

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

OVLIVŇUJE STATUS EPILEPTICUS  
V PRŮBĚHU ČASNÉHO POSTNATÁLNÍHO OBDOBÍ  
PSYCHOMOTORICKÝ VÝVOJ LABORATORNÍHO POTKANA?

Diplomová práce

Autor: Bc. Lenka Bořchová, obor fyzioterapie

Vedoucí práce: doc. PharmDr. H. Kubová, DrSc.

Praha 2013

## **Bibliografická identifikace**

**Jméno a příjmení autora:** Bc. Lenka Bořchová

**Název diplomové práce:** Ovlivňuje status epilepticus v průběhu časného postnatálního období psychomotorický vývoj laboratorního potkana?

**Pracoviště:** Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

**Vedoucí diplomové práce:** Doc. PharmDr. H. Kubová, DrSc.

**Rok obhajoby diplomové práce:** 2013

**Abstrakt:** Cílem studie bylo zhodnotit vliv epileptického statu (status epilepticus, SE) probíhajícího v časně fázi postnatálního vývoje na psychomotorický vývoj laboratorního potkana. Experimentálně vyvolaný SE je nejčastějším modelem epileptogeneze, tedy procesu vedoucího ke vzniku epilepsie a typických komorbidit. Vliv časného SE byl studován na lithium/pilokarpinovém modelu epileptického statu indukovaném u 12-ti denních mláďat potkana, u nichž byly sledovány výsledky „open field“ testu do 32. dne života, tedy až do začátku puberty. Hodnoceny byly změny kognice, celkové lokomoce a projevy anxiety. Výsledky ukazují, že v krátkých intervalech po SE (do 1 měsíce) nedochází ke zhoršení kognitivních funkcí ve smyslu poruchy habituace, byla však zjištěna krátkodobá tendence k hyperaktivitě a zhoršená přizpůsobivost experimentálním podmínkám z důvodu zvýšení anxiety zvířat. Motoricky se SE zvířata nelišila od kontrolní skupiny.

**Klíčová slova:** status epilepticus, open field, habituace, psychomotorický vývoj, potkan

Souhlasím s půjčováním diplomové práce v rámci knihovních služeb.

Bibliografická identifikace v angličtině

**Author's first name and surname:** Lenka Bořchová, BA

**Title of the master thesis:** Does status epilepticus during early postnatal period influence laboratory rat psychomotor development?

**Department:** Department of Rehabilitation and Exercise Medicine

**Supervisor:** doc. PharmDr. H. Kubová, DrSc.

**The year of presentation:** 2013

**Abstract:** The purpose of this study is to evaluate the influence of status epilepticus (SE) in postnatal development early phase on laboratory rat psychomotor development. Experimentally caused (SE) is the most common mode of epileptogenesis, which is the process leading to the epilepsy creation, and typical comorbidities. The influence of the early SE was studied when using lithium/pilocarpine model of SE induced on 12 days old rat cubs, which were repeatedly exposed to the "open field" test until 32<sup>nd</sup> day of their lives that means until the puberty beginning. The evaluation is focused on cognition and overall locomotion changes and anxiety demonstrations. The results show that in short periods after SE (up to 1 month) the cognitive functions regarding the habituation disorder are not worsened. However, hyperactivity short-term disposition and worse adaptability to experimental conditions due to animal anxiety increase were detected. Motor skills of SE animals and the control group did not differ.

**Keywords:** status epilepticus, open field, habituation, psychomotor development, rat

I agree the thesis paper to be lent within the library service.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. PharmDr. H. Kubové, DrSc., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky.

V Praze dne 2013

.....

Lenka Bot'chová, v.r.

Diplomová práce byla vypracována na Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu  
AV ČR, v. v. i. v rámci řešení grantu P302/10/0971 GAČR

Poděkování autora:

Velice děkuji své vedoucí práce doc. PharmDr. H. Kubové, DrSc. nejen za cenné rady a návrhy při vedení a zpracování diplomové práce, ale i velkou míru trpělivosti. Dále potom RNDr. Anně Mikulecké, PhD. za důležité rady ohledně chování zvířat a pomoc při statistickém zpracování výsledků. V neposlední řadě děkuji za pomoc svojí pacientce MUDr. Aleně Zumrové za cenné rady při formálních úpravách textu, stejně tak jako svému manželovi. Svojí rodině, především svým třem dětem děkuji za velkou trpělivost a podporu při mém studiu.

## SEZNAM ZKRATEK

AED antiepileptika

ANOVA „ANalysis Of Variance“ analýza rozptylu

C „control“

D „day“ den

CNS centrální nervový systém

DMO dětská mozková obrna

EEG elektrencefalogram

GABA kyselina gamaaminomáselná

ILAE International league against epilepsy

KA „kainat acid“ kyselina kainátová

LiCl chlorid lithia

OF „open field“

P postnatální den

SE status epilepticus

SSSE soběstačný status epilepticus

TBI „traumatic brain injury“ poranění mozku

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>2 EPILEPSIE</b> .....	<b>- 11 -</b>
2.1 DEFINICE EPILEPSIE .....	- 11 -
2.2 EPIDEMIOLOGIE .....	- 14 -
2.3 IKTOGENEZE A EPILEPTOGENEZE .....	- 16 -
2.4 LÉČBA.....	- 20 -
<b>3 STATUS EPILEPTICUS</b> .....	<b>- 22 -</b>
3.1 DEFINICE EPILEPTICKÉHO STATU .....	- 22 -
3.2 EPIDEMIOLOGIE EPILEPTICKÉHO STATU .....	- 22 -
3.3 PATOFYZIOLOGIE EPILEPTICKÉHO STATU .....	- 23 -
3.4 DŮSLEDKY EPILEPTICKÉHO STATU PRO NEZRALÝ MOZEK .....	- 24 -
3.5 ANIMÁLNÍ MODELY EPILEPTICKÝCH ZÁCHVATŮ A EPILEPSIE.....	- 25 -
3.6 POŠKOZENÍ MOZKU V PRŮBĚHU VÝVOJE.....	- 29 -
<b>4 POSTNATÁLNÍ VÝVOJ LABORATORNÍHO POTKANA V POROVNÁNÍ S ČLOVĚKEM A KOMENTÁŘ K POUŽITÉ METODICE</b> .....	<b>- 31 -</b>
4.1 MOTORICKÝ VÝVOJ.....	- 35 -
4.2 STRUČNÝ PŘEHLED VÝVOJE LOKOMOCE .....	- 36 -
4.3 VÝVOJ UČENÍ A PAMĚTI .....	- 38 -
4.4 BEHAVIORÁLNÍ STUDIE .....	- 40 -
4.5 HABITUACE.....	- 41 -
<b>5 CÍLE A HYPOTÉZY</b> .....	<b>- 43 -</b>
<b>6 METODIKA</b> .....	<b>- 44 -</b>
6.1 ZVÍŘATA.....	- 44 -
6.2 INDUKCE STATUS EPILEPTICUS .....	- 45 -
6.3 TESTOVÁNÍ DŮSLEDKŮ ČASNÉHO SE NA VÝVOJ .....	- 46 -
6.4 „OPEN FIELD“ (OF).....	- 47 -
6.5 STATISTICKÁ ANALÝZA .....	- 50 -
<b>7 VÝSLEDKY</b> .....	<b>- 51 -</b>
7.1 VLIV SE NA RŮST ZVÍŘAT.....	- 51 -
7.2 CELKOVÁ VZDÁLENOST („DISTANCE MOVED“).....	- 52 -
7.3 ČAS STRÁVENÝ CHŮZÍ PODÉL STĚN OF („THIGMOTACTIC DURATION“).....	- 54 -
7.4 DOBA PRVNÍHO VSTUPU DO CENTRÁLNÍ ČÁSTI OF („CENTER LATENCY“) .....	- 55 -
7.5 POČET VSTUPŮ DO CENTRÁLNÍ ČÁSTI OF („CENTER FREQUENCY“).....	- 57 -
7.6 ČAS STRÁVENÝ V CENTRÁLNÍ ČÁSTI OF („CENTER DURATION“) .....	- 59 -
<b>8 DISKUSE</b> .....	<b>- 61 -</b>
<b>9 ZÁVĚR</b> .....	<b>- 68 -</b>
<b>10 REFERENČNÍ SEZNAM</b> .....	<b>- 69 -</b>



## 1 ÚVOD

Epilepsie (v češtině již téměř nepoužívaný výraz „padoucnice“ neboli „padoucí nemoc“, latinsky také morbus sacer, divinus či naopak demoniacus – svatá, božská či ďábelská choroba) je onemocnění postihující lidstvo od nepaměti a byla díky dramatickému průběhu epileptických záchvatů v popředí lékařského zájmu již od nejstarších dob. Slavný Hippokratův spis o „morbus sacer“ z doby kolem roku 400 před naším letopočtem, který jako první podrobněji pojednával o epilepsii jako o „nemoci“. V té době byly epileptické záchvaty zaměňovány za posedlost zým duchem či d'áblem.

zásadní zlom v péči o epileptické pacienty 20. století znamenalo. Pokroky v poznání biologických, biochemických a patofyziologických mechanismů epileptického záchvatu stejně jako zdokonalení neurovizuálních metod a moderní farmakoterapie spolu s potvrzením účinnosti operační léčby u farmakorezistentních pacientů v posledních letech potvrzuje důležitost epileptologie nejen jako neurologické, ale i multidisciplinární specializace.

Poškození mozku v raném dětském věku může mít například podobu obrazu dětské mozkové obrny (DMO), tedy rozličné formy motorické i mentální retardace v důsledku pre-, peri- i časné postnatální léze centrálního nervového systému nejrůznější etiologie. Je obecně známo, že takové poškození mozku může být provázeno epilepsií.

Vzhledem k tomu, že pacienti nejen s DMO, ale i dalšími chorobami postihující centrální neurony, jsou v rámci mezioborové spolupráce velmi často zároveň klienty fyzioterapeutů, je třeba být o této problematice podrobněji informován.

Zdaleka se nejedná pouze o znalost jak bazálně postupovat v případě, že dítě při vyšetření či rehabilitaci epileptický záchvat prodělává, ale znamená to i v rámci komplexního rozboru psychomotorického vývoje brát ohled na frekvenci, charakter i dobu trvání epileptických záchvatů.

Zejména je třeba podrobně anamnesticky pátrat po korelaci rozvoje záchvatového onemocnění s následným rozvojem stagnace či regrese vývoje a uvědomovat si, jak je činnost centrálního nervového systému epileptickými záchvaty ovlivňována.

Fyzioterapeut se nemůže zabývat pouze terapií motorického deficitu, musí být plnohodnotným členem léčebného týmu v péči o pacienta se specifickými problémy. Na základě vlastních praktických zkušeností s pacienty s epilepsií jsem přivítala možnost vypracovat diplomovou práci na základě provedených pokusů v rámci projektu sledujícího epileptogenicitu iniciálního inzultu i jeho neuropatologické důsledky (projekt změny angiogeneze v nezralém mozku vyvolané časným inzultem P302/10/0971 GAČR) s cílem zpracovat výsledky části provedených pokusů a tím zpřesnit poznatky o možných důsledcích prodělaného epileptického statu na další motorický a psychický vývoj pacienta. Tato studie může mít významný praktický dopad pro celý léčebný tým pacienta. Moje úloha spočívala v nastudování a shrnutí teoretických problémů spojených s tématem, poté v části praktické provedení „off- line“ analýzy chování zvířat po proběhlém SE pomocí „open field“ testu a v závěru zhodnocení výsledků včetně návrhu jejich aplikace do humánní medicíny.

## 2 EPILEPSIE

### 2.1 Definice epilepsie

Epilepsie není v současné době vnímána jako jedno onemocnění. Odborníci se spíše kloní k termínu „skupina poruch a syndromů, kterým je společný výskyt epileptických záchvatů“.

Podle mezinárodní ligy proti epilepsii (International League Against Epilepsy; ILAE) je definice jednotlivých epileptických syndromů založena na typu a historii záchvatů, přítomnosti či absenci trvalých změn v mozku, které nejen že zvyšují pravděpodobnost vzniku budoucích záchvatů, ale mohou se manifestovat na neurobiologické, kognitivní, psychologické i sociální úrovni. (Kubová, 2002; Fisher, 2005; ILAE, 2010)

Epileptické záchvaty jsou definovány jako přechodně se objevující příznaky, které jsou důsledkem nadměrné či abnormně synchronní aktivity neuronů v mozku. (Dichter, 1997)

Epileptické záchvaty mohou být provázeny:

- \* poruchami vědomí - kvalitativními i kvantitativními
- \* vznikem křečí či poruchou svalového tonu
- \* poruchou chování - automatismy
- \* poruchami vegetativními - nejrůznějšího druhu

Tyto poruchy se mohou kombinovat, nebo se vyskytují samostatně.

Záchvat může postihnout celý organismus (generalizovaný typ) nebo jen jeho část (parciální typ). (Pohl, 1992)

Výskyt jediného epileptického záchvatu nemusí ještě znamenat epilepsii. Většina lidí, kteří prodělali jeden záchvat v životě, tímto onemocněním netrpí. (Kubová, 2002) Na druhou stranu výskyt i ojedinělého epileptického záchvatu je alarmující situací v životě každého člověka. (Rektor, Ošlejšková, 2010) Je dokázáno, že člověk, který jednou prodělá epileptický záchvat má po dobu 1-2 let vyšší pravděpodobnost opakování záchvatu, než člověk který záchvat neprodělal. (Servít, 1983)

Epileptický syndrom bývá definován jako komplex společně se vyskytujícími specifickými příznaky a charakteristikami. Jeho součástí je určení typu záchvatů, popis EEG, posouzení etiologie, věkové vazby, farmakosenzitivity a předpokládané prognózy. (Kubová, 2002; přehledně Hovorka, Herman, Nežádal, 2004; přehledně Procházka, 2010)

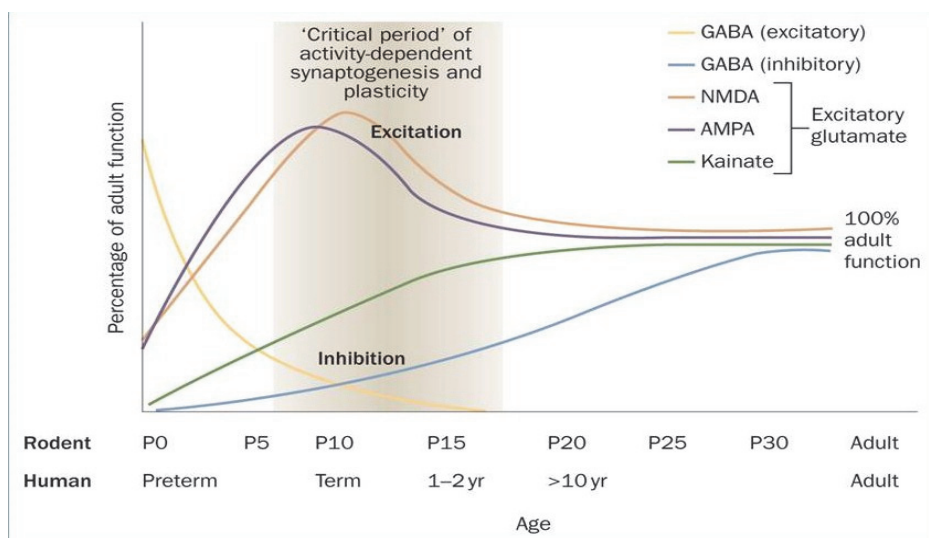
Epilepsie (ve smyslu choroba) je charakterizována trvalou predispozicí k epileptickým záchvatům se všemi (neurobiologickými, kognitivními, psychologickými a sociálními) důsledky.

Nezralý mozek snáze produkuje epileptické záchvaty, a proto začíná epilepsie u zhruba 50% epileptiků v dětském věku. Studie Hausera a kol. ukazuje, že první epileptický záchvat většinou vzniká dokonce během prvních let života (Hauser, Hessdorfer, 1990), což bylo potvrzeno i na zvířecích modelech. Větší náchylnost k produkci epileptických záchvatů je dána převahou excitace, typickou pro nezralý mozek. (Mareš, Folbergrová, Langmeier, Haugvicová, Kubová, 1997)

Z těchto důvodů má dětská epileptologie oproti „dospělé“ řadě specifík. Stupeň vývoje nervového systému dítěte je důležitou podmínkou vzniku konkrétních typů epileptických záchvatů, produkovaných EEG epileptiformních vzorců a je důležitým faktorem také pro prognózu onemocnění.

Faktor věku i stupeň vývoje mozku působí vždy v kombinaci, proto je repertoár záchvatů v dětství mnohem větší.

