poruchou kognitivní flexibility, která byla v našem experimentu prokázána, nemají poruchu učení a přijímání nových informací. Nejsou však schopni na základě nových informací modifikovat své chování při změně určité situace.

## Bibliografie

AISEN, M. L. et al. Cerebral palsy clinical care and neurological rehabilitation. *Lancet neurology* [online]. 2011, vol. 10, no. 9, s. 844–852 [cit. 2018–12–19]. ISSN 1474–4422. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70176-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70176-4)

ALEXANDER, M. et al. Behavioral and histological outcomes following neonatal HI injury in a preterm (P3) and term (P7) rodent model. *Behavioural Brain Research* [online]. 2014, vol. 259, s. 85–96 [cit. 2018–11–23]. ISSN 0166–4328. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906857/>

ALIMOVIC, S., JURIC, N. a BOŠNJAK, V. M. Functional vision in children with perinatal brain damage. *The Journal of Maternal–Fetal & Neonatal Medicine* [online]. 2014, vol. 27, no. 14, s. 1491–1494 [cit. 2019–01–17]. ISSN 1476–4954. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14767058.2013.863863>

ALMEIDA, K. A. et al. Effects of interventions with therapeutic suits (clothing) on impairments and functional limitations of children with cerebral palsy: a systematic review. *Brazilian Journal of Physical Therapy* [online]. 2017, vol. 21, no. 5, s. 307–320 [cit. 2019–01–22]. ISSN 1809–9246. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413355517302484?via%3Dihub>

ALTMAN, J. & SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour* [online]. 1975, vol. 23, s. 896–920 [cit. 2018–11–10]. ISSN 0003–3472. Dostupné z: <https://www.journals.elsevier.com/animal-behaviour>

ANAND, K. S. a DHIKAV, V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology* [online]. 2012, vol. 15, no. 4, s. 239–246 [cit. 2019–01–05]. ISSN 1998–3549. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3548359/>.

ARMSTRONG–WELLS, J. et al. Neurocognitive outcomes following neonatal encephalopathy. *Neurorehabilitation* [online]. 2010, vol. 26, no. 1, s. 27–33 [cit. 2018–12–27]. ISSN 1053–8135. Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=a237fc2f-0e0d-4cfe-9c6f-56797e2f7e40%40sdc-v-sessmgr04>

AUJLA, P. K. et al. Talampanel suppresses the acute and chronic effects of seizures in a rodent neonatal seizure model. *Epilepsia* [online]. 2009, vol. 50, no. 4, s. 694–701 [cit. 2018–06–18]. ISSN 1528–1167. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1528-1167.2008.01947.x>

BADAWI, N. et al. Autism following a history of newborn encephalopathy: more than a coincidence? *Developmental Medicine and Child Neurology* [online]. 2006, vol. 48, no. 2, s. 85–89 [cit. 2018–12–28]. ISSN 1469–8749. Dostupné z: <https://sci-hub.tw/10.1017/s001216220600020x>

BALDUINI, W. et al. Long lasting behavioral alterations following a hypoxic/ ischemic brain injury in neonatal rats. *Brain Research* [online]. 2000, vol. 859, no. 2, s. 318–325 [cit. 2019–02–13]. ISSN 0006–8993. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899300019971?via%3Dihub>

BALLESTER–PLANÉ, J. Measirung intellectual ability in cerebral palsy: The comparison of three test and their neuroimaging correlates. *Research in Developmental Disabilities* [online]. 2016, vol. 56, s. 83–98 [cit. 2019–01–21]. ISSN 0891–4222. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891422216300798?via%3Dihub>

BANNERMAN, D. M. et al. Regional dissociations within the hippocampus–memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* [online]. 2004, vol. 28, no. 3, s. 273–283 [cit. 2019–01–06]. ISSN 0149–7634. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149763404000314>

BASU, A. P. et al. Early Intervention to Improve Hand Function in Hemiplegic Cerebral Palsy. *Frontiers in Neurology* [online]. 2015, vol. 5, art. 281 [cit. 2019-01-20]. ISSN 0091-3022. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4285072/>.