Obecně, i když poněkud zjednodušeně se dá říci, že čím nižší je věk nástupu epilepsie, tím horší mohou být důsledky. I vznik konkrétního epileptického syndromu, v nižší věkové kategorii než je obvyklé, může znamenat horší prognózu. Co se skrývá pod pojmem patofyziologický podklad věkového faktoru není dosud zcela jasné, ale významnou roli nepochybně hrají vývojové procesy v CNS. Tedy hlavně procesy strukturálního i funkčního utváření mozku, jakými jsou například postupná myelinizace, rozvoj neuronálních sítí a synaptických intra- i interhemisferálních propojení, vývojové změny v produkci neurotransmiterů a změny v poměru aktivity excitačních a inhibičních regulačních systémů (Obrázek 1). Vývoj CNS probíhá i postnatálně na základě genetické determinace a je individuálně dále modifikován enviromentálními a endogenními vlivy, jako třeba změnou hormonální situace v průběhu prepuberity a puberty. (Hauser, 1992)



**Obrázek 1. Schématické znázornění změn neurotransmitterových systémů v průběhu vývoje**

Obrázek 1 na předešlé straně; osa x - vývojové mezníky hlodavců ve dnech/humánní vývojové mezníky v letech, osa y - hladina neurotransmiterů vyjádřená v procentech vztažených k jejich hladině v dospělém věku (převzato Rakhade, Jensen, 2009)

## 2.2 Epidemiologie

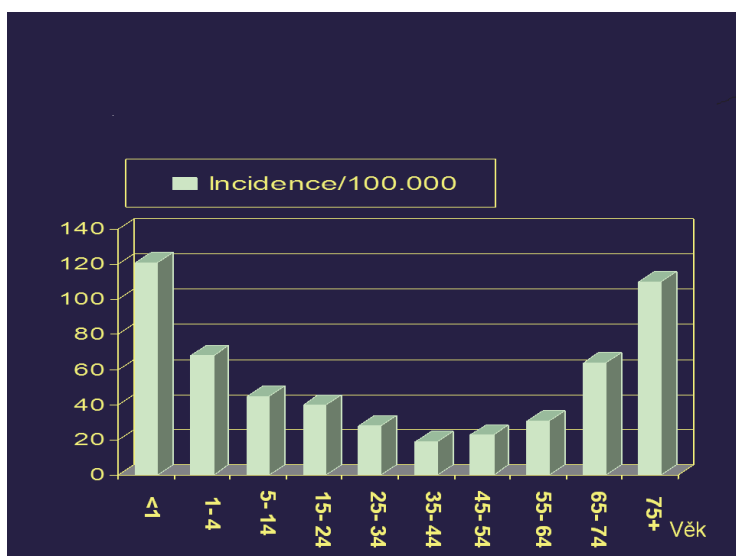
Incidence a prevalence epilepsie a epileptických záchvatů jsou výrazně závislé na věku, typu epileptických záchvatů či epilepsií a na úrovni lékařské péče v zemi, kde je výskyt sledován.

Obecně se udává, že zhruba 5% dětí do 15 let prodělá alespoň jeden epileptický záchvat, 3% dětí reagují na náhlý vzestup teploty febrilními křečemi a souhrnně téměř 1% dětí do 15 let má epilepsii s více než dvěma neprovokovanými záchvaty. (přehledně Sýkora, 2008) Nejčastějším věkově vázaným syndromem jsou febrilní křeče, které však nejsou považovány za epilepsii. (přehledně Komárek, 2007a)

Údaje o incidenci (nově diagnostikovaní pacienti s více než 2 neprovokovanými záchvaty v 1 roce na 100 000 obyvatel) a prevalenci epilepsie (počet dětí s aktivní epilepsií v daném čase na 1 000 obyvatel) mohou být i protichůdné. Krátce trvající epilepsie může mít v určitém věku vysokou roční incidenci, ale nízkou prevalenci a naopak dlouhodobé epileptické encefalopatie mají nízkou roční incidenci a vysokou prevalenci.

Incidence se ve vyspělých zemích pohybuje mezi 24-53 pacienty na 100 000 jedinců za rok. V rozvojových zemích je toto množství až trojnásobně vyšší. Na obrázku 2 je vidět, že dochází k vzestupu incidence též u starších pacientů (nad 70. let).

Důvodem je větší výskyt symptomatických epilepsií, zapříčiněných především cerebrovaskulárními poruchami, hypertenzí, tumory, neudegenerativními onemocněními, pórůrazovými stavy, ale i vlivem poruch metabolismu či zvýšeným zatížením léky.



**Obrázek 2. Incidence vzniku epilepsie na rok / 100 000 obyvatel**

Osa x - věkové rozmezí nově diagnostikovaných pacientů; osa y - počet pacientů (dle práce Hauser, Annegers, Kurland, 1991)

Na základě předchozích údajů lze předpokládat, že v současnosti žije v České republice kolem 70 tisíc pacientů s aktivní epilepsií. (přehledně Brázdil, 2004) Pravděpodobnost, že člověk někdy v průběhu života epileptický záchvat prodělá, se pohybuje kolem 9% a že onemocní epilepsií kolem 3%. (Hauser, Hesdorffer, 1990) Izolovaný epileptický záchvat však nemusí znamenat epilepsii. Záchvaty mohou příležitostně vyvolat i jiné patologické stavy (hypoglykemie, užívání návykových látek, apod.).

## 2.3 Iktogeneze a epileptogeneze

Epileptologie rozlišuje zásadními pojmy iktogenezi a epileptogenezi.

Iktogeneze je proces označující vznik a šíření epileptického záchvatu, obvykle bez ohledu na to, zda se jedná o záchvat spontánní či reaktivní, tedy vyvolaný ve zdravém mozku chemicky, elektricky či změnou vnitřního prostředí.

Pod pojmem epileptogeneze rozumíme označení procesu, vedoucího ke vzniku epilepsie jako chronického onemocnění, charakterizovaného spontánním výskytem epileptických záchvatů. Obvykle se pod tento pojem zahrnují veškeré změny, související se vznikem tohoto onemocnění od úrovně molekulární či genové, až po změny funkční (chování, schopnost učení či paměť). (Wasterlain C.G., Gloss., Niquet, Wasterlain A.S., 2013) Jako progresivní epileptogeneze se označuje děj, při kterém dochází s dobou trvání epilepsie ke zhoršování onemocnění – zvyšuje se frekvence záchvatů či jejich tíže, dochází k postupnému zhoršování mozkových funkcí (zejména paměti). (Goldberg, Coulter, 2013) Vzhledem k tomu, že právě tento proces je podkladem sledovaných parametrů, pojednává o něm podrobněji následující stat'.

Epilepsie se podle nejzákladnějšího dělení dělí na idiopatické, při jejichž vzniku se uplatňují zejména faktory genetické (změny ve struktuře receptorů hlavních neurotransmitterových systémů či iontových kanálů) a epilepsie symptomatické, u nichž byla identifikována mozková léze, vzniklá různými mechanismy (ischemické či traumatické poškození, hypoxie, apod.). Současný pohled na proces vedoucí ke vzniku epilepsie, tedy epileptogenezi, je založen především na poznatcích získaných studiem symptomatických epilepsií, kde je tento proces spuštěn některým „iniciálním inzultem“.



Ten vede k řadě změn na molekulární, celulární i strukturální úrovni, jež jsou podkladem pro vznik funkčních alterací. (přehledně Kubová, 2011)

Epileptogeneze je tedy proces, v němž inzult poškozující mozek, spouští kaskádu molekulárních a buněčných změn, které nakonec vedou ke vzniku spontánních záchvatů. Rozvoj získaného epileptického onemocnění znamená abnormální neuronální reorganizaci vyskytující se v návaznosti na konkrétní mozkový inzult. (Engel, 1989) Molekulární a buněčné změny zahrnují neurodegeneraci, neurogenezi, axonální sprouting (pučení), axonální poranění, dendritickou přestavbu, gliogenezi, invazi zánětlivých buněk, angiogenezi, změny v extracelulární matrix a změny ve struktuře receptorů či iontových kanálů. Rozsáhlé molekulární zkoumání epileptogenní tkáně poskytuje informace o molekulárních mechanismech vzniku „patologických“ buněčných změn. V současné době se zejména studují mechanismy přispívající k poúrazové epileptogenezi s cílem využít poznatky v terapii. (Pitkänen, Lukasiuk, 2009; Zámečník, 2007)

Průběh epileptogeneze se v časných stádiích postnatálního vývoje může lišit od průběhu tohoto procesu probíhajícím v mozku dospělého člověka. Epileptogeneze je vývojově regulovaná a věk, ve kterém k inzultu dojde, determinuje mechanismus odpovědi vedoucí k epileptogenezi. (Rakhade, Jensen, 2009)

Výzkum prováděný v posledních třiceti letech prokazuje, že neexistuje jediný mechanismus odpovědný za vznik epileptické aktivity. Každá forma záchvatu je do jisté míry generována odlišnou skupinou mechanismů. Je důležité rozhodnout, které mechanismy jsou klíčové pro daný epileptický fenomén bez ohledu na to, jde-li o zvířecí model či o skutečné onemocnění u člověka. Schopnost generovat epileptickou aktivitu představuje nezbytný aspekt normálního repertoáru nervových buněk.

Hyperexitabilita a hypersynchronizace představuje pouze určitou extrémní formu neuronální plasticity, která je klíčovou vlastností centrálních neuronů.

Stejné mechanismy, které se uplatňují v adaptaci, jsou zároveň podkladem pro vznik abnormálních výbojů a mozkové oblasti s dobrou plasticitou. (Kubová, 2009)

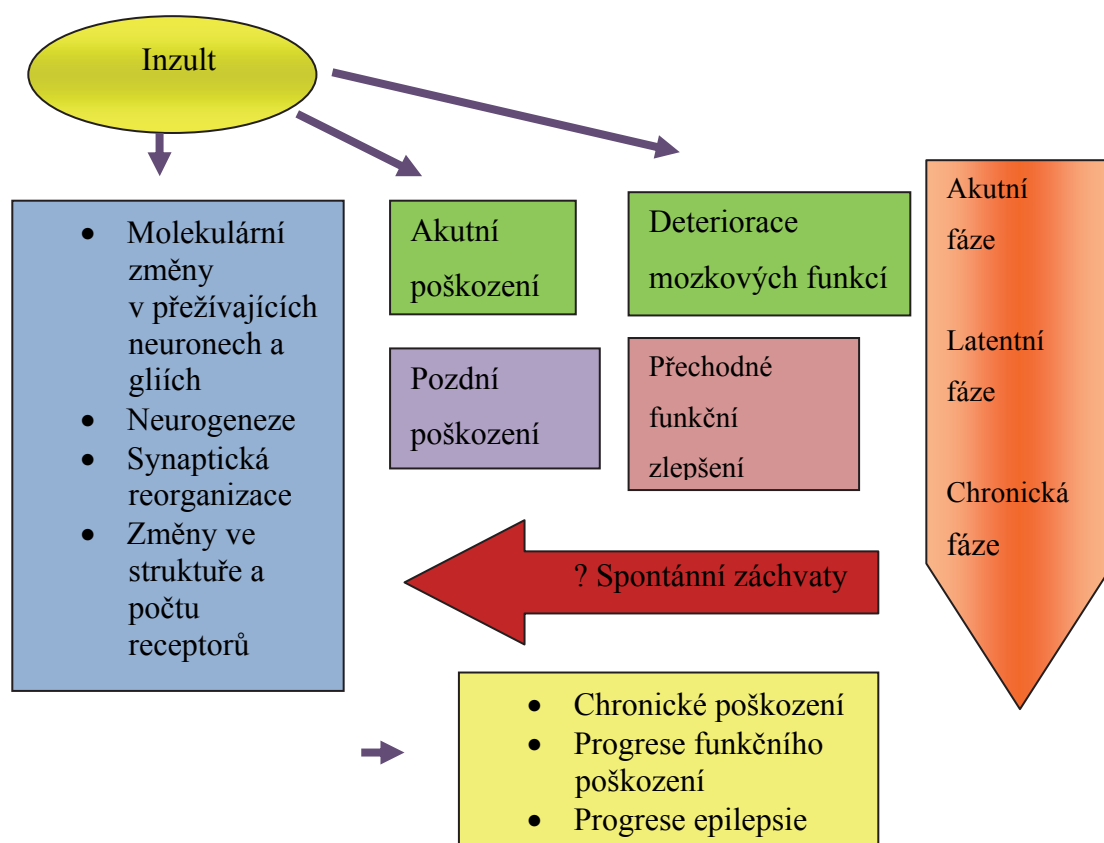
Naprostá většina komunikace mezi neurony v savčím mozku probíhá na chemické úrovni prostřednictvím neurotransmiterů. Experimentální studie ukazují, že změny v kterémkoli interaktivním mechanismu mohou vést ke vzniku abnormálních výbojů. Při vzniku epileptické aktivity se uplatňují neurotransmitery excitační i inhibiční. (Najm, Janigro, Babb, 2001; Kubová, 2009) Je nutné si uvědomit, že v důsledku působení mnoha vnitřních i vnějších faktorů, může epileptický záchvat vzniknout i ve zdravém neepileptickém mozku. Takto vzniklý záchvat není projevem epilepsie, ale může k němu dojít právě z důvodu nerovnováhy excitačního a inhibičního systému mozku. (Dichter 1989; Kubová, 2009)

Typicky probíhá epileptogeneze ve třech fázích:

- Akutní fáze zahrnuje počáteční poškození mozku (tj. iniciální inzult). Toto poškození vede většinou k neurodegeneraci, cévnímu a axonálnímu poškození a změnám v přežívajících neuronech a gliích. Obvykle je doprovázeno deteriorací funkcí – může dojít ke změnám vědomí, chování, vzniku akutních epileptických záchvatů i ke změnám motorických či kognitivních schopností. Akutní epileptické záchvaty provázejí některé typy poškození mozku, jako hypoxicko-ischemické, nebo traumatické. Tyto záchvaty bývají vyprovokovány akutní metabolickou či fyziologickou poruchou spojenou s akutním poškozením, ale nemusejí znamenat epilepsii jako chronické onemocnění. Typ, závažnost a místo poranění mozku, spolu s věkem, pohlavím, možnou genetickou zátěží, terapeutickou intervencí (včetně farmakologických zásahů) a přítomnost nebo absence dalších patologií kriticky ovlivňuje konečné důsledky poškození.

- Akutní fáze je následována fází latentní. V té můžeme pozorovat částečné zlepšení některých funkčních parametrů. Navzdory mnoha molekulárním, buněčným a systémovým změnám, ke kterým dochází během této fáze, se ještě neobjevují spontánní záchvaty.
- Výskyt prvního spontánně opakujícího záchvatu určuje nástup chronické fáze. Ta je velmi dynamická; v jejím průběhu může docházet k progresi funkčního poškození a zhoršování epilepsie. (Obrázek 3)

Trvání jednotlivých fází je vysoce variabilní Akutní fáze trvá hodiny až dny, latentní fáze od dnů, přes týdny. Mohou to být ale i měsíce. U většiny experimentálních modelů trvá chronická fáze do konce života zvířete. (přehledně Kubová, 2011)



**Obrázek 3. Předpokládaný sled patofyziologických změn v rozvoji epilepsie po iniciálním inzultu a při sekundární epileptogenezi (převzato dle Brázdil, Marusič a kol. 2006)**

## 2.4 Léčba

Vzhledem ke své závažnosti, ale i četnosti, představuje onemocnění epilepsií významný zdravotnický i sociální problém v každé společnosti. (Brázdil, Hadač, 2004) Základ moderní léčby epilepsie představuje především vhodně zvolená farmakoterapie, která je u farmakorezistentních epilepsií po vyčerpání všech jiných možností (např. ketogenní dieta, vagový stimulátor) doplňována léčbou neurochirurgickou. Dlouhodobé studie ovšem ukazují, že u zhruba 50% pacientů léčených dostupnými antiepileptiky pokračují epileptické záchvaty, a u části těchto pacientů dochází k progresivním změnám jako je zvyšování frekvence záchvatů či zhoršování kognitivních funkcí (Collaborative group for the study of epilepsy, 1992). Tento údaj však reprezentuje pouze "průměrnou lékovou rezistenci" pacientů s různými typy epilepsií a prognóza jednotlivých typů je výrazně odlišná. Největší procento lékových rezistencí se vyskytuje u pacientů s komplexními parciálními záchvaty, a to okolo 70%. Významný je i vysoký výskyt farmakorezistence u řady forem věkově vázaných epilepsií a epileptických syndromů u dětí. (Kubová, 2002) Farmakoterapie epileptických syndromů u dětí je odlišná od léčby epilepsie dospělých. Věkově vázané epilepsie jsou charakterizovány jednak velkou rozmanitostí forem epileptických záchvatů, jednak mění se odpovědí na jednotlivá antiepileptika, závisující na vývoji mozku. Výběr vhodného antiepileptika by měl být podložen kvalitními kontrolovanými studiemi. (Komárek, 2007)

I když u 50% lidí vzniká epilepsie v dětství, je většinou výzkum týkající se nových antiepileptik orientován na dospělé a děti starší 12ti let. Výsledky se pak mnohdy mechanicky přenášejí do dětského věku. Zaslepené kontrolované studie u většiny dětských syndromů k dispozici nejsou, nebo jsou jen velmi omezené. Lze pouze vycházet z dlouholetého sledování větších souborů či u vzácnějších se opřít o jednotlivé kazuistiky.

Léčba antiepileptiky má v dětském věku značná specifika, je důležité počítat s věkem se měnící farmakodynamikou i farmakokinetikou. Nevhodnou farmakoterapií můžeme poškodit malého pacienta a zhoršit kvalitu jeho života. (přehledně Komárek, 2007a) Je důležité si uvědomit, že mezi látky např. zvyšující apoptózu ve zrajícím mozku patří i některá antiepileptika. (Ikonomidou et al. 2001) Výzkum věkově vázaných změn v účincích antiepileptik a nežádoucí účinky těchto léčiv na vyvíjející se mozek jsou dále zkoumány.