BAX, M. et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Developmental medicine and child neurology* [online]. 2005, vol. 47, no. 8, s. 571-576 [cit. 2018-12-18]. ISSN 0012-1622. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8749.2005.tb01195.x/epdf>

BENNET, L. et al. Neural plasticity and the Kennard principle: does it work for the preterm brain? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* [online]. 2013, vol. 40, no. 11, s. 774-784 [cit. 2019-01-14]. ISSN 03051870. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23735123>.

BIRELL, J. M. a BROWN, V. J. Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. *The Journal of Neuroscience* [online]. 2000, vol. 20, no. 11, s. 4320-4324 [cit. 2019-02-20]. ISSN 1529-2401. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/20/11/4320.long>

BONA, E. et al. Sensorimotor Function and Neuropathology Five to Six Weeks after Hypoxia-Ischemia in Seven-Day-Old Rats. *Pediatric Research* [online]. 1997, vol. 42, no. 5, s. 678-683 [cit. 2019-01-14]. ISSN 1530-0447. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/pr19972554>

BRIMA, T., MIKULECKÁ, A a OTÁHAL, J. Impacts of Perinatal Induced Photothrombotic Stroke on Sensorimotor Performance in Adult Rats. *Physiological Research* [online]. 2013, vol. 62, no. 1, s. 85-94 [cit. 2019-01-14]. ISSN 1802-9973. Dostupné z: [http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/62/62\\_85.pdf](http://www.biomed.cas.cz/physiolres/pdf/62/62_85.pdf)

BURKE, R. E. Programmed cell death and new discoveries in the genetic of parkinsonism. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2008, vol. 104, no. 4, s. 875–890 [cit. 2018–09–24]. ISSN 1471–4159. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082499/>

CALAMANDREI, G. Ethological and methodological considerations in the use of newborn rodents in biomedical research. *Ann Ist Super Sanita* [online]. 2004, vol. 40, no. 2, s. 195–200 [cit. 2018–11–2]. ISSN 2384–8553. Dostupné z: <http://old.iss.it/publ/anna/2004/2/402195.pdf>

CASEY, B. M. et al. The continuing value of the apgar score for the assessment of newborn infants. *The New England Journal of Medicine* [online]. 2001, vol. 344, no. 7, s. 467–471 [cit. 2018–10–28]. ISSN 1533–4406. Dostupné z: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200102153440701?url\\_ver=Z39.882003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM200102153440701?url_ver=Z39.882003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dwww.ncbi.nlm.nih.gov)

CERIO, F. G. de et al. Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic–ischemic brain injury. *Brain Sciences* [online]. 2013, vol. 3, no.1, s. 191–214 [cit. 2019–01–15]. ISSN 2076–3425. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4061821/>

CLARAC, F. et al. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews* [online]. 1998, vol. 28, no. 1–2, s. 35–43 [cit. 2018–09–24]. ISSN 0165–0173. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.is.cuni.cz/science/article/pii/S0165017398000241>

DESTRIEUX, C. et al. Surgical anatomy of the hippocampus. *Neurochirurgie* [online]. 2013, vol. 59, no. 4–5, s. 149–158 [cit. 2019–01–05]. ISSN 0028–3770. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028377013000854>

D'HOOGHE, R. a DEYN, P. P. de. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* [online]. 2001, vol. 36, no. 1, s. 60–90 [cit. 2019–02–20]. ISSN 0165–0173. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165017301000674>

DOUGLAS-ESCOBAR, M. a WEISS, M. D. Biomarkers of hypoxic–ischemic encephalopathy in newborns. *Frontiers in Neurology* [online]. 2012, vol. 3, art. 144, s. 1–5 [cit. 2019–01–05]. ISSN 1664–2295. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2012.00144/full>

EYLEN, L. van et al. Cognitive flexibility in autism spectrum disorder: Explaining the inconsistencies? *Research in Autism Spectrum Disorders* [online]. 2011, vol. 5, no. 4, s. 1390–1401 [cit. 2019–02–20]. ISSN 17509467. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1750946711000316>

FANG, A. Y. et al. Effects of combination therapy using hypothermia and erythropoietin in a rat model of neonatal hypoxia–ischemia. *Pediatric Research* [online]. 2013, vol. 73, no. 1, s. 12–17 [cit. 2018–09–06]. ISSN 1530–0447. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/pr2012138>

FÍŠAR, Z., HROUDOVÁ J. a RABOCH J. Úloha mitochondrií v mechanismech synaptické plasticity, buněčného poškození a poruch nálady. *Česká a slovenská psychiatrie* [online]. 2011, roč. 107, č. 1, s. 14–27 [cit. 2018–09–24]. ISSN 1212–0383. Dostupné z: <http://www.cspsychiatr.cz/detail.php?stat=691>

FLEISS, B. a GRESSENS, P. Tertiary mechanisms of brain damage: a new hope for treatment of cerebral palsy. *THE LANCET Neurology* [online]. 2012, vol. 11, no. 6, s. 556–566 [cit. 2018–09–24]. ISSN 1474–4422. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442212700583>



GÁL, O., HOSKOVCOVÁ, M. a JECH, R. Neuroplasticita, restituce motorických funkcí a možnosti rehabilitace spastické parézy. *Rehabilitace a fyzikální lékařství* [online]. 2015, roč. 22., č. 3., s. 101–127 [cit. 2019–01–20]. ISSN 1803–6597. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/rehabilitace-fyzikalni-lekarstvi/2015-3/neuroplasticita-restituce-motoricky-funkci-a-moznosti-rehabilitace-spasticke-parezy-55870>

GEISLER, H. C. et al. Development posture in the rat. *Acta neurobiologiae experimentalis* [online]. 1993, vol. 53, no. 4, s. 517–523 [cit. 2018–10–17]. ISSN 1689–0035. Dostupné z: <https://www.ane.pl/pdf/5362.pdf>

GEWIES, A. Introduction to Apoptosis. *ApoReview* [online]. 2003, s. 1–26. Dostupné z: [http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/apoptosis\\_new.pdf](http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/apoptosis_new.pdf)

GONZALEZ, F. F. a MILLER, S. P. Does perinatal asphyxia impair cognitive function without cerebral palsy? *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* [online]. 2006, vol. 91, no. 6, s. 454–459 [cit. 2018–12–28]. ISSN 1468–2052. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672766/>

GROENENDAAL, F. a VRIES, L. S. de. Hypoxic–Ischemic Encephalopathy. In: MARTIN, R. J., FANAROFF, A. A. a WALSH, M. C. *Neonatal–Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant*. 10. Philadelphia: EL SEVIER SAUNDERS, 2015, s. 904–927. ISBN 978–1–4557–5617–9.

HAGBERG, H. et al. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nature Reviews Neurology* [online]. 2015, vol. 11, no. 4, s. 192–208 [cit. 2018–09–24]. ISSN 1759–4766. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4664161/>

HAGBERG, H. et al. Perinatal brain damage: The term infant. *Neurobiology of Disease* [online]. 2016, vol. 92, Pt. A, s. 102–112 [cit. 2018–09–24]. ISSN 0969–9961. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4915441/>

HANDEL, M. et al. Long term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia a review. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2007, vol. 166, no. 7, s. 645–654 [cit. 2018–09–24]. ISSN 1432–1076. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1914268/>

HIGGINS, R. S. et al. Hypothermia and Other Treatment Options for Neonatal Encephalopathy: An Executive Summary of the Eunice Kennedy Shriver NICHD Workshop. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2011, vol. 159, no. 5, s. 851–858 [cit. 2018–01–15]. ISSN 0022–3476. Dostupné z: [https://www.jpeds.com/article/S0022–3476\(11\)00786–4/fulltext](https://www.jpeds.com/article/S0022-3476(11)00786-4/fulltext)