Současná léčba epilepsie je založena na symptomatickém potlačení příznaků (tj. záchvatů) antiepileptiky (AED) Čistě kauzální léčba „hojící“ chorobný proces, který epilepsii vyvolal, zatím neexistuje. (Pitkänen, Kubová, 2004) Snaha zasáhnout do samotné příčiny procesu epileptogeneze vede k řadě studií prováděných na animálních modelech.

Při vymizení záchvatů dochází jednoznačně ke zlepšení kvality života a nižšímu riziku rozvoje psychiatrické komorbidity. Pacient není vystaven opakovanému riziku přechodných nežádoucích účinků při aplikaci dalších a dalších antiepileptik a kompenzace epilepsie je nepochybně sdružena i s lepší sociální integrací pacienta. (přehledně Marusič, Krijtová, 2011) Je však nutno mít na paměti, že i kompenzovaný epileptik je epileptik a léčba proto musí být dlouhodobá, ne-li celoživotní. (Kubová, ústní sdělení)

### 3 STATUS EPILEPTICUS

#### 3.1 Definice epileptického statu

Status epilepticus (SE) je většinou definován jako záchvat trvající více než 30 minut, nebo 2 a více intermitentních záchvatů, mezi nimiž nemocný nenabude plného vědomí. (Marik, Varon, 2008) Jako refrakterní status epilepticus je charakterizován SE s trváním více než 60 minut s rezistencí na léčebné postupy.

Principiálně mohou všechny typy záchvatů vyústit v SE, a proto Mezinárodní klasifikace SE v podstatě odpovídá klasifikaci epileptických záchvatů.

Trvá-li epileptická aktivita více než 30 minut, rozvíjí se široké spektrum klinických symptomů s vysoce variabilním patofyziologickým, anatomickým a etiologickým podkladem.

Zatímco epileptický záchvat představuje pro pacienta krátkodobou příhodu, z níž se často před příchodem lékaře zotaví, je status epilepticus stavem, který ohrožuje život a může vést k ireverzibilním škodám na neuronech v důsledku excitotoxických mechanismů, zhoršovaných faktory, jako jsou hypertermie, acidóza, hypoxie aj. (Mlčoch, 2008)

#### 3.2 Epidemiologie epileptického statu

Status epilepticus se vyskytuje s vysokou incidencí u novorozenců a dětí do jednoho roku věku, více než v jiných věkových kategoriích. (Hauser, 1990) Vyšší incidence se objevuje též ve věku nad 60 let. (Loddenkemper, Goodkin, 2011)

Epidemiologické studie z USA a Virginie ukazují, že u 60ti letých je incidence 83/100 000 obyvatel. U dětí mezi 2. - 12. měsícem života je incidence téměř dvojnásobná 156/100 000 obyvatel. Naopak studie z Kalifornie ukazuje incidenci 7,5/100 000 u dětí do 5let a 22,3/100 000 ve věku nad 75 let. (Assis, Costa, Bacellar, Orsini, Nascimento, 2012)

Mortalita při SE je podle recentních studií u dospělých stále 8–32% a u dětí 3–25%. V populační studii v Richmondu byla mortalita 22%. Jinde se uvádí, že fatální následky pro děti jsou v rozmezí 3-9%. (Loddenkemper, Goodkin, 2011)

### 3.3 Patofyziologie epileptického statu

Základním rysem patofyziologických procesů, zahrnutých v SE, je selhání mechanismů ukončující izolovaný záchvat. (Lowenstein, 1998) Je pravděpodobné, že neefektivní práce inhibičních neuronů spolu s nadměrnou neuronální excitací hrají roli v zahájení a šíření elektrického impulzu vyskytující se u epileptického statu. (Marik, Varon, 2008)

Status epilepticus znamená trvalou patologickou situaci centrálního nervového systému s přetrváváním abnormálně rychlé elektrické aktivity mozkových neuronů. Klinické záchvaty jsou neustálé a mají tendenci stávat se soběstačnými (nezávislými). Fyziologické a biochemické kaskády, které charakterizují soběstačné SE (SSSE), byly zkoumány na zvířecích modelech. Při přechodu z jednotlivých záchvatů do SSSE se GABA receptory pohybují od synaptické membrány do cytoplasmy, kde jsou funkčně neaktivní. Tím se snižuje počet GABA receptorů k dispozici pro navázání GABA nebo GABAergních látek, což může částečně vysvětlit vývoj časově závislé farmakoresistance na benzodiazepiny a tendenci záchvatů stát se soběstačnými (nezávislými).

Na druhé straně dochází ke zvyšování počtu glutamatergních receptorů v neuronální membráně, což zvyšuje excitabilitu i riziko excitotoxického poškození. Znalosti těchto mechanismů otvírají možnost využití nových terapeutických postupů (Chen, Naylor, Wasterlain, 2007)

Principem poškození neuronů při SE jsou převážně hypoxicko - ischemické mechanismy.

### 3.4 Důsledky epileptického statu pro nezralý mozek

Dlouhodobé sledování pacientů, kteří prodělali v dětství SE, přináší rozporné výsledky. Publikované studie jasně prokazují krátkodobé i dlouhodobé důsledky působení prolongované epileptické aktivity, závislé na mnoha faktorech jako je věk, komorbidity či přidružená farmakoterapie. Proto jsou pro sledování důsledků dlouhotrvající epileptické aktivity s vyloučením vlivu dalších patologií užitečnější animální modely. Výsledky animálních studií pomáhají přispět k poznání patofyziologických mechanismů, vedoucích ke vzniku funkčních i morfologických důsledků SE a zároveň jsou využívány ke konstrukci nových terapeutických strategií. (přehledně Kubová, 2011) Na zvířecích modelech je možno sledovat význam jednotlivých faktorů jako jsou věk, mechanismus vzniku záchvatu či použitá terapie. Tyto faktory jsou důležité pro vznik, rozsah a charakter morfologických i funkčních alterací.

Experimentálně je již na řadě studií prokázáno, že k poškození mozku vedou záchvaty krátké i dlouhé. Experimentální důkazy naznačují, že záchvaty proběhlé v rané fázi vývoje, jsou spojovány spíše s jemnými deficity v chování a kognitivních funkcích i v nepřítomnosti zjevné strukturální léze.



Tyto deficity jsou závislé na věku, kdy k záchvatům dojde (méně závažné deficity v mladším věku), na frekvenci a závažnosti záchvatů, ale do značné míry nezávislé na etiologii. (Stafstrom, 2002) I přes veškeré snahy na experimentální i klinické úrovni nejsou procesy vedoucí k rozvoji epilepsie či epileptického statu stále zcela objasněny.

### 3.5 Animální modely epileptických záchvatů a epilepsie

Při tvorbě ideálního modelu epileptického záchvatu či epilepsie se vychází především z podobnosti se záchvaty pozorovanými u lidských pacientů. Lze modelovat jednotlivé parametry onemocnění, jako jsou záchvaty a genetické mutace, či celkově epilepsii jako chronické onemocnění. Sledovány jsou klinické příznaky. Především výskyt a charakter epileptických záchvatů (behaviorálně i elektrograficky), ale i výskyt komorbidit (deprese, anxiety, poruchy sociálního chování). U obojího bychom měli vidět shodu, podobu, či alespoň analogii s projevem lidských epileptických záchvatů. V daném modelu se porovnává i účinnost klinicky používaných antiepileptik. (Servít, 1983)

V experimentální epileptologii se nejčastěji používají modely vyprovokovaných (reaktivních) epileptických záchvatů. Tyto modely jsou snadno proveditelné, relativně levné a většinou nepotřebují (v závislosti na cíli experimentu) nákladné vybavení. Rutinně se tyto modely využívají k vyhledávání nových látek, které by v budoucnu mohly sloužit v léčbě epilepsie. Záchvaty jsou vyvolávány buď elektrickou stimulací, nebo podáním chemických látek.

V současné době existuje široká škála křečových jedů s různým mechanismem účinku (obvykle potlačujících inhibici nebo zesilujících excitaci) s dobře popsáním průběhem provokovaných křečí. Řada těchto modelů byla popsána i u mláďat laboratorních hlodavců.

Komplikovanější a výrazně nákladnější je využití modelů epilepsie jako chronického onemocnění.

Obvykle se rozlišují modely epilepsií vyvolaných jasně definovaným epileptogenním podnětem, jako je například ischemie, trauma – model získané epilepsie (acquired epilepsy). Kromě toho existují i genetické modely, které využívají buď kmenů laboratorních hlodavců s přirozeně vysokým (až 100%) výskytem epilepsie, nebo geneticky modifikovaných zvířat. (Velíšek, 1992) Zvláštním modelem epileptogeneze je kindling (rozněcování), který využívá skutečnosti, že při dlouhodobém působení aktivity epileptického ohniska může dojít k sekundární generalizaci této aktivity. Jde o zvláštní případ modelování záchvatů elektrickou cestou, kdy klinicky latentní záchvaty přecházejí postupně do motorických křečí.

Navzdory tomu, že epilepsie začíná častěji v dětském věku, je experimentální výzkum epilepsií v průběhu vývoje prováděn daleko v menším rozsahu než výzkum epileptických jevů ve zralém mozku. Velkým problémem je zejména modelování specifických věkově vázaných epilepsií či epileptických syndromů. Relevantní modely, které jsou nezbytné pro studium patofyziologie těchto epilepsií i pro vyhledávání nové, specifické terapie chybí, protože nároky na tyto modely jsou velmi vysoké. Epileptogenní proces by měl vést k záchvatům, které se vyskytují v určitém období v postnatálním vývoji. Fenotyp vzniklé epilepsie by se měl podobat té u dětí včetně specifických záchvatů. Dále by měla být přítomen specifický patologický obraz EEG, včetně farmakologické citlivosti odpovídající též humánní medicíně. Kromě toho by měl model vykazovat jako následek buď globální vývojovou regresi či specifické behaviorálně-kognitivní následky.

Platné zvířecí modely by měly poskytovat užitečný nástroj pro zkoumání molekulárních a buněčných mechanismů epileptogeneze k identifikaci biomarkerů, k vyzkoušení nových antiepileptogenik a antiepileptik a podpořit rozvoj nových diagnostických a terapeutických strategií. (Kubová, Lukasiuk, Pitkänen, 2012)

Experimentálně indukovaný konvulzivní status epilepticus je nejpoužívanějším modelem epileptogeneze, i když je u dospělých zvířat velmi devastující. Tento inzult vyvolává epileptogenezi až u 100% jedinců. Zatímco u dospělých zvířat se stejnou měrou používají metody chemického i elektrického vyvolání epileptického statu, v ontogenetických studiích je situace podstatně komplikovanější. Použití dlouhodobé elektrické stimulace pro vyvolání epileptického statu není u velmi mladých zvířat možné, zejména z důvodů technických. Lebeční kosti jsou velmi tenké a rychlý růst lebky znemožňuje nechat přežít zvířata po delší dobu s implantovanými elektrodami. Navíc jejich odstranění po ukončené stimulaci je spojeno se značným rizikem poškození lebky, zejména u zvířat mladších než 3-4 týdny.

U mláďat se pro vyvolání epileptického statu používá nejčastěji cesta chemická. Nejlépe popsanými modely jsou SE vyvolané systémovou či fokální aplikací kainátu, nebo systémovým podáním pilokarpinu - ať už samotného, nebo v kombinaci s lithiem. Ve všech případech byla sledována a popsána citlivost různých věkových skupin potkana k vyvolání motorického SE i jeho EEG projevy. (přehledně Kubová, 2002) Experimentální studie prokázaly, že důsledky SE závisí na stupni vývoje v době vzniku SE, jeho závažnosti a době trvání. (Lemos, Cavalheiro, 1995) Další faktory, jako způsob indukce SE, genetické faktory, léčba během SE, nebo různé další faktory včetně zvýšení tělesné teploty významně ovlivňují konečné důsledky aplikovaného inzultu. (Kubová, Lukasiuk, Pitkänen, 2012) Kainát i pilokarpin vyvolávají SE již v prvním týdnu života a závažnost i distribuce patologických změn se liší v závislosti na věku a typem inzultu. (Pitkänen et al, 2007; Pitkänen, Lukasiuk, 2009).

Výsledky nejnovějších studií ukazují, že Li/pilokarpinový model vede k neurodegeneraci a dlouhodobému funkčnímu poškození (změny kognitivních schopností apod.) již během druhého týdne života potkana (P10 - P12) a je i silně epileptogenní (Kubová, Mareš, 2013). Neurodegenerace je pozorována od prvních hodin po začátku SE a některé funkční změny lze pozorovat hned po odeznění akutní fáze SE. U dospělých zvířat se spontánní epileptické záchvaty objevují v řádech dní, či nejdéle několika týdnů po SE. U mláďat trvá tento proces podstatně déle, až měsíce.

Trvání tzv. latentní fáze i incidence epilepsie po inzultu se ovšem u mladých i dospělých zvířat výrazně liší v závislosti na použitém modelu - v modelu po poranění mozku (traumatic brain injury; TBI) nebo cévní mozkové příhodě je podíl zvířat s rozvojem epilepsie nižší a latence k jeho vzniku je např. po TBI mnohem delší, trvá v řádech měsíců.

U lidí samozřejmě nejsou informace o průběhu epileptogeneze po různých typech mozkových inzultů natolik prozkoumány. Z dostupných údajů vyplývá, že u většiny pacientů se rozvine epilepsie do 2 let po SE, TBI nebo cévní mozkové příhodě, což demonstruje určitou podobnost mezi různými etiologiemi. (Hesdorffer, Logroscino, Cascino, Annegers, Hauser et al., 1998) Na druhé straně je však třeba stále zvažovat možnost různých procesů epileptogeneze a zároveň počítat s celou řadou vnějších i vnitřních faktorů, které u individua proces/procesy epileptogeneze ovlivňují. (Pitkänen, 2010)

### 3.6 Poškození mozku v průběhu vývoje

Dosavadní výsledky studií ukazují, že rozsah poškození vyvolaného experimentálně vyvolaným SE se zvyšuje s věkem. V dospělém mozku je SE vysoce devastující a vede k rozsáhlým patologickým změnám. Nezralý mozek byl naopak po dlouhou dobu pokládán za vysoce rezistentní ke vzniku funkčních i morfologických následků. Výsledky dřívějších studií naznačovaly, že SE vyvolává epilepsii až u zvířat starších než 3 týdny, avšak na základě užití vyspělejších technických a technologických postupů bylo potvrzeno, že nezralý hlodavčí mozek je více náchylný k vyvolání záchvatů než mozek plně maturovaný. (Scantlebury et al., 2007)

Ani velmi nezralý mozek (10 - 12 dní) není zcela rezistentní (přehledně Kubová, 2011).

S pomocí specifických markerů neurodegenerace, jimiž jsou TUNEL či Fluoro - Jade B, byla neurodegenerace detekována již u zvířat mladších 2 týdnů. Ireversibilně poškozené neurony byly prokázány u P12 potkanů v řadě struktur temporálního laloku (hipokampus, amygdala) (Nairismägi, Pitkänen, Kettunen, Kauppinen, Kubová, 2006; Druga, Mareš, Kubová, 2010) i extratemporálně (talamus) (Kubová et al., 2001) v průběhu prvního týdne po SE.

Dlouhodobě dochází u zvířat, která prodělala SE v časných stádiích postnatálního vývoje, k atrofii struktur temporálního laloku a dilataci postranních mozkových komor (Nairismägi et al., 2006, Kubová, Mareš, 2013). Dlouhodobé sledování prokázalo, že atrofie je progresivní, a že se její rozsah zhoršuje s dobou od SE. (Kubová, Mareš, 2013)

Obecně se předpokládá, že poškození CNS během vývoje znamená mnohem méně závažné deficity než poškození v dospělosti, a to z důvodu zvýšené plasticity nezralého mozku.

Dosavadní studie ukazují, že v souladu s menším rozsahem poškození mozku je menší i rozsah funkčního poškození. U dospělých zvířat s časným SE se projevuje anxieta, zhoršení paměti i schopnosti učení (Kubová, Mareš, 2013; Kubová at al., 2004).

Některé studie naznačují i zpomalení vývoje některých funkcí. (Kubová, Mareš, 2013) Přes velký význam této problematiky je dynamika vývoje sledována u modelů časného poškození mozku studována jen málo a většinou ve velmi omezeném rozsahu.

#### **4 POSTNATÁLNÍ VÝVOJ LABORATORNÍHO POTKANA V POROVNÁNÍ S ČLOVĚKEM A KOMENTÁŘ K POUŽITÉ METODICE**

Pro experimentální biomedicínské obory, zaměřené na vývoj nervového systému, představuje možnost srovnání jednotlivých neurovývojových stádií mezi různými savčími druhy klíčový problém. Možnost takového srovnání je přitom nezbytná pro přenos non - humánních dat na lidský mozek. Různé druhy laboratorních zvířat se rodí v různých stadiích zralosti nervového systému a navíc se jednotlivé oblasti jejich nervového systému liší i z hlediska fylogenetického (velikostí i komplexností).

Člověk stejně jako potkan patří mezi savce nezralé, kteří jsou po narození odkázáni část svého postnatálního života na péči svých rodičů. Je třeba brát na zřetel úroveň zralosti při narození a tempo vývoje po narození. Délka života potkana je kolem 2 let, takže jeho vývoj je poměrně rychlý. V době narození nedosahuje stupně zralosti mozku donošeného lidského novorozence, je tedy možné na něm studovat i vývojová stadia, která u člověka probíhají intrauterinně. Morfologicky stanovovaný stupeň zralosti mozku, který odpovídá stupni zralosti mozku donošeného novorozence je u potkanů dosažen kolem 10. - 12. dne. (Mareš, 1992) Přirozený odstav je 28. den a puberta nastává 35. den.