HUANG, H. Z. et al. Long term cognitive impairment and myelination deficiency in rat model of perinatal hypoxic–ischemic brain injury. *Brain research* [online]. 2009, vol. 1301, s. 100–109 [cit. 2018–11–12]. ISSN 0006–8993. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899309018800>

HUANG, H. Z., WEN, X. H. a LIU, H. Sex differences in brain MRI abnormalities and neurodevelopmental outcomes in a rat model of neonatal hypoxia–ischemia. *International Journal of Neuroscience* [online]. 2015, vol. 126, no. 7, s. 1–11 [cit. 2018–23–11]. ISSN 1543–5245. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/00207454.2015.1047016?needAccess=true>

HÜPPI, P.S. a GRESSENS, P. White Matter Damage and Encephalopathy of Prematurity. In: MARTIN, R. J., FANAROFF, A. A. a WALSH, M. C. *Neonatal–Perinatal Medicine: Diseases of the Fetus and Infant*. 10. Philadelphia: ELSEVIER SAUNDERS, 2015, s. 866–885. ISBN 978–1–4557–5617–9

JACOBS, S. E. et al. Whole–Body Hypothermia for Term and Near–Term Newborns With Hypoxic–Ischemic Encephalopathy: A Randomized Controlled Trial. *OBSTETRICAL & GYNECOLOGICAL SURVEY* [online]. 2011, vol. 66, no. 12, s. 743–744 [cit. 2019–01–14]. ISSN 1533–9866. Dostupné z: <https://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.32.1b/ovidweb.cgi>

JAMON, M. The early development of motor control in neonate rat. *Comptes Rendus Palevol* [online]. 2006, vol. 5, no. 3–4, s. 657–666 [cit. 2018–11–09]. ISSN 1631–0683. Dostupné z: <https://sci-hub.tw/10.1016/j.crpv.2005.11.018>

JAMON, M. a CLARAC, F. Early Walking in the Neonatal Rat: A Kinematic Study. *Behavioral neuroscience* [online]. 1998, vol. 112, no. 5, s. 1218–1228 [cit. 2018–11–06]. ISSN 1939–0084. Dostupné z: <http://eds.a.ebscohost.com/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=2&sid=602617b4-d5b1-456b-ab34-d6cb2f381062%40sdc-v-sessmgr03>

JANOTA, J., a STRAŇÁK, Z. *Neonatologie*. Praha: Mladá fronta a.s.: 2013. ISBN 978–80–204–2994–0

JANSEN, E. M a LOW, W. C. Long–term effects of neonatal ischemic–hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behavioural brain Research* [online]. 1996, vol. 78, no. 2, s. 189–194 [cit. 2018–11–17]. ISSN 0166–4328. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166432895002480?via%3Dihub>

JEŽOVÁ, M. a FEIT, J. Atlas patologie novorozence: Porodní asfyxie (časný asfyktický syndrom). *Atlases – PATHOLOGY IMAGES: Collection of high resolution histological pictures* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2013 [cit. 2018–10–20]. Dostupné z: [https://atlases.muni.cz/atlases/novo/atl\\_cz/novorasyfycas.html](https://atlases.muni.cz/atlases/novo/atl_cz/novorasyfycas.html)

KIRTON, A. a VEBER, G. de. Life After Perinatal Stroke. *Stroke* [online]. 2013, vol. 44, no.11, s. 3265–3271 [cit. 2018–01–14]. ISSN 0039–2499. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.113.000739>

KLEINMANS M. a BILKEY, D. K. Reversal learning impairments in the maternal immune activation rat model of schizophrenia. *Behavioral Neuroscience* [online]. 2018, vol. 132, no. 6, s. 520–525 [cit. 2019–02–20]. ISSN 1939–0084. Dostupné z: <https://search-ebshost-com.ezproxy.is.cuni.cz/login.aspx?authtype=shib&custid=s1240919&profile=eds>.