I když v současné době existuje poměrně rozsáhlá literatura věnovaná této problematice, jsou naše znalosti stále neúplné. Velké procento dostupných prací se zaměřuje na srovnávání sekvencí některých jednoduchých vývojových parametrů jako je otevírání očí, fyziologický odstav, či na srovnávání základních parametrů biochemických (např. změny v obsahu DNA v mozku, parametry dozrávání transmitterových systémů), neuromorfologických (synaptogeneze, myelinizace) nebo molekulárních (změny molekulární struktury receptorů, iontových kanálů).

I když tyto studie nabízejí určité vývojové paralely mezi jednotlivými sledovanými markery, komplexní obraz je zatím velmi neúplný.

Vývojová neurofyziologie studuje řadu oblastí. Mezi nejjednodušší patří vývoj motoriky. Při studiu psychického vývoje jsme u pokusných zvířat odkázáni na metodiky studia chování, upravené pro příslušná vývojová stadia. Je prováděna analýza EEG z důvodu vývoje bioelektrické aktivity CNS, ale i provokovaná aktivita pomocí evokovaných potenciálů, která se překrývá se studiem sensorických systémů. (Mareš, 1992) Při vzájemném srovnávání je třeba mít na zřeteli, že u člověka vývoj sensorických systémů předbíhá vývoj motoriky na rozdíl od laboratorních potkanů, kde kromě nedokonalé motoriky přetrvává i delší vývojová etapa sensorických funkcí jako je např. zrak a sluch. (Mareš, 1992)

Srovnávací studie dokazují, že hlodavci se rodí před hlavní periodou diferenciaci neuroblastů a k synaptogenezi a myelinizaci dochází i dále v postnatálním období. (Gottlieb, Keydor, Epstein, 1977) Naproti tomu v lidském mozku jsou po narození neuroblasty kompletně diferencovány a kompletní je také proliferace. Pouze myelinizace je dokončována, stejně jako u hlodavců, postnatálně. Hrubý regionální rozvoj mozku obou je shodný.

Rozvoj senzomotorické kůry je nejrychlejší mezi 12. a 20. dnem života. První tři týdny jsou zásadní pro myelinizaci a zrychluje se též vedení periferními nervy. (Westerga, Gramsbergen, 1990) Významný rozdíl mezi lidským a hlodavčím mozkiem je velikost a obrys neokortexu. Hlodavci mají hladkou (lissencefalickou) mozkovou kůru s relativně malým neokortexem. Lidský mozek se vyznačuje zvrásněním (gyrencefalií), vyplývající z obrovské fylogenetické expanze neokortexu. (Rice, Barone, 2000)

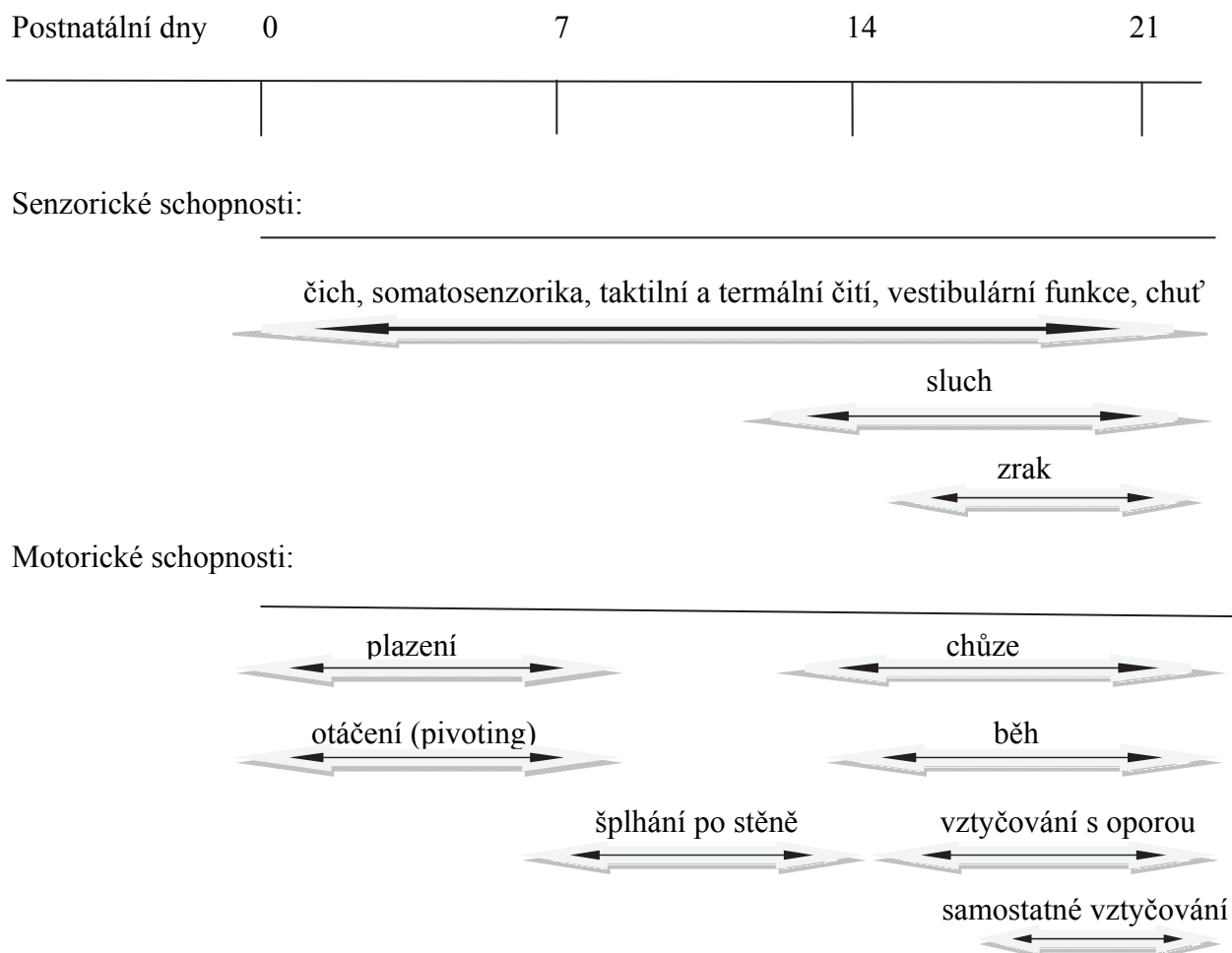
V ontogenetickém vývoji nervosvalového aparátu obratlovců se významně uplatňuje řada interakcí mezi jednotlivými komponentami.



Realizace některých vzájemných vlivů mezi neurony a jejich cílovými strukturami je v určitých obdobích ontogeneze zcela nezbytnou podmínkou jejich další diferenciaci. Narušení např. traumatem během kritických vývojových fází má za následek většinou ireverzibilní morfologické, funkční změny, a/nebo úplný zánik centrálních či periferních elementů nervosvalového aparátu. Obdobný zásah provedený u plně maturovaného systému má většinou daleko mírnější negativní dopad. Toto však stojí v protikladu k tvrzení (často až generalizujícímu), že reparabilita poškození je u mladého, nezralého organismu obecně lepší než v dospělosti. (Vejsada, Paleček, 1992)

Pro sledování důsledků časného poškození mozku, vystavení nezralého mozku působení různých exo- či endogenních vlivů, vývojovou farmakologii a řadu dalších neurovývojových oborů je nutné znát vývoj základních funkcí nervového systému. Zejména se jedná o funkce sensorické, motorické, schopnosti učení, paměti, sociální dovednosti apod. a také „kritické vývojové periody“. Tyto znalosti pak umožňují vytvoření relevantních experimentálních modelů i správnou interpretaci získaných výsledků.

V rámci předkládané práce lze uvést z důvodu limitovaného rozsahu pouze velmi stručný přehled vývojových mezníků laboratorního potkana se zaměřením na vývoj základních funkcí nervového systému s akcentem na paměť a senzomotorické schopnosti, které úzce souvisí s tématem diplomové práce. (Obrázek 4)



**Obrázek 4. Přibližná doba rozvoje jednotlivých senzoričkých a motorických schopností u potkanů (Upraveno dle Spear, 1990)**

#### 4.1 Motorický vývoj

Proces vertikalizace se vyvíjí po narození poměrně rychle. Novorozeného potkana ukazuje obrázek 5.



**Obrázek 5. Novorozené mládě potkana**

Postupně se zapojují antigravitační svaly hlavy, krku, trupu a extenzorů končetin. První se již během prvního týdne zvedá od podložky hlava. Na začátku třetího týdne začínají potkani již sledovat okolí.

Ve vertikalizačním procesu následují ramena a tlapky. Ramena se postupně zvedají od podložky již od prvního dne po narození. Na konci prvního týdne, kdy se i hlava pomalu elevuje, se dostávají výš. Jejich pohyb samozřejmě souvisí s dozráváním opory o distální části předních končetin. Váha je zpočátku na přední části těla, tedy na loktech, předloktí a koncem prvního týdne na tlapkách a otevřených prstech. Od 12. dne jsou potkani schopni se zvednout na distální části předních končetin, aniž by ztratili rovnováhu.

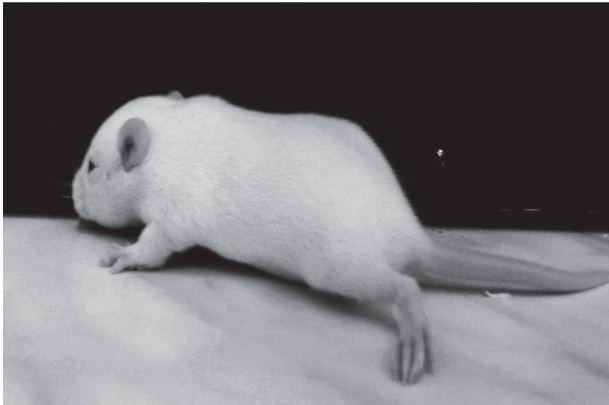
V druhé polovině druhého týdne se začíná přidávat pánev a zadní končetiny. Na zadních tlapkách s roztaženými prstci je potkan kolem 13. dne po narození.

První nejjednodušší pohyb můžeme ovšem vidět podstatně dříve, tzv. pivoting (spontánní pohyb předními končetinami) se objevuje již 4. - 5. den. Pivoting je následován tzv. šlapáním, při němž je hlava elevována a přední končetiny se pohybují obě vpravo nebo vlevo, přičemž zadní končetiny se pohybují minimálně. Od konce 1. týdne po narození se pomalu objevuje plazení, v rámci kterého se zapojují i končetiny zadní. Kolem 10. dne mluvíme o začátku kvadrupedální lokomoce s elevovaným trupem, ovšem s nedokonalou kontrolou dolních končetin. 14. - 15. den se otevírají oči a spolu s tím je vývoj lokomoce natolik zrychlen, že od 16. dne již lze pozorovat běh. Postupně se vyvíjí další modality - vestibulární funkce, exterocepce i propiocepce. (Altman, Sudarshan, 1975) Sluchový a zrakový systém začíná dozrávat u potkanů poměrně pozdě, naproti tomu čich a chuť dozrávají o mnoho dříve.

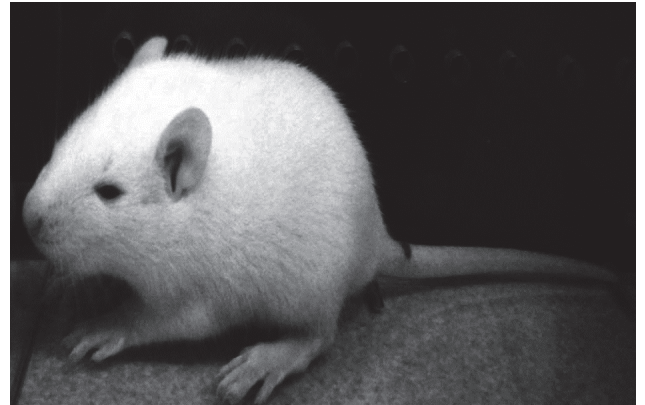
#### 4.2 Stručný přehled vývoje lokomoce

- 12ti denní mládě začíná používat zadní končetiny, vyvíjí se tzv. zvedací reakce, distální části zadních končetin nejsou ještě ve správné koordinaci, chodidla míří při kontaktu s podložkou nahoru. Kolem 13. - 14. dne se objevuje dorziflexe nohy a kontakt chodidla s podložkou. V tomto věku můžeme u potkana pozorovat již počátky chůze. (Obrázek 6)
- 18ti denní mláďata laboratorního potkana v tomto věku již vidí, využívají kvadrupedální lokomoci a rychle rozvíjí další poznávací schopnosti. Jako součást průzkumné odpovědi se vyvíjí zvedání na zadních končetinách. 15. - 16. den začíná rozvoj posturální kontroly, který je dokončen 21. den. Mezi 17. a 20. dnem se manifestuje fáze hyperaktivity, kdy zvířata rychle mění činnosti. (Altman, Sudarshan, 1975; Gramsbergen, 1998) (Obrázek 7)

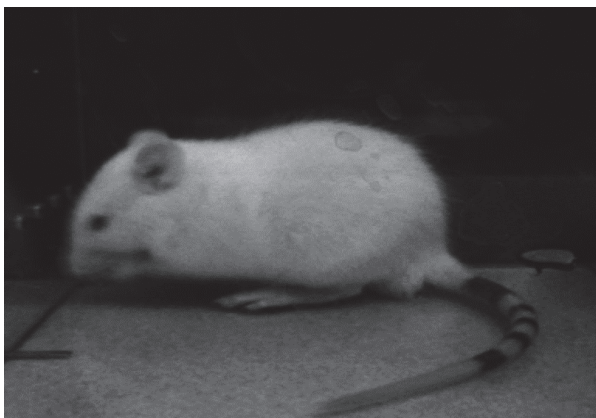
- 25ti denní mláďata laboratorního potkana (P25). Tento věk reprezentuje období před fyziologickým odstavem. Výrazně se zvyšuje lokomoční aktivita, intenzivnější hraní s prvky agresivity a sexuálního chování. (Bolles, Woods, 1964) (Obrázek 8)
- 32ti denní prepubertální potkan projevuje zvýšený zájem o sociální kontakty, intenzivní hravé chování s naznačenou agresivitou a prvky sexuálního chování. (Bolles, Woods, 1964) (Obrázek 9)



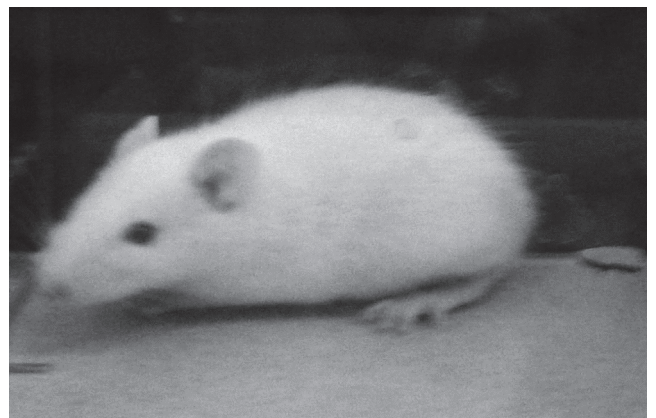
**Obrázek 6. 12-ti denní mládě potkana (P12)**



**Obrázek 7. 18-ti denní mládě potkana (P18)**



**Obrázek 8. 25-ti denní mládě potkana (P25)**



**Obrázek 9. 32-ti denní prepubertální potkan**

### 4.3 Vývoj učení a paměti

Na rozdílech v ontogenetickém vývoji jednotlivých schopností učení se podílí skutečnost, že rostrálněji uložené struktury zprostředkují složitější formy chování, zatímco pro realizaci jednoduchých forem chování postačí kaudálněji uložené oblasti. Vyšší oblasti dozrávají později, což se projevuje tím, že chování novorozenců může někdy připomínat chování dekontikovaných zvířat (Tietelbaum et al., 1983) Učení u mláďat souvisí s postupným vývojem sensorického a motorického systému.

Učení je na všech vývojových stadiích významně ovlivněno motivací, která se však v průběhu vývoje do jisté míry mění. Řada studií ukazuje, že apetitivní učení se vyvíjí v ontogenezi dříve než averzivní, přičemž pod pojmem apetitivní učení je myšlena činnost za účelem dosažení odměny, na rozdíl od učení averzivního, kdy je cílem konání vyhnutí se trestu.

V raných obdobích ontogeneze se v učení uplatňuje zejména čich. (Leon, 1992) Inhibiční averzivní chování je možno prokázat brzy po narození, je však třeba použít adekvátních metod na daném stupni ontogenetického vývoje. Při jeho volbě je nutno znát ontogenezi sensorických a motorických systémů a též význam této formy učení pro přežití zvířete ve volné přírodě. Různé averzivní podněty prostředí mohou vyvolat u laboratorních zvířat stres. Silným stresem je „passive avoidance learning“, jde o test, kdy se zvířata vyhýbají elektrickému šoku. Zvířata jsou schopna splnit tento test již mezi P8 - P12, kdy ještě nevidí. (Dumery, Derer, Blozovski, 1988) Jsou-li zvířata vystavena nebezpečným podnětům, reagují na ně (behaviorálně) přes různé sensorické modality. Např. při odloučení od matky vysílají ultrasonickou vokalizaci, která v ontogenezi klesá postupně směrem k době fyziologického odstavu. Tato jejich odpověď je přizpůsobena hrozícímu nebezpečí a v podstatě prosí matku o pomoc. Představuje-li však nebezpečí pro mláďata cizí dospělý samec, nastává „freezing“ (ztuhnutí).