KOLÁŘ, P. et al. *Rehabilitace v klinické praxi*. Praha: Galén, c2009. ISBN 978–80–7262–657–1.

LEVINE, S. Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. *The American Journal of Pathology* [online]. 1960, vol. 36, no. 1, s. 1–17 [cit. 2018–10–07]. ISSN 0002–9440. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1942188/?page=1>

LINDSTRÖM, K. et al. Moderate neonatal encephalopathy: Pre– and perinatal risk factors and long–term outcome. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* [online]. 2010, vol. 87, no 5, s. 503–509 [cit. 2018–12–28]. ISSN 1600–0412. Dostupné z: <https://obgyn.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1080/00016340801996622>

LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic–ischemic injury. *Behavioural Brain Research* [online]. 2005, vol. 157, no.1, s. 157–165 [cit. 2018–11–17]. ISSN 0166–4328. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432804002530>

MARLOW, N. et al. Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. *Archives of disease in childhood–fetal and neonatal edition* [online]. 2005, vol. 90, no. 5, s. 380–387 [cit. 2018–12–18]. ISSN 1359–2998. Dostupné z: <https://fn.bmj.com/content/fetalneonatal/90/5/F380.full.pdf>

MARTINS, E. et al. Efficacy of suit therapy on functioning in children and adolescents with cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Developmental medicine & Child neurology* [online]. 2016, vol. 58, no. 4, s. 348–360 [cit. 2019–01–22]. ISSN 1469–8749. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dmcn.12988>

MARTINEZ–BIARGE, M et. al. Predicting motor outcome and death in term hypoxic–ischemic encephalopathy. *NEUROLOGY* [online]. 2011, vol. 76, no. 24, s. 2055–2061 [cit. 2018–09–05]. ISSN 1526632X. Dostupné z: <http://n.neurology.org/content/76/24/2055.short>

MARY, A. et al. Executive and attentional contributions to Theory of Mind deficit in attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD). *Child Neuropsychology* [online]. 2016, vol. 22, no. 3, s. 345–365 [cit. 2018–09–05]. ISSN 1744–4136. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/full/10.1080/09297049.2015.1012491>

MAXWELL, K. A. a DYCK, R. H. Induction of reproducible focal ischemic lesions in neonatal mice by photothrombosis. *Developmental Neuroscience* [online]. 2005, vol. 27, no. 2–4, s. 121–126 [cit. 2018–01–20]. ISSN 0736–5748. Dostupné z: <https://sci-hub.tw/10.1159/000085983>

MIKULECKÁ, A. et al. Consequences of early postnatal benzodiazepines exposure in rats. I. Cognitive–like behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* [online]. 2014, vol. 8, art. 101, s. 1–9 [cit. 2019–02–05]. ISSN 1663–4365. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975106/>

MORALES, P et al.. Plasticity of hippocampus following perinatal asphyxia: Effects on postnatal apoptosis and neurogenesis. *Journal of neuroscience research* [online]. 2008, vol. 86, no. 12, s. 2650–2662 [cit. 2018–12–02]. ISSN 1097–4547. Dostupné z: <https://onlinelibrary-wiley-com.ezproxy.is.cuni.cz/doi/full/10.1002/jnr.21715>

MOSTER, D., LIE R. T. a MARKESTAD, T. Joint association of Apgar scores and early neonatal symptoms with minor disabilities at school age. *Archives of Disease in Childhood–Fetal and Neonatal Edition* [online]. 2002, vol. 86, no. 1, s. 16–21 [cit. 2018–10–28]. ISSN 1468–2052. Dostupné z: <https://fn.bmj.com/content/86/1/F16.info>

MUIR, G. D. Early ontogeny of locomotor behaviour: A comparison between altricial and precocial animals. *Brain Research Bulletin* [online]. 2000, vol. 53, no. 5, s. 719–726 [cit. 2018–11–08]. ISSN 0361–9230. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923000004044>

MUNTAU, C. A. *Pediatric*. 1. Praha: Grada, 2009, 581 s. ISBN 978–80–247–2525.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal* [online]. 2009, vol. 417, no. Pt 1, s. 1–13 [cit. 2018–09–24]. ISSN 1470–8728. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605959/>

NATARAJAN, G. et al. Apgar scores at 10 min and outcomes at 6–7 years following hypoxic– ischemic encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* [online]. 2013, vol. 98, no. 6, s. 473–479 [cit. 2018–10–28]. ISSN 1468–2052. Dostupné z: <https://fn.bmj.com/content/98/6/F473.long>

NELSON, K. B. The epidemiology of cerebral palsy in term infants. *Mental Retardation & Developmental Disabilities Research Reviews* [online]. 2002, vol. 8, no. 3, s. 146–150 [cit. 2018–09–24]. ISSN 1080–4013. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/mrdd.10037>

NOVAK, I. et al. Clinical Prognostic Messages from a systematic review on Cerebral Palsy. *Pediatrics* [online]. 2012, vol. 130, no. 5 [cit. 2019–01–21]. ISSN 1098–4275. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/content/130/5/e1285.long>

NOVAK, I. et al. A systematic review of interventions for children with cerebral palsy: state of the evidence. *Developmental medicine & Child neurology* [online]. 2013, vol. 55, no. 10, s. 885–910 [cit. 2019–01–22]. ISSN 1469–8749. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dmcn.12246>

POTHUIZEN, H. H. J. et al. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within–subject, within–task comparison of reference and working spatial memory. *European Journal of Neuroscien* [online]. 2004, vol. 19, no. 3, s. 705–712 [cit. 2019–06–01]. ISSN 1460–9568. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.0953–816X.2004.03170.x>

PRESTON, A. R. a EICHENBAUM, H. Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current biology* [online]. 2014, vol. 23, no. 17, s. 764–773 [cit. 2019–02–13]. ISSN 0960–9822. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3789138/#R66>

RICE, J. E. et al. The influence of immaturity on hypoxic–ischemic brain damage in the rat. *Annals of NEUROLOGY* [online]. 1981, vol. 9, no. 2, s. 131–141 [cit. 2018–12–02]. ISSN 1531–8249. Dostupné z: <https://sci-hub.tw/10.1002/ana.410090206>

RICH, E. L. a SHAPIRO, M. L. Prelimbic/Infralimbic inactivation impairs memory for multiple task switches, but not flexible selection of familiar tasks. *Journal of Neuroscience* [online]. 2007, vol. 27, no. 17, s. 4747–4755 [cit. 2019–02–13]. ISSN 1529–2401. Dostupné z: <http://www.jneurosci.org/content/27/17/4747.long>

ROBERTSON, C. M. a PERLMAN, M. Follow-up of the term infant after hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatric Child Health* [online]. 2006, vol. 11, no. 5, s. 278–282 [cit. 2018–12–28]. ISSN 1751–7222. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518676/>

ROCHA-FERREIRA, E. a HRISTOVA, M. Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. *Neural Plasticity* [online]. 2016, vol. 2016, s. 1–16 [cit. 2019–01–14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2016/4901014>.

ROZTOČIL, A. et al. *Moderní porodnictví*. 2. vydání. Praha: Grada, 2017. ISBN 978–80–271–9757–6.