Mláďata přestanou vokalizovat a hrají mrtvé. Ultrasonická vokalizace je inhibována, je tedy možno ji přizpůsobit vzniklé situaci. „Freezing response“ není ještě přítomna v P7. Mezi P12 - P14 je velmi výrazná a od P18 klesá. V období po odstavu nepředstavuje již cizí dospělý samec pro mláďata hrozbu. (Wiedenmager, 2005)

Odpověď na hrozbu je nejen věkově specifická, ale je významně ovlivněna i typem podnětu. U zvířat je popisován tzv. emoční vnitřní stav, který je zakódován v genech a znamená, že i když laboratorní potkan nikdy neviděl kočku, její pach pro něj představuje hrozbu. Testem na anxieta v tomto směru je tzv. „predator avoidance“ = vyhnout se predátorovi (Blanchard, 2005). Je prokázáno, že při vystavení stresovým stimulům dochází k aktivaci hypotalamo-hypofyzo-nadledvinkové stresové osy (HPA; hypotalamo - pituitary - adrenal axis). Na její aktivaci závisí i míra úzkosti. (Klein, Romeo, 2013)

Mozkové oblasti spojené s vývojem anxiety jsou především ventrální hipokampus, frontální kortex, amygdala a hypotalamus. Ty modulují odpověď na stres v závislosti na věku jedince. Adolescenti mají silnější odpověď než dospělý. (Lynn, Brown, 2010)

Poměrně pozdě se vyvíjejí kognitivní formy paměti, závislé na hipokampu. U potkanů se jedná především o prostorovou paměť. V Morisově vodním bludišti, v němž zvířata hledají skrytou platformu, jsou mláďata tuto úlohu schopna řešit již 17. den po narození, pokud je bludiště přizpůsobeno jejich velikosti, asi na 1/3 originálu. V tomto období ještě před odstavem zralost hipokampu umožňuje neuronální integraci vizuální prostorové informace a objevují se počátky prostorového učení. (Carman, 2001) Zvířata nalézají platformu viditelně označenou např. praporkem. Pomocí vnějších orientačních bodů, umístěných mimo hledaný ostrůvek, jsou schopni orientace až po 20. dni po narození. (Carman, 2003)

#### 4.4 Behaviorální studie

Funkční vývoj CNS u potkanů je studován od P10 do P45 přes ontogenezi psychomotorických a senzorických funkcí, pomocí baterie behaviorálních testů. Byl popsán ontogenetický vývoj 10 různých funkcí. Výsledky ukazují, že novým podnětem vyvolané funkce zrají postupně v dospělé vzory fungování do 3.týdne po narození. Ukázalo se, že reflexy a automatické motorické funkce dozrávají do třech týdnů, avšak volní (úmyslná) motorická činnost se zlepšuje až do P30. Jak již bylo popsáno, lokomoční aktivita se vyvíjí nejvíce mezi P10 a P15, kdy můžeme již vidět zralý pohybový vzor. Náročnější koordinace komplexních pohybů a samostatná iniciace pohybu se objevuje po P20. (Bâ, Seri, 1995)

Behaviorální studie představují jednu z možností, jak vyšetřovat změny v mozku po poranění mozku v ranných fázích vývoje a po jeho expozici chemickým látkám. Vycházejí vždy ze znalosti normálních prvků chování a jeho vývoje. Mohou zahrnovat všechny základní kategorie chování od nejdodušších motorických reflexů až ke komplikovaným jevům, jakými je učení, sociální či mateřské chování. Zabývají se studiem chování zvířat ve smyslu registrace a hodnocení jednotlivých typů či kategorií chování, vysvětlení určitého typu chování zvířete, jeho ovlivnění a korelací s projevy chování u člověka. Sledují vrozené vzorce chování, tedy instinkty, reflexy a získané, tedy různé formy učení od jednoduché habituace až ke komplexnějším prostorovým úlohám. Chování závisí na instinktech, motivaci, emočním stavu jedince a na schopnosti reagovat na základě předchozí zkušenosti. V laboratorních podmínkách jsou studovány okruhy chování zahrnující sensorimotorické zpracování, spontální aktivitu, lokomoci, exploraci, emocionalitu (zvláště úzkost-anxiety), učení a paměť a sociální i mateřské chování. (Valeš, Kubík, 2010)



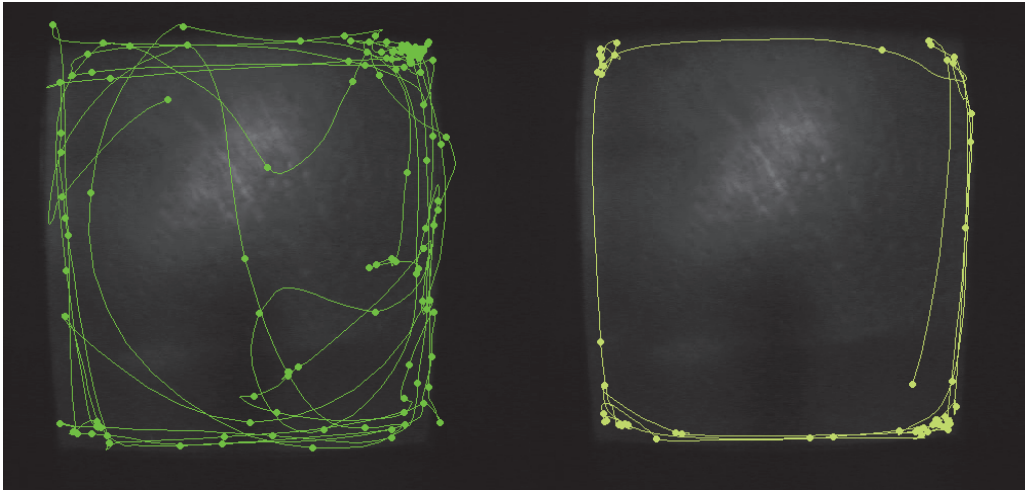
## 4.5 Habituační

Habituační představuje nejjednodušší formu učení a hraje důležitou roli v celkové adaptaci organismu okolnímu prostředí. Typická odpověď, charakteristická pro dospělá zvířata, se objeví v průběhu třetího postnatálního týdne. Jednu z hlavních forem habituační u potkanů představuje snížení explorační aktivity (chování) jako odpovědi na kontinuální či opakované vystavení zvířete novému prostředí či podnětu. V období před odstavem k habituační nedochází.

Aktivace spontánního chování souvisí s biochemickými substráty excitačních (adrenergických) center uložených v zadním mozku a inhibičních (cholinergických) center v předním mozku. Pokud nejsou mechanismy účastníci se habituační ještě zcela vyvinuty, nebo jsou poškozené, aktivita zvířete neklesá s časem. Naopak zranění těchto mechanismů vede ke snížení úrovně aktivity. (Shaywitz, Gordon, Klopper, Zelterman, Irvine, 1979) Kolem doby odstavu je již vidět habituační profil, čili iniciální intenzivní explorační aktivitu s následným postupným poklesem v experimentálním prostředí. (Calamandrey, 2004) (Obrázek 10)

Chování mláďat v období před odstavem v habituačních testech je ovlivněno stresem v podobě oddělení od matky a sourozenců. Kromě toho v rané fázi vývoje neumějí ještě dobře udržovat tělesnou teplotu, což může také zvyšovat míru úzkosti. Větší míra stresu ovlivňuje průběh habituační. (Parsons, Fagan, Spear, 1973)

Paradigma habituační je atraktivním modelem. Je jedním ze základních paradigmat používaných při studiu ontogeneze učení a paměťových procesů během raného vývoje (Cohen, 1976)



**Obrázek 10. Příklad trajektorie z „open field“ testu**

Levá polovina - trajektorie naivního zvířete umístěného v prostoru „open field“ poprvé v životě

Pravá polovina - trajektorie habituovaného zvířete již seznámeného s prostředím

## **5 CÍLE A HYPOTÉZY**

Cílem diplomové práce bylo studovat vliv SE na vývoj kognitivních schopností a emocionalitu. K tomu byl použit fenomén habituace, definovaný jako klesající odpověď na opakované stimuly. Konkrétně jsme studovali habituaci exploračního chování v „open field“ testu.

Hypotéza: Status epilepticus, vyvolaný v časných vývojových stádiích bez přítomnosti dalších patologií, vede k dlouhodobému ovlivnění kognitivních funkcí a k alteraci jejich vývoje.

## 6 METODIKA

Experiment byl prováděn v rámci řešení grantu P302/10/0971 (GAČR). Prováděné pokusy byly v souladu s platnou legislativou a byly schváleny Odbornou komisí FgU AV ČR.

### 6.1 Zvířata

K pokusu byli použiti 12ti denní (12tý postnatální den, P12) samci laboratorního potkana kmene Wistar z chovu Fyziologického ústavu AVČR. Potkani byli 5. den po narození rozděleni do skupin po 10 samcích s jednou matkou. Mláďata byla odstavena ve věku 28dní (P28). V průběhu pokusu byla zvířata ustájena v prostorách akreditovaného příručního zvěřince se stálou teplotou  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  a vlhkostí  $55 \pm 5\%$  s pravidelným 12 hodinovým světelným cyklem (světlá perioda 6:00 - 18:00). Zvířatům byl zajištěn trvalý přístup k vodě a potravě, s výjimkou probíhajícího testu.

Testování bylo provedeno se sníženou intenzitou světla (35 - 45lx) tak, aby byla podpořena spontánní explorační aktivita a snížila se úzkost zvířete, neboť potkan je živočich noční. Byla zajištěna stálá teplota  $23^\circ\text{C}$  a výměna vzduchu. K experimentu bylo použito celkem 30 potkanů, pocházejících ze tří vrhů. V každém vrhu byla zvířata rozdělena na kontrolní, (C=10) a experimentální skupinu, tj. zvířata, u kterých byl vyvolán epileptický status (SE), (SE=20).

## 6.2 Indukce status epilepticus

Experimentální SE byl vyvolán s použitím lithium pilokarpinového modelu. (Kubová, Mareš, 2013). Jedenáctidenním mlád'atům potkana (P11) byl intraperitoneálně podán roztok LiCl ve fyziologickém roztoku (# L-0505, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO; 127mg/4ml/kg).

O 24 hodin později byla zvířata umístěna do izolovaných plastových klíček a byl jim podán intraperitoneálně pilokarpin (# P-6503, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO; 40mg/5ml/kg). Po celou dobu sledování a seperace od matky byla s pomocí Physiological-Biological Temperature Controller (TMP-5b; Supertech; Hungary) ve sledovacích klíčkách zajištěna teplota  $32 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , což odpovídá teplotě v hnízdě. (Conklin, Heggeness, 1971)

Pro snížení mortality v experimentální skupině byl 1,5 hodiny po začátku kontinuální epileptické aktivity podán paraldehyd (# 76260, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland; 0,07 ml/4ml/kg i.p.). Kontrolní zvířata dostala místo pilokarpinu fyziologický roztok v odpovídajícím objemu. Ostatní postupy včetně podání farmak byly stejné pro experimentální i kontrolní skupinu.

Tíže SE byla hodnocena podle následující stupnice: (Kubová, Mareš, 2013)

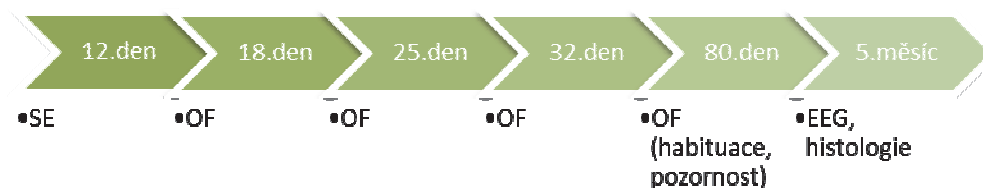
- 0 – normální chování
- 1 – stereotypní chování (drbání, mytí), izolované myoklonické záškuby
- 2 – pivotování, plavací pohyby, třes hlavy
- 3 – klonické křeče se zachovalými vzpřimovacími reflexy
- 4 – opakované periody rychlého běhu
- 5 – generalizovaný tonicko-klonický záchvat se ztrátou vzpřimovacích reflexů

Každému zvířeti ve skupině bylo přiřazeno skóre odpovídající nejzávažnějším projevům. Latence SE byla stanovena jako doba do manifestaci prvního motorického záchvatu. Mortalita byla evidována po celou dobu sledování zvířat.

Asi 4 hodiny po aplikaci pilokarpinu byl mláďatům podán subkutánně fyziologický roztok v objemu 0,5 ml jako prevence dehydratace a pak byla mláďata vrácena k matce.

### 6.3 Testování důsledků časného SE na vývoj

V rámci diplomové práce jsem se podílela na hodnocení pouze části rozsáhlé studie, zaměřené na dlouhodobé důsledky časného epileptického statu. Konkrétně se jednalo o „off-line“ analýzu chování zvířat. Pro úplnost tedy uvádím, že po ukončení behaviorálního testování byla zvířata dále sledována pro výskyt epileptických záchvatů s pomocí video/EEG monitoringu a po ukončení pokusů byly jejich mozky podrobeny morfologické analýze. Zvířata byla sledována až do věku 5 měsíců (Obrázek 11)



**Obrázek 11. Schéma pokusu P12 indukce SE LiCl - pilokapinem, P18, P25 a P32 opakované provedení testu „open field“ ve čtyřech sezeních s intervalem 60 minut, P80 test „open field“ se zaměřením na habituaci a pozornost, 5. měsíc EEG, morfologická analýza**

Během prvního týdne po SE byla zvířata každý den vážena a jejich zdravotní stav byl kontrolován po celou dobu experimentu. Mortalita experimentálních zvířat (skupina SE) byla 40%. K dalšímu testování bylo tedy použito 10 kontrolních a 12 experimentálních zvířat.

Třicet minut před zahájením prvního testování byla zvířata přemístěna ze zvěřince do laboratoře, k aklimatizaci na experimentální podmínky.

#### 6.4 „Open field“ (OF)

Tento test se obecně používá k měření explorační (prozkoumávací), spontánní lokomoce, ale i studiu emocionality a jednoduchých forem paměti u potkanů. (Hall, 1934) Jsou používány různé varianty tvaru arény, osvětlení, přítomností překážek apod. Postup spočívá ve vystavení zvířete neznámému prostředí, ze kterého je zabráněno úniku okolními stěnami. (Walsh, Commins, 1976) Zvíře (potkan) po umístění do tohoto pro něj nového prostředí, jej začne spontánně a aktivně prozkoumávat (explorace). (Obrázek 12) To se projeví zvýšenou lokomocí (přemisťováním) a orientačním chováním (čichání a panáčkování).



**Obrázek 12. Ukázka probíhajícího „open field“ testu**

Zvíře je umístováno do středu i na okraj arény, dle typu testu a nahráváno po dobu 2-20 minut (obvykle 5 minut). Jsou sledovány různé veličiny, horizontální a vertikální aktivita, panáčkování, péče o srst, preference obvodové či centrální oblasti a další.

Např. zvýšená úzkost (anxieta) se může projevit snížením explorační a thigmotaxické preferencí stěn. Opakovaným testem v témže prostředí lze testovat habituaci (navyknutí), tedy v tomto kontextu může být nazván též habituacním testem.

Open field test představuje pro zvířata mírnou formu stresu. Zde jsou schopni habituovat kolem doby odstavu, P25 - P28.

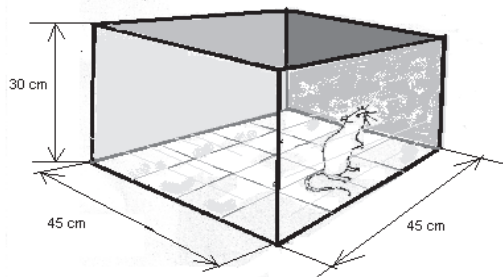
Test „open field“ probíhal opakovaně ve věku 18, 25 a 32 dní (tj. 6, 13 a 20 dní po SE). Každý test byl tvořen 4 sezeními (sezení = umístění zvířete do prostoru „open field“), každé trávající 5 minut s 60ti minutovým intervalem mezi jednotlivými sezeními. Testovací aréna byla tvořena boxem čtvercového půdorysu o rozměrech 45x45cm s neprůsvitnými stěnami vysokými 30 cm a s odkrytou horní částí. (Obrázek 13)

Na začátku testu byl potkan umístěn do levého dolního rohu arény a jeho chování bylo registrováno pomocí kamery (Panasonic Wv BP330), zavěšené 1 metr nad středem sledovaného prostoru. (Obrázek 14) Data byla ukládána pro pozdější analýzu.

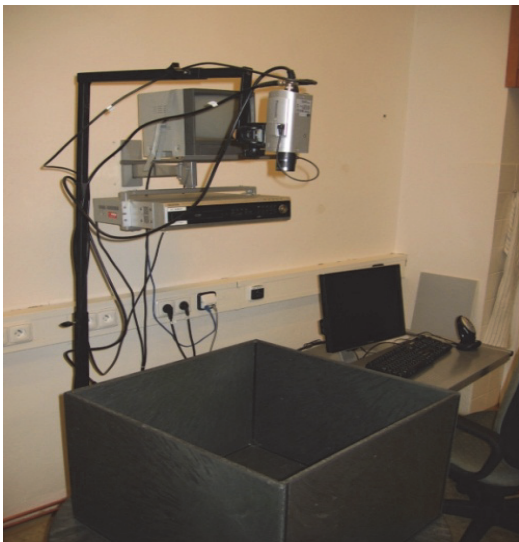
Aréna byla po testování každého zvířete důkladně očištěna vlhkým kusem látky a vysušena, aby se omezilo ovlivnění chování pachovými stopami.