SANDERSON T. H. et al. Molecular mechanisms of ischemie-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular Neurobiology* [online]. 2013, vol. 47, no. 1, s. 9–23 [cit. 2018–01–09]. ISSN 1559–1182. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3725766/>

SANCHES, E. F. et al. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. *Neuroscience* [online]. 2013, vol. 237, May, s. 208–215 [cit. 2018–11–24]. ISSN 0306–4522. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452213001103>

SHAH, K. D. et al. Raised Plasma Neurofilament Light Protein Levels Are Associated with Abnormal MRI Outcomes in Newborns Undergoing Therapeutic Hypothermia. *Frontiers in Neurology* [online]. 2018, vol. 9, art. 86, s. 1–9 [cit. 2019–01–14]. ISSN 1664–2295. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5844939/>

SIMBRUNER, G. et al. Systemic Hypothermia After Neonatal Encephalopathy: Outcomes of neo.nEURO.network RCT. *PEDIATRICS* [online]. 2010, vol. 126, no. 4, s. 771–778 [cit. 2019–01–14]. ISSN 1098–4275. Dostupné z: <https://sci-hub.tw/10.1542/peds.2009–2441>



SHALAK, L a PERLMAN, J. M. Hypoxic–ischemic brain injury in the term infant–current concepts. *Early Human Development* [online]. 2004, vol. 80, no. 2, s. 125 – 141 [cit. 2019–01–14]. ISSN 0378–3782. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037837820400101X?via%3Dihub>

SKOFF, R. P. et al. Plasticity of Neurons and Glia Following Neonatal Hypoxic–Ischemic Brain Injury in Rats. *Neurochemical Research* [online]. 2007, vol. 32, no. 2, s. 331–342 [cit. 2018–01–12] ISSN 1573–6903 Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9188-6>

SMRČKA, M. *Patofyziologie mozkové ischemie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 63 s. Edice kontinuálního vzdělávání v medicíně. ISBN 978–80–210–4450–0.

SPRENG, M. et al. Spaced training facilitates long–term retention of place navigation in adult but not in adolescent rats. *Behavioural brain research* [online]. 2002, vol. 128, no. 1, s. 103–108 [cit. 2018–02–28]. ISSN 0166–4328. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432801002662>

SUKHANOVA, I. A. et al. The Acute and Delayed Effects of Perinatal Hypoxic Brain Damage in Children and in Model Experiments with Rodents. *Neurochemical journal* [online]. 2016, vol. 10, no. 4, s. 276–292 [cit. 2018–10–12]. ISSN 1819–7124. Dostupné z: <https://link-springer-com.ezproxy.is.cuni.cz/article/10.1134/S1819712416040127>

ŠLAPAL, R. Ischemické cévní mozkové příhody u dětí. *Pediatric pro praxi* [online]. 2012, vol. 50, no. 5, p. 553–562 [cit. 2018–10–21]. ISSN 1803–5264. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2012/04/06.pdf>

TANAKA, H., MORI, S. a KIMURA, H. Developmental changes in the serotonergic innervation of hindlimb extensor motoneurons in neonatal rat. *Developmental Brain Research* [online]. 1992, vol. 65, no. 1, s. 1–12 [cit. 2018–11–06]. ISSN 0165–3806. Dostupné z: [https://sci-hub.tw/10.1016/0165-3806\(92\)90002-e](https://sci-hub.tw/10.1016/0165-3806(92)90002-e)

TELLO-RAMOS, M. C. et al. Spatial memory and cognitive flexibility trade-offs: to be or not to be flexible, that is the question. *Animal Behaviour* [online]. 2019, vol. 147, s. 129–136 [cit. 2019–02–21]. ISSN 0003–3472. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347218300691>

The Limbic System: (Integrative Systems) Part 1. *What-when-how: In Depth Tutorials and Information*[online]. The-Crankshaft Publishing,1999 [cit. 2019–01–28]. Dostupné z: <http://what-when-how.com/neuroscience/the-limbic-system-integrative-systems-part-1/>

TULVIG, E. Episodic and semantic memory. In E. Tulving & W. Donaldson. *Organization of memory*. Oxford, England: Academic Press, 1972, s. 38–403. ISBN: 0127036504