Chování zvířat bylo analyzováno „off-line“ pomocí programu EthoVision (Noldus Information Technology).





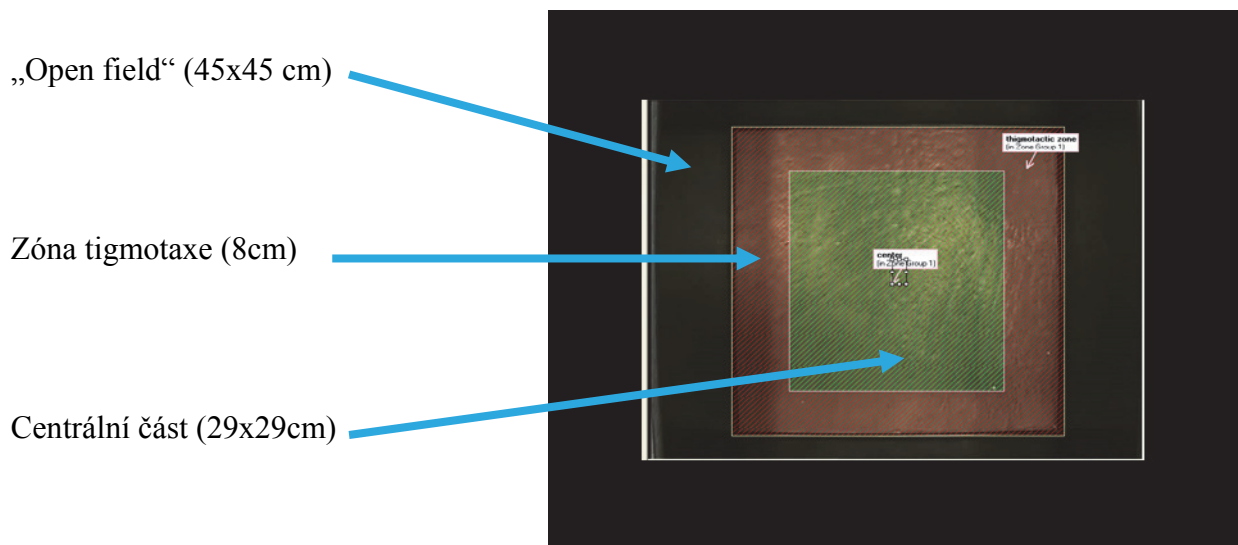
**Obrázek 13. Schéma testovací arény**



**Obrázek 14. „Open field“ se snímacím zařízením**

Hodnocené parametry v jednotlivých sezeních:

- Lokomoce, vyjádřená jako celková vzdálenost v cm, kterou zvíře ušlo během sledované doby („distance moved“)
- Čas strávený chůzí podél stěn OF („thigmotactic duration“)
- Latence 1. vstupu do centrální části OF („center latency“)
- Počet vstupů do centrální části OF („center frequency“)
- Čas strávený v centrální části OF („center duration“)



**Obr. 14 Rozvržení jednotlivých zón v „open field“ boxu**

Rozvržení jednotlivých zón v testovacím boxu „open field“ pro potřeby počítačového hodnocení programem EthoVision. Ve skutečnosti zóny viditelně nerozlišitelné

### 6.5 Statistická analýza

Pro zpracování výsledků byl použit program SigmaStat® (SPSS Inc., Chicago, IL).

Všechna data jsou uváděna jako průměr (mean) a směrodatná odchylka (standard error).

K vyhodnocení sledovaných parametrů jsme použili neparametrické testy s analýzou rozptylu ANOVA (Sigma Stat, Jandel), ANOVA on Ranks (Kruskal - Wallis test) pro porovnání kontrolní a SE skupiny zvířat a RM ANOVA on Ranks (Friedman test) u opakovaných měření (pro porovnání 1. - 4. sezení). Za hladinu statistické významnosti jsme považovali 5%.

## 7 VÝSLEDKY

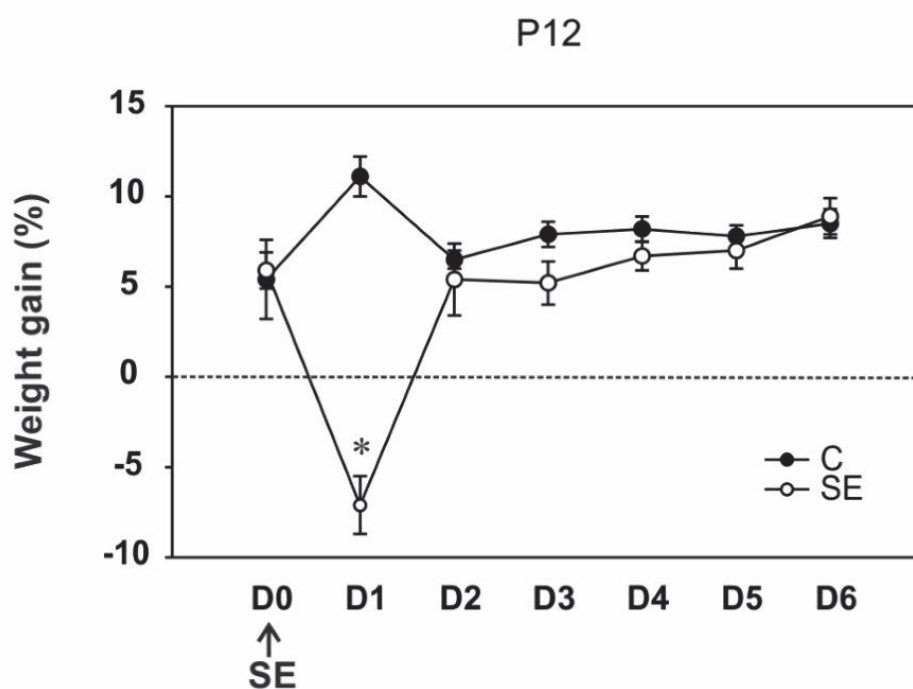
Mortalita v prvních 24h po SE byla 40%. V dalších intervalech bylo přežití 100%.  
V kontrolní skupině neuhynulo během celé doby sledování žádné zvíře.

### 7.1 Vliv SE na růst zvířat

Během prvních 24 hodin po SE byl váhový přírůstek SE zvířat signifikantně nižší než u kontrolních zvířat ( $-7.1 \pm 6\%$  vs.  $+11.1 \pm 1.1\%$ ;  $p < 0.001$ )

V dalších dnech zvířata z obou skupin přibývala na váze srovnatelným způsobem.

(Obrázek 15)



**Obrázek 15.** Váhové přírůstky osa x - dny (D) po SE, osa y - % přírůstek během prvního týdne po SE, D0 = den vyvolání SE, C - kontroly, SE - zvířata po SE

## 7.2 Celková vzdálenost („distance moved“)

U P18 nejsou rozdíly mezi kontrolní skupinou a SE zvířaty, ačkoli s opakovaným vystavením zvířat k OF zejména v třetím a čtvrtém sezení je vidět mírně rostoucí tendence lokomoce u SE zvířat. Dle statistické analýzy není rozdíl signifikantní. U posledního sezení je u obou skupin vidět mírná tendence k snížení lokomoce po aréně OF. (Obrázek 16 A)

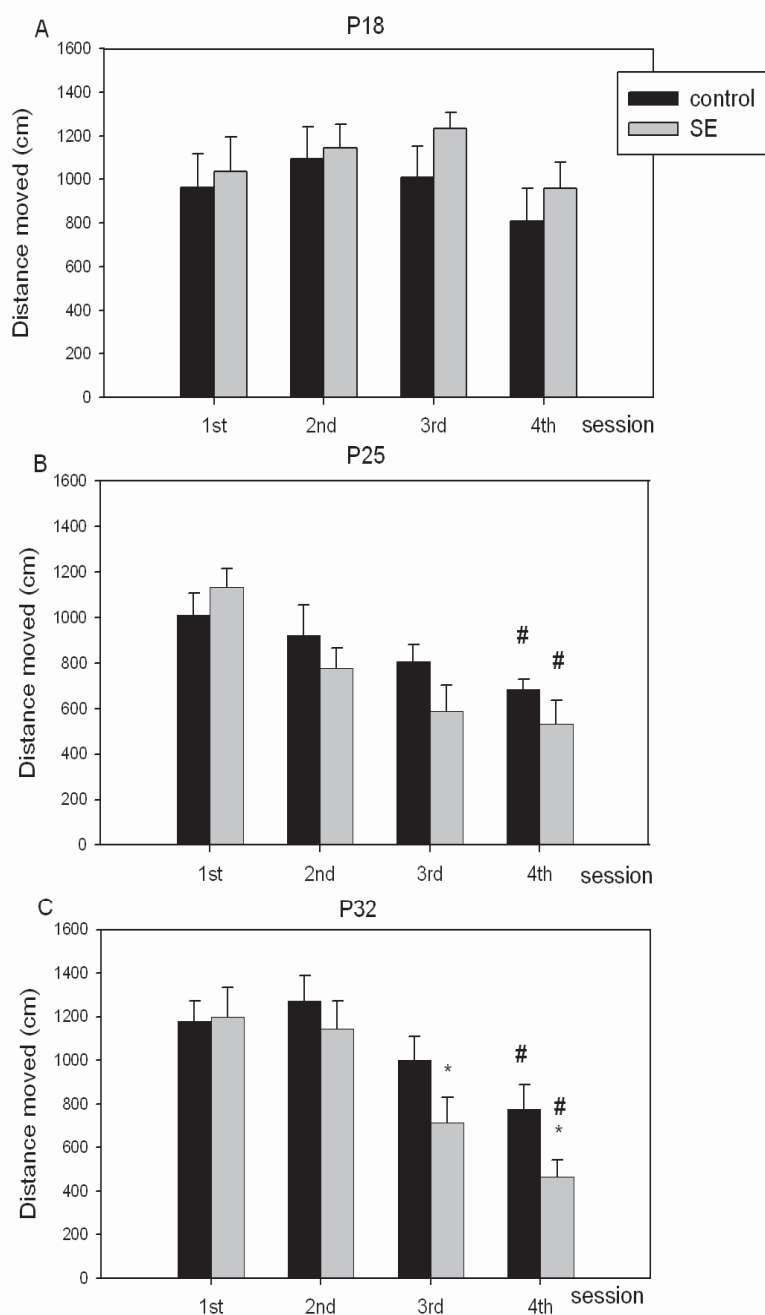
U P25 je ve srovnání s kontrolní skupinou v prvním sezení patrná rostoucí tendence lokomoce u SE zvířat. V následujících třech sezeních došlo k poklesu lokomoce SE zvířat vůči kontrolní skupině. Statistická analýza neprokázala signifikantní rozdíl.

Statistická analýza prokázala u obou skupin po opakovaném měření signifikantní pokles lokomoce ve čtvrtém sezení oproti prvnímu sezení. U SE ( $P= 0,003$ ) a u C ( $P= 0,01$ ). (Obrázek 16 B)

U P32 se v prvním sezení neliší úroveň aktivity u SE zvířat a kontrolní skupiny, ve druhém sezení dochází u SE zvířat k snížení lokomoce a ve třetím a čtvrtém sezení byl statistickou analýzou prokázán signifikantní pokles lokomoce SE zvířat oproti kontrolní skupině.

Ve třetím sezení došlo k signifikantnímu poklesu lokomoce u SE zvířat oproti kontrolní skupině ( $P= 0,09$ ) a ve čtvrtém sezení ( $P= 0,03$ ).

Po opakovaném vystavením zvířat v OF došlo u obou skupin k signifikantnímu poklesu lokomoce ve čtvrtém sezení ve srovnání s prvním sezením u SE zvířat ( $P= 0,002$ ) a u kontrolní skupiny ( $P= 0,006$ ). (Obrázek 16 C)



**Obrázek 16. Test „open field“ („distance moved“)**

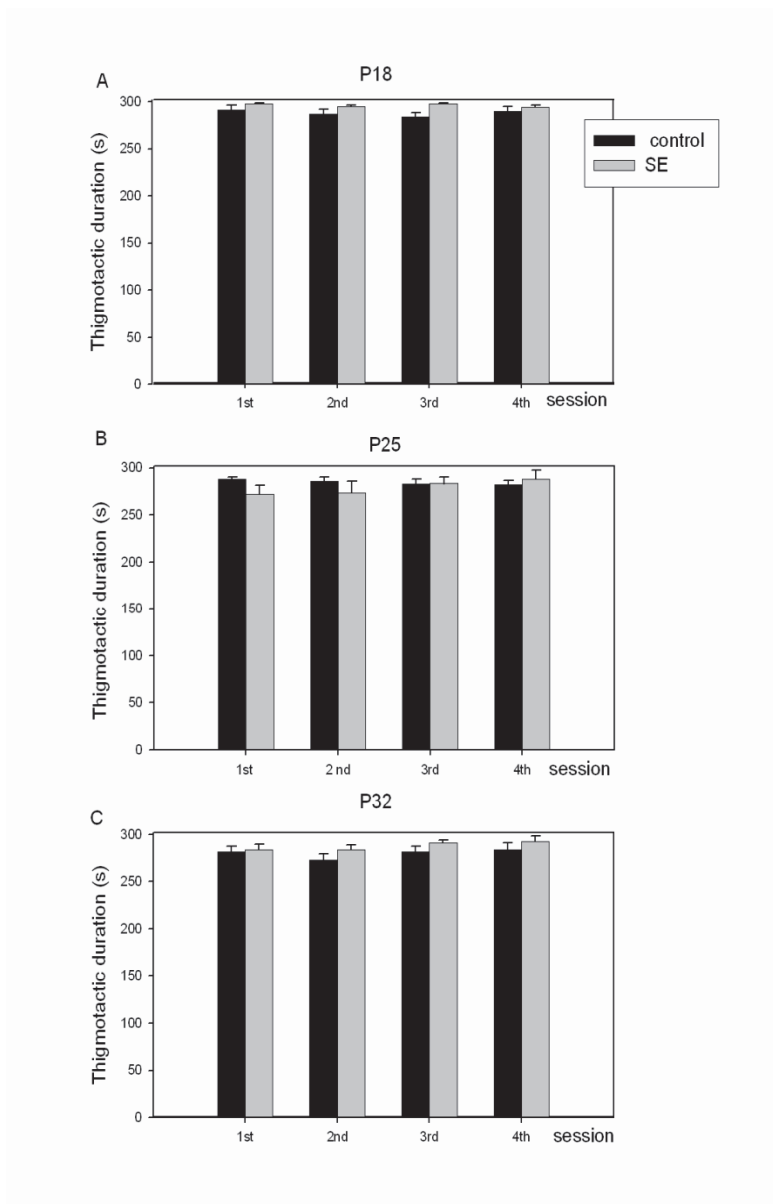
Hodnocení celkové lokomoce, kterou zvíře urazilo v cm (osa y). Test probíhal ve čtyřech po sobě jdoucích sezeních (osa x), ve třech věkových kategoriích (P18-A, P25-B, P32-C). Černé sloupce=kontrolní skupina (C), šedé sloupce=SE zvířata (SE).