VANNUCCI, R. C. a VANNUCCI, S. J. A Model of Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1997, vol. 835, no. 1, s. 234–249 [cit. 2018–11–25]. ISSN 1749–6632. Dostupné z: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48634.x>

VANNUCCI, R. C. et al. Effect of Extreme Hypercapnia on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Immature Rat. *Pediatric Research* [online]. 2001, vol. 49, no.6, s. 799–803 [cit. 2018–11–25]. ISSN 1530–0447. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/pr2001130>

VÁZQUEZ–BORSETTI, P. et al. Deep hypothermia reverses behavioral and histological alterations in a rat model of perinatal asphyxia. *The Journal of Comparative Neurology* [online]. 2019, vol. 527, no. 2, s. 362–371 [cit. 2019–01–25]. ISSN 1096–9861. Dostupné z: <https://sci-hub.tw/10.1002/cne.24539>

VINAY, L. et al. Perinatal Development of the Motor Systems Involved in Postural Control. *Neural plasticity* [online]. 2005, vol. 12, no. 2–3, s. 131–139 [cit. 2018–11–1]. ISSN 1687–5443. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2565459/pdf/NP-12-131.pdf>

VOLPE, J. J. Neurobiology of Periventricular Leukomalacia in the Premature Infant. *Pediatric research* [online]. 2001, vol. 50, no. 5, s. 553–562 [cit. 2018–10–02]. ISSN 1530–0447. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/pr2001219>

VORHEES CH. V. a WILLIAMS, T. M. Morris water maze procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols* [online]. 2006, vol. 1, no. 2, s. 848–858 [cit. 2019–02–13]. ISSN 1750–2799. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2895266/>

VYLETĚLOVÁ, I. *Funkční testování po experimentálně vyvolané fokální mozkové ischemii u laboratorního potkana*. Praha, 2017. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Fakulta tělesné výchovy a sportu. Vedoucí práce Jakub Otáhal.

WEEKE, L. C. et al. The aetiology of neonatal seizures and the diagnostic contribution of neonatal cerebral magnetic resonance imaging. *Developmental Medicine & Child Neurology* [online]. 2015, vol. 57, no. 3, s. 248–256 [cit. 2019–01–19]. ISSN 1469–8749. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/dmcn.12629>.

ZAGHLOUL, N., PATEL, H. a AHMED, M. N. A model of Periventricular Leukomalacia (PVL) in neonate mice with histopathological and neurodevelopmental outcomes mimicking human PVL in neonates. *Plos One* [online]. 2017, vol. 12, no. 4, s. 1–15 [cit. 2019–01–10]. ISSN 1932–6203. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175438>

ZHANG, W. N. et al. Dissociation of function within the hippocampus: Effects of dorsal, ventral and complete excitotoxic hippocampal lesions on spatial navigation. *Neuroscience* [online]. 2004, vol. 127, no. 2, s. 289–300 [cit. 2019–02–15]. ISSN 0306–4522. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452204003690>

ZHANG, Q. et al. Creating Rat Model for Hypoxic Brain Damage in Neonates by Oxygen Deprivation. *Plos one* [online]. 2013, vol. 8, no. 12, s. 1–14 [cit. 2018–11–29]. ISSN 1932–6203. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0083589&type=printable>

ZHOU, W. H. et al. Selective Head Cooling with Mild Systemic Hypothermia after Neonatal Hypoxic–Ischemic Encephalopathy: A Multicenter Randomized Controlled Trial in China. *The Journal of Pediatrics* [online]. 2010, vol. 157, no. 3, s. 367–372 [cit. 2019–01–14]. ISSN 0022–3476. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022347610002842>

ZHU, A. H. et al. Systematic Evaluation of Hypoxic–Ischemic Brain Injury in Neontala Rats. *Cell Biochem Biophys* [online]. 2013, vol. 69, no. 2, s. 295–301 [cit. 2018–10–19]. DOI: 10.1007/s12013–013–9798–y. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12013–013–9798–y>