\* značí statisticky významné rozdíly SE zvířat oproti kontrolní skupině

# značí statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sezeními

### 7.3 Čas strávený chůzí podél stěn OF („thigmotactic duration“)

Ani v jedné z testovaných věkových skupin nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi SE zvířaty a kontrolní skupinou v jednotlivých sezeních, zvířata obou skupin tedy trávila chůzí podél stěn stejně času. (Obr. 17)



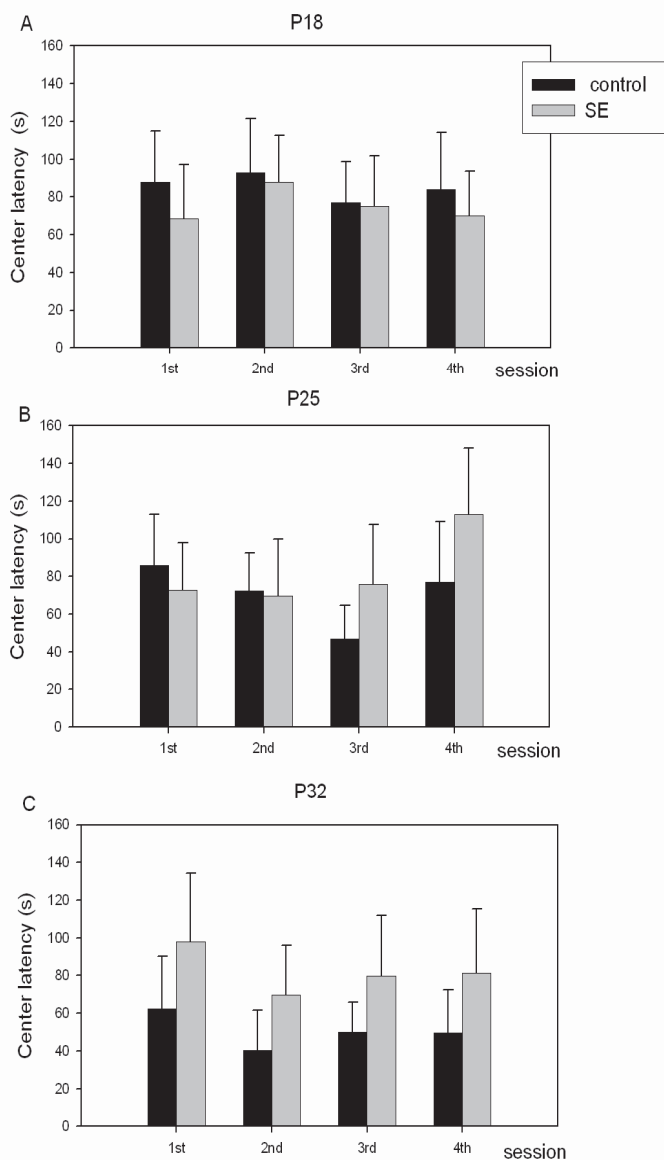
**Obrázek 17. Test „open field“ („thigmotactic duration“)** Hodnocení času stráveného chůzí podél stěn OF v sekundách (osa y). Test probíhal ve čtyřech po sobě jdoucích sezeních (osa x), ve třech věkových kategoriích (P18-A, P25-B, P32-C). Černé sloupce= kontrolní zvířata (C) a šedé sloupce=SE zvířata (SE)

#### 7.4 Doba prvního vstupu do centrální části OF („center latency“)

Ohledně prvního vstupu do centrální části OF u P18 nejsou rozdíly mezi SE zvířaty a kontrolní skupinou. (Obrázek 18 A)

U P25 statistická analýza neprokázala signifikantní rozdíly, přesto u SE zvířat je patrná tendence k prodloužení doby prvního vstupu ve třetím a čtvrtém sezení. (Obrázek 18 B)

U P32 SE zvířat byla doba prvního vstupu prodloužena ve všech čtyřech sezeních, i když statistická analýza signifikanci neprokázala. (Obrázek 18 C)



**Obrázek 18. Test „open field“ („center latency“)**

Hodnocení doby prvního vstupu do centrální části OF v sekundách (osa y). Test probíhal ve čtyřech po sobě jdoucích sezeních (osa x), ve třech věkových kategoriích (P18-A, P25-B, P32-C). Černé sloupce= kontrolní zvířata (C), šedé sloupce=SE zvířata (SE)

\* značí statisticky významné rozdíly SE zvířat oproti kontrolní skupině

# značí statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sezeními

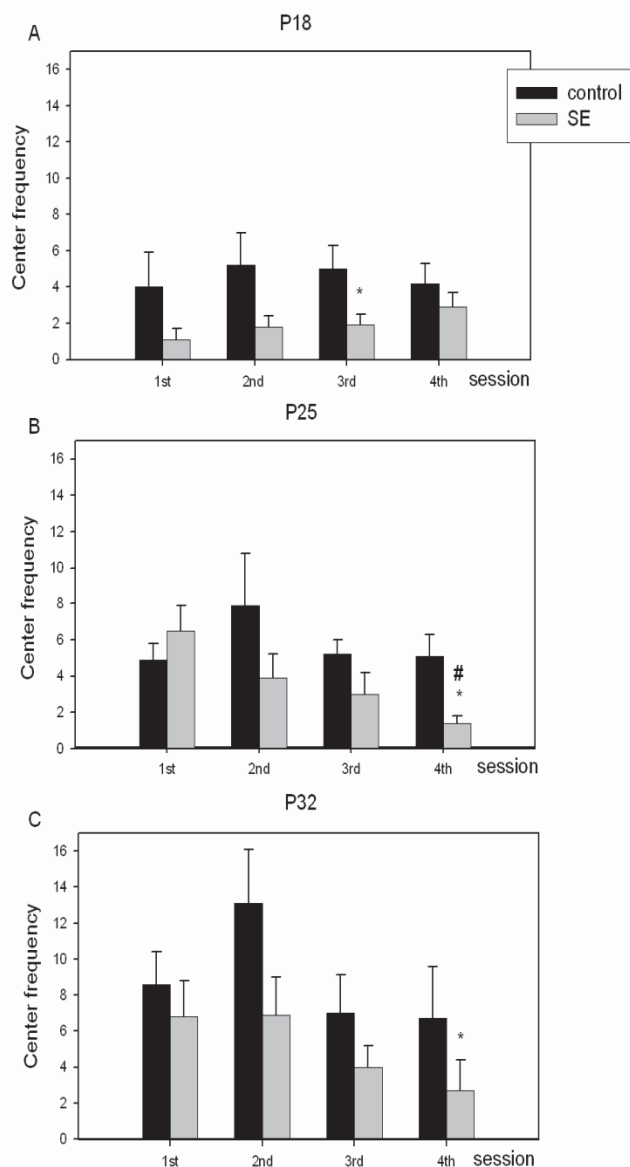


## 7.5 Počet vstupů do centrální části OF („center frequency“)

U P18 SE byla frekvence vstupů do centra snížena ve všech sezeních, ačkoli signifikantně byla prokázána pouze ve sezení třetím ( $P=0,05$ ). (Obrázek 19 A)

U P25 byla frekvence vstupů do centra areny nižší u SE zvířat ve všech měřeních s výjimkou prvního, přičemž ve čtvrtém sezení byl tento pokles statisticky signifikantní ( $P=0,02$ ). Statistická analýza prokázala s opakovaným měřením signifikantní rozdíl ve čtvrtém sezení u SE zvířat ve srovnání s prvním sezením ( $P=0,09$ ). (Obrázek 19 B)

U P32 SE zvířat ve čtvrtém sezení byly získány obdobné výsledky jako u P25. Signifikantně se snížil počet vstupů do centra ( $P=0,04$ ). (Obrázek 19 C)



**Obrázek 19. Test „open field“ („center frequency“)** Hodnocení počtu vstupů do centrální části OF (osa y). Test probíhal ve čtyřech po sobě jdoucích sezeních (osa x), ve třech věkových kategoriích (P18-A, P25-B, P32-C). Černé sloupce=kontrolní zvířata (C), šedé sloupce=SE zvířata (SE)

\* značí statisticky významné rozdíly SE zvířat oproti kontrolní skupině

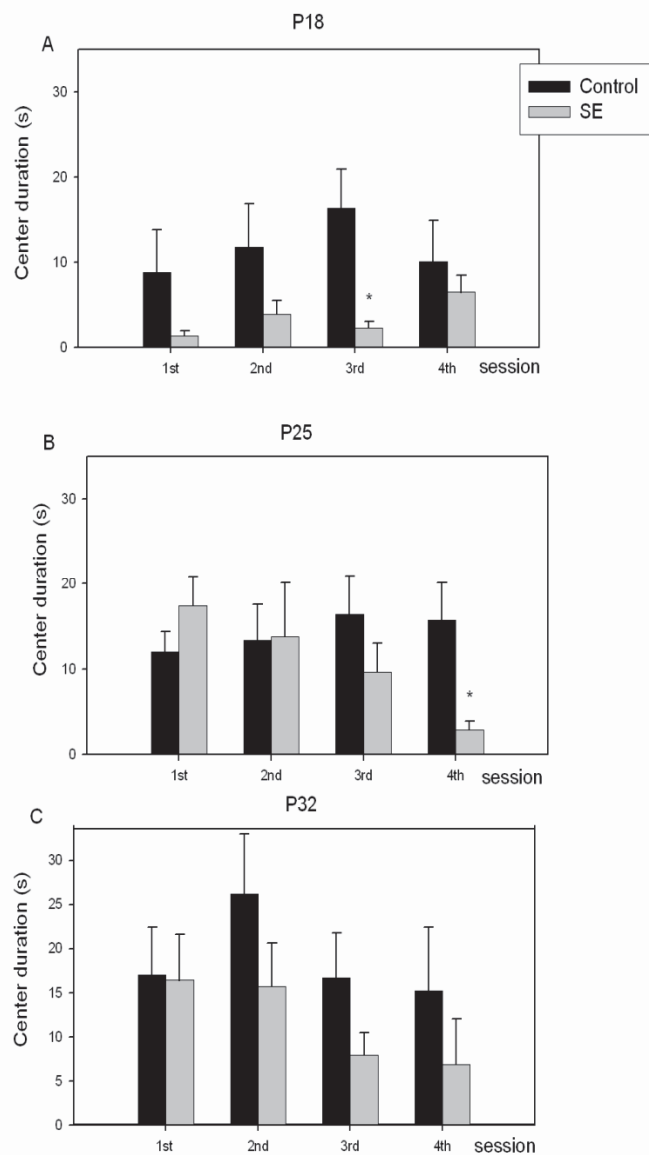
# značí statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sezeními

## 7.6 Čas strávený v centrální části OF („center duration“)

P18 SE zvířata trávila méně času v centrální části OF. Ve třetím měření došlo k signifikantnímu zkrácení doby pobytu v centru u SE zvířat ve srovnání s kontrolní skupinou ( $P=0,03$ ). (Obrázek 20 A)

U P25 došlo ve třetím a čtvrtém sezení k poklesu doby strávené v centru, avšak statisticky signifikantně pouze v sezení čtvrtém. ( $P=0,009$ ). (Obrázek 20 B)

U P32 SE zvířat ve druhém až čtvrtém sezení došlo k poklesu doby strávené v centru, i když na statisticky nevýznamné úrovni. (Obrázek 20 C)



**Obrázek 20. Test „open field“ („center duration“)**

Hodnocení času stráveném v centrální části OF v sekundách (osa y). Test probíhal ve čtyřech po sobě jdoucích sezeních (osa x), ve třech věkových kategoriích (P18-A, P25-B, P32-C). Černé sloupce=kontrolní zvířata (C), šedé sloupce=SE zvířata (SE)

\* značí statisticky významné rozdíly SE zvířat oproti kontrolní skupině

# značí statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými sezeními

## 8 DISKUSE

Vzhledem k tomu, že nemohou existovat experimentální práce zaměřené na studium nejen motorického, ale i kognitivního vývoje dítěte, které prodělalo v časném postnatálním období epileptický status či jiný epileptogenní impuls, položili jsme si hypotetickou otázku. Vede prodělání izolovaného epileptického statu v časných vývojových stádiích potkana k dlouhodobému ovlivnění kognitivních funkcí a k alteraci vývoje kognitivních schopností? Lze výsledky aplikovat do humánní medicíny?

Tato práce je součástí rozsáhlé studie, zaměřené na důsledky časného poškození vyvíjejícího se mozku zvířecího modelu po chemicky navozeném epileptickém statu. Studie se zabývala vlivem SE na vývoj některých behaviorálních parametrů v korelaci se vznikem epilepsie a morfologickými změnami.

Studie byla zaměřena především na změny kognitivních schopností, jako je paměť, učení, dále změny chování, rozvoj anxiety, ale i na aktivity motorické. Tato diplomová práce srovnává chování P18 - P32 zvířat v „open field“ testu a zaměřuje se především na vývoj habituace jako formy jednoduchého učení.

Výsledky mé práce dokumentují krátkodobé změny chování testovaných SE zvířat oproti kontrolní skupině.

Pro přenos výsledků animálních experimentů do humánních studií je nezbytné vědět, jak koreluje vývoj hlodavců s vývojovými stádii u člověka. Srovnání vývoje rozdílných živočišných druhů je velmi obtížné, protože vývoj hlodavců není s vývojem člověka zcela paralelní. Existují však některé obecné parametry, které jsou pro tyto účely využívány; pro potřeby neurověd je sledován zejména vývoj nervového systému a jeho funkcí.

Dobbing (1970) se ve svých pracích soustředil zejména na srovnání biochemických parametrů a období “překotného růstu; growth spurt”, které se u člověka objevuje v průběhu několika posledních týdnů gestace, avšak u potkana zhruba až ve věku 10-12 dní postnatálně. Dalším důležitým parametrem je vývoj elektrické aktivity mozku. Nepravidelná elektroencefalografická aktivita (EEG) se u potkana objevuje ve věku 5-6 dní (Ellingson, Rose, 1970; Mareš, Zouhar, Brožek, 1979) a až do P10 je přerušována periodami elektrického ticha (tzv. tracé alternant) popisovaného sice u nedonošených dětí, avšak nikdy u plně maturovaných humánních novorozenců (Ellingson, 1964). Sexuální maturace probíhá u samců i samic potkana mezi P35 - P45 (Piacsek, Statham, Goodspeed, 1978). Tato data umožňují odvodit, že z hlediska vývoje mozku potkanů je období mezi 12. - 32. dnem jejich života ekvivalentem období časně postnatálního až začátku puberty člověka.

Pro potřeby této studie byla tedy použita mláďata potkana ve vývojovém stádiu srovnatelném s časným postnatálním obdobím člověka, čemuž u laboratorního potkana odpovídá období mezi P10 - P12, a byla testována až do P32, tedy zhruba období zahájení puberty.

P12 je u potkana vývojový mezník, o kterém na základě předchozích studií víme, že ještě není ukončen vývoj klíčových struktur temporálního laloku (hipokampus a amygdala), zásadních pro paměť, učení, chování a emoce. Toto období je proto vhodné k vyvolání experimentálního insultu (SE).

Základem práce bylo využití již vytvořeného standardního Li/pilo modelu, používaného v experimentální epileptologii pro všechny věkové skupiny zvířat. (Cavalheiro, Naffah-Mazzacoratti, Mello, Leite, 2006) Li/pilo model je typickým obrazem epilepsie temporální, tedy epilepsie vycházející ze struktur temporálního laloku (Brázdil, Marusič a kol., 2006). Status epilepticus je u studovaných zvířat vyvoláván chemicky, podáním nízkých dávek pilokarpinu zvířatům premedikovaným chloridem lithia (LiCl).

U dospělých jedinců jsou důsledky SE v tomto modelu velmi devastující, dochází k rozsáhlému strukturálnímu poškození mozku i jeho funkcí. S poměrně krátkým odstupem od SE se objevují časté epileptické záchvaty. (Cavalheiro et al., 2006) Rozsah funkčního i morfologického po vyvolání SE poškození klesá s klesajícím věkem (přehledně Kubová, 2011). Řadu let byl nezralý mozek (u mláďat potkana první 3 týdny věku) pokládán za resistantní ke vzniku poškození vyvolanému intenzivní epileptickou aktivitou (tedy i epileptickým statem). Teprve s použitím nových technologií však byly změny chování, mozková atrofie a vznik epilepsie potvrzen již u zvířat vystavených působení SE ve věku P12 (Nairismägi a kol., 2006; Kubová, Mareš, 2013).

Jedním z následků u Li/pilo modelu, tedy provokované temporální epilepsie, pozorovaným u laboratorních zvířat, je porucha kognitivních funkcí u postiženého jedince. (Kubová et al., 2004; Kubová, Mareš, 2013) Dříve publikované studie dokumentují mírnou poruchu schopnosti učení u dospělých potkanů, vystavených SE na P12 (přehledně Kubová, 2011). S pomocí Morrisova vodního bludiště, nejčastěji používaného testu pro hodnocení prostorové paměti u laboratorních hlodavců, bylo prokázáno, že postižení jedinci se učí stejně, jako jejich zdraví sourozenci. Nikdy však v tomto testu nedosahují stejné výkonnosti (Kubová, Mareš, 2013). Dosud však nebyly dostupné údaje o ovlivnění vývoje kognitivních funkcí u mláďat postižených SE na časných stadiích vývoje.

V naší studii byla vybrána habituace, jako nejjednodušší druh učení, které je nutné k tomu, abychom ignorovali podnět, který se nám stal známým a který nemá vážné následky.

Habituační je definována jako přirozené snižování odpovědi, vyvolané opakovaným vystavením konstantnímu stimulu, který nepředstavuje přímé ohrožení zvířete a není spojena s žádnými biologicky relevantními podněty ať pozitivními (jídlo jako odměna) či negativními (slabý elektrošok). V běžném životě představuje velmi významný proces, podílející se na adaptaci organismu na okolní prostředí a jeho změny.

U hlodavců představuje nejběžnější formu habituace postupné snižování exploratační aktivity zvířete při pokračujícím či opakovaném pobytu v původně novém, neznámém prostředí. V případě umístění zvířete do tohoto prostředí jednorázově či opakovaně s delšími intervaly mezi jednotlivými expozicemi pozorujeme u zdravého jedince pokles lokomoční a exploratační aktivity s časem stráveným v boxu. V případě opakovaného umístění jedince do tohoto prostředí v kratších intervalech (obvykle 60 min) pozorujeme pokles aktivity mezi jednotlivými sezeními (expozicemi) (Lister, 1990). V naší studii jsme použili pro hodnocení habituace („navyknutí“), která představuje jednoduchou formu neasociativního učení (Cohen, 1976), modifikaci „open field“ testu, kdy je pokusné zvíře opakovaně umístěno na dobu 5 minut do prostředí, které je pro něj zpočátku neznámé, tvořené plastovým boxem. Obecně se „open field“ test používá k měření explorace (prozkoumávání), spontánní lokomoce, ale může být použit i ke studiu emocionality u potkanů. (Hall, 1934).

Studie zaměřené na vývoj habituace prokázaly, že schopnost habituovat dozrává mezi 2. - 3. týdnem věku potkana a že úzce souvisí s dozráváním hipokampálních struktur. (Douglas et al., 1973)

V souladu s těmito daty ani naše studie neprokázala habituaci u 18ti denních zvířat, ale od P25 byla habituace, vyjádřená jako snížení lokomoční aktivity mezi 1. a 4. sezením, přítomna jak u zvířat po SE, tak u jejich kontrolních sourozenců.



Prokázali jsme tedy, že SE neovlivňuje habituaci při opakovaném vystavení novému prostředí a že tedy v krátkých intervalech po časném SE nedochází k poškození této formy učení.

Předcházející práce (Kubová, Mareš 2013) ovšem ukázala, že časný SE vede k retardaci vývoje habituace v průběhu trvání jednorázového pobytu pokusného zvířete v prostoru „open field“. Zatímco u kontrolní skupiny se lokomoční aktivita snižovala s časem pobytu v průběhu 5-ti minutové expozice již 18tý den věku, u zvířat s SE na P12 v anamnéze se toto zkracování objevilo až 25. den života. Tento rozdíl byl ovšem interpretován spíše jako zhoršení adaptability než jako porucha učení. (Kubová, Mareš, 2013)

V souladu s výsledky předešlých studií vykazovala zvířata s časným SE v našem testu výrazné prvky úzkostného chování. Byl omezen počet návštěv centrální, tedy „nebezpečné“ zóny boxu, přičemž, pokud ke vstupu došlo, byl výrazně kratší ve srovnání s kontrolní skupinou. Rovněž latence prvního vstupu do této oblasti byla delší. S použitím vyvýšeného křížového bludiště, testu, který je standardně využíván pro vyhledávání anxiolytik, bylo dříve zjištěno, že dospělá zvířata (stáří 3 měsíce) po SE na P12 projevují vyšší míru úzkosti v tomto testu (Kubová a kol, 2004). Předložená studie je však první, která prokazuje zvýšení anxiety již u mláďat a především v krátkých intervalech po časném SE. Je známo, že anxiety se projevuje v humánní medicíně u pacientů s temporální epilepsií významně častěji než u ostatní populace, většina studií je ovšem prováděna na dospělých jedincích a pediatrická data jsou velmi omezená. (Loutfi, Carvalho, Lamounier, Nascimento, 2011)

Odpovídají námi pozorované změny výsledkům předešlých studií, zaměřených na vznik epilepsie a morfologického poškození? S použitím specifických markerů, označujících ireversibilně poškozené neurony (FluoroJade B) bylo prokázáno, že SE vede u P12 potkanů k akutní neurodegeneraci v temporálních i extratemporálních strukturách (Druga, Mareš, Kubová, 2010; Kubová a kol., 2001). Tato akutní ztráta neuronů je následována postupnou

atrofií temporálních struktur. Signifikantní snížení objemu hipokampu bylo prokázáno asi 7 měsíců po SE, avšak tendence k poklesu objemu se objevuje dříve (Nairismägi a kol, 2006; Kubová, Mareš, 2013). Prokázali jsme tedy, že SE neovlivňuje habituaci při opakovaném vystavení novému prostředí a že tedy v krátkých intervalech po časném SE nedochází k poškození této formy učení.

U P18 SE zvířat byla ve všech čtyřech sezeních vyšší míra lokomoce, což může naznačovat hyperaktivitu. Skupina P25 a P32 naopak snížila míru lokomoce, statisticky signifikantně pouze ve třetím a čtvrtém sezení u P32. Změny lokomoce (změny chování obecně) mohou souviset s přetrvávající epileptickou aktivitou a například snížení lokomoce a vertikální aktivity je spojováno s post-iktálním útlumem. (Prut, Belzung, 2003). Studie probíhající v současné době ukazuje, že epileptické záchvaty se objevují u části zvířat ještě 6 dní po SE. Pak epileptická aktivita asi na týden mizí a 24 dní po SE jsou záchvaty opět registrovány u všech zvířat po SE (Kubová, osobní sdělení). Epileptické záchvaty se tedy mohou podílet na změnách motorické aktivity, ale souvislost musí být ještě potvrzena.

Zachování normálních motorických schopností testovaných zvířat je nezbytným předpokladem jejich úspěšnosti. I když se v souvislosti se vznikem epilepsie v dětském věku často objevují poruchy psychomotorického vývoje, změny motorických schopností či poruchy motorického vývoje jsou u mláďat, která prodělala SE v časných stádiích postnatálního vývoje naprosto výjimečná. Výsledky předcházejících studií naznačují určité zpomalení motorického vývoje těsně po SE a rovněž určité změny chování v některých senzomotorických testech (Kubová, Haugvicová, Suchomelová, Mareš, 2000; Kubová, Mareš, 2013). Zdá se, že tyto změny souvisejí spíše se ztrátou motivace, zvýšenou anxiétou či probíhajícími epileptickými záchvaty než s poruchou motoriky.

Behaviorální výsledky prezentované v této práci představují pouze část rozsáhlé studie. Zvířata byla podrobena „open field“ testu ještě v delších intervalech, poté byla podrobena kontinuálnímu video/EEG monitoringu pro detekci spontánních epileptických záchvatů a nakonec proběhla morfologická analýza jejich mozkové tkáně. Data z této studie jsou ještě zpracovávána, výsledky však předběžné dokazují tendenci ke snížení objemu hipokampu a výskyt epilepsie u asi 50% jedinců s SE na P12. Případné spojení mezi časnými změnami chování a dalším průběhem onemocnění budou dále studovány.

## 9 ZÁVĚR

Naše studie ukazuje, že konvulsivní status epilepticus vede v nezralém mozku k alteraci chování, i když není provázen přítomností dalších patologií, například horečkou, neuroinfekcí, nebo jiným infekčním onemocněním, krvácením do mozku a podobně; postižení je poměrně mírné. Tato studie neprokázala, v souladu s dříve publikovanými pracemi, vznik motorického poškození ani významné změny ve vývoji kognitivních schopností. Naše výsledky ovšem jasně prokazují zvýšenou anxiету ve vývojovém období srovnatelném s předškolním věkem a obdobím základní školní docházky u člověka. Tato změna chování spolu s dalšími funkčními změnami, prokázanými v předcházejících pracech, naznačují, že i bez dramatického poškození mozku může časný epileptický status významně ovlivnit vývoj jedince. I když přenos dat z experimentů, prováděných na zvířatech, do humánní praxe je velmi komplikovaný, naše i předchozí výsledky naznačují, že i malé změny chování spolu s rozvojem mírné formy epilepsie během těchto kritických fází vývoje mohou významně ovlivnit další začlenění jedince a jeho schopnosti a dovednosti v průběhu dalšího života.

## 10 REFERENČNÍ SEZNAM

- de Assis T. M., Costa G., Bacellar A., Orsini M., Nascimento O. J. (2012). Status epilepticus in the elderly: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Neurol Int* 4(3.)
- Altman J., Sudarshan K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim.Beha*, 23, 896-920.
- Bâ A. , Seri B. V. (1995) Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. *Neurosci Biobehav Rev.* 19(3), 413-25.
- Blanchard D. C., Blanchard R. J., Griebel G.(2005) Defensive responses to predator threat in the rat and mouse. *Curr Protoc Neurosci.*
- Bolles R. C., Woods P. J. (1964). The ontogeny of behaviour in albino rat. *Animal bahaviour* 12 (4), 427-441.
- Brázdil M., Hadač J. (2004). *Farmakorezistentní epilepsie*. Praha: Triton.
- Brázdil M., Marusič P. a kol. (2006). *Epilepsie temporálního laloku*. Praha: Triton.
- Calamandrei G. (2004) Ethological and methodological considerations in the use of newborn rodents in biomedical research. *Ann Ist Super Sanita.* 40(2), 195-200.
- Carman H. M., Mactutus C. F. (2001) Ontogeny of spatial navigation in rats: a role for response requirements? *Behav Neurosci.* 115(4), 870-9.

- Carman H. M. , Booze R. M. , Snow D. M., Mactutus C. F. (2003) Proximal versus distal cue utilization in preweanling spatial localization: the influence of cue number and location. *Physiol Behav.* 79(2), 157-65
- Cavalheiro E. A., Naffah- Mazzacoratti M.G., Mello L.E., Leite J.P.(2006). In Pitkänen A., Cohen L. B.(1976). Habituation of infant visual attention. In Tighe T. J., Leaton R. N. *Habituation: perspectives from child development, animal behavioral and neurophysiology* (159-206). New York: Wiley.
- Conklin P., Heggeness F. W.(1971) Maturation of temperature homeostasis in the rat. *Am J Physiol.* 220(2), 333-6.
- Dichter M. A. (1989). Cellular mechanism of epilepsy and potential new treatment strategies. *Epilepsia*; 30 (1), 3-12.
- Dichter M. A. (1997). Basic mechanisms of epilepsy: targets for therapeutic intervention. *Epilepsia* 38(9), 2-6.
- Dobbing, J. (1970). Undernutrition and the developing brain. In Himwich, W. A. (ed) *Developmental Neurobiology*. Charles C. Thomas Pbl., Springfield, Il, 241-261.
- Douglas R. J., Pagano R. R. , Lovely R. H. , Peterson J. J.(1973) The prolonged effects of a single ECS on behavior related to hippocampal function. *Behav Biol.* 8(5), 611-7.
- Druga R., Mareš P., Kubová H. (2010). Time course of neuronal damage in the hippocampus following lithium-pilocarpine status epilepticus in 12-day-old rats. *Brain Res.*1355, 174-9

- Dumery V. , Derer P. , Blozovski D. (1988) Enhancement of passive avoidance learning through small doses of intra-amygdaloid physostigmine in the young rat. Its relation to the development of acetylcholinesterase. *Dev Psychobiol.* 21(6), 553-65.
- Elligson, R.J. (1964). Studies of electrical activity of the developing human brain. *Progress in Brain Research*, 9, 26-53.
- Ellingson, R. J., Rose, G. H. (1970). Ontogenesis of the electroencephalogram. In Himwich, W. A. (ed), *Developmental Neurobiology*. Ed. Charles C. Thomas Pbl., Springfield, Il, 441-474.
- Fisher R. S, van Emde Boas W., Blume W., Elger C., Genton P., Lee P., Engel J. Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 46(4), 470-2.
- Gottlieb A., Keydor I., Epstein H. T. (1977). Rodent brain growth stages. An analytical review. *Biol Neonate* 32,166-176.
- Gramsbergen A. (1998). Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Inderdependent Development? *Neuroscience and Behav Reviews* 22(4), 547-553.
- Hall C. S. (1934). Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J.Comp.Psychol.* 18, 385-403.
- Hauser W. A. (1990). Status epilepticus: epidemiological considerations, *Neurology*, 40, 9-13.

Hauser W. A., Hesdorffer D.C. (1990). *Epilepsy: frequency, causes and consequences*. New York: Demos Publ.

Hauser, W.A., Annegers, J.F., Kurland, L.T. (1991). Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia*, 32, 429-45

Hauser W. A. (1992) Seizure disorders: the changes with age. *Epilepsia*, 33 Suppl 4, S6-14.

Hesdorffer D.C., Logroscino G., Cascino G., Annegers J.F., Hauser W.A. (1998) Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Ann Neurol*, 44(6), 908-12.

Hovorka J., Herman E. , Nežádal T. (2004). Epilepsie a základy antiepileptické léčby- část 1.Diagnostika a léčba. *Psych pre prax* 3, 114-120.

Chen J.W., Naylor D.E., Wasterlain C.G. (2007) Advances in the pathophysiology of status epilepticus. *Acta Neurol Scand*, Suppl.186, 7-15.

Ikonomidou C., Bittigau P., Koch C., Genz K., Hoerster F., Felderhoff-Mueser U.,

Tenkova T., Dikranian K., Olney J.W. (2001) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol*. 62(4): 401-5.

ILAE: [http://www.ilae.org/Visitors/Centre/ctf/documents/ClassificationReport\\_2010\\_000.pdf](http://www.ilae.org/Visitors/Centre/ctf/documents/ClassificationReport_2010_000.pdf)



- Klein Z.A., Romeo R.D. (2013) Changes in hypothalamic-pituitary-adrenal stress responsiveness before and after puberty in rats. *Horm Behav.*
- Komárek V. (2007a). Léčba epileptických syndromů u dětí. *Česká a Slovenská neurologie a neurochirurgie* 70/103(5) , 473-487.
- Komárek V. (2007b). Léčba věkově vázaných epileptických syndromů s příznivější prognózou. *Neurologia pre praxi* 2, 83-86.
- Kubová H. (2002). *Epileptogeneza v nezralém mozku zkušenost z experimentálních studií.*  
Fyziologický ústav AVČR. Praha
- Kubová H., Haugvicová R., Suchomelová L., Mareš P. (2000). Does status epilepticus influence the motordevelopment of immature rats? *Epilepsia* 41(Suppl.6) , 64-69.
- Kubová, H., Druga, R., Lukasiuk, K., Suchomelová, L., Haugvicová, R., Pitkänen, A. (2001).  
Status epilepticus causes necrotic damage in the mediodorsal nucleus of the thalamus in immature rats. *J. Neurosci.* 21, 3593-3599.
- Kubová H., Mareš P., Suchomelová L., Brožek G., Druga R., Pitkänen A. (2004). Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *European Journal of Neuroscience*, Vol.19, 3255-3265.
- Kubová H. (2009). Základní mechanismy vzniku epileptických záchvatů. In Ošlejšková H., Nakladatelství ADELA, 19-27

Kubová H. (2011). Experimental models of epileptogenesis. V Wang Ch., Slikker W. Jr.

*Developmental Neurotoxicology Research: Principles, Models, Techniques, Strategies, and Mechanisms.* John Wiley and Sons, Inc.

Kubová H., Lukasiuk K, Pitkänen A. (2012). New insight on the mechanisms of

epileptogenesis in the developing brain.V *Pediatric Epilepsy Surgery. Advances and Technical Standards in Neurosurgery.* Eds. Akalan, N and Di Rocco C, 39, 3-44, Springer-Verlag, Wien.

Kubová H, Mareš P. (2013). Are morphological and functional consequences of status

epilepticus in infant rats progressive? *Neuroscience.* 3, 235, 232-49.

Leon M. (1992) Neuroethology of olfactory preference development. *J Neurobiol.* 23(10), 1557-73.

Lemos T., Cavaleiro E. A. (1995). Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus

and the late development of epilepsy in rats. *Exp Brain Res,* 102(3), 423-8.

Lister R. G. (1990) Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol*

*Ther.* 46(3), 321-40

Loddenkemper T., Goodkin H. P. (2011). Treatment of pediatric status epilepticus. *Current*

*treatment options in neurology,* 13, 560-573.

Loutfi K. S., Carvalho A.M., Lamounier J.A., Nascimento J.de A.(2011) ADHD and epilepsy:

contributions from the use of behavioral rating scales to investigate psychiatric comorbidities. *Epilepsy Behav.* 20(3), 484-9.

- Lowenstein D. H. (1998). Status epilepticus. *West J Med* 168, str. 263.
- Lynn D.A., Brown G.R. (2010) The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Dev Psychobiol.* 52(8), 731-9.
- Mareš P., (1992). V Kapitoly z moderní neurofyziologie a epileptologie, Libor Velíšek a kol., UK Praha.
- Mareš, P., Zouhar, A., Brožek, G. (1979). Ontogenetic development of electrocorticogram in the rat. *Activ. Nerv. Super.* 21, 218–225.
- Mareš P., Folbergrová J., Langmeier M., Haugvicová R., Kubová H. (1997). Convulsant action of D, L-homocysteic acid and its stereoisomers in immature rats. *Epilepsia* 38, 767-779.
- Marik P. A., Varon J. (2008). The management of status epilepticus. *Chest Journal*.
- Marusič P., Krijtová H. (2011). Kompenzovaný pacient s epilepsií- cesta a cíl. *Neurol.prax.* 12(6) , 393-395.
- Mlčoch Z. (2008). Status epilepticus, epileptický status- léčba, definice, příznaky, příčiny, následky.
- Nairismägi J., Pitkänen A., Kettunen M. I., Kauppinen R. A., Kubová H. (2006). Status epilepticus in 12-day old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: a histologic and MRI study. *Epilepsia* 47(3), 479-488.
- Najm I. M., Janigro D., Babb T. L. (2001). Mechanisms of epileptogenesis and experimental models of seizures. In W. E., *The treatment of epilepsy, principles and practice*.

Lippincott ,Williams and Wilkins.

Parsons P. J., Fagan I., Spear N. E. (1973). Short-term retention of habituation in the rat: A developmental study infancy to old age. *Journ.of Compar. a Physiol. Psychology* 84(3), 545-553.

Piacsek, B. E., Statham, N. J., Goodspeed, M. P. (1978) Sexual maturation of male rats in continuous light. *Am. J. Physiol.* 234, 262-266.

Pitkänen A. (2010) Therapeutic approaches to epileptogenesis--hope on the horizon. *Epilepsia.* 51 Suppl 3, 2-17.

Pitkänen A., Kubová H. (2004) Antiepileptic drugs in neuroprotection. *Expert Opin Pharmacother.* 5,777-798.

Pitkänen A., Kharatishvili I., Karhunen H., Lukasiuk K., Immonen R., Nairismägi J., Gröhn O., Nissinen J. (2007) Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*; 48 Suppl 2:13-20.

Pitkänen A, Lukasiuk K. (2009) Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav.* Suppl 1, 16-25.

Pohl, (1992). V Kapitoly z moderní neurofyziologie a epileptologie, Libor Velíšek a kol., UK Praha.

- Procházka, T. (2010) Epilepsie u dospělých: klasifikace a léčba. *Psychiat. pro Praxi*, 11(4), 149–51.
- Prut L., Belzung C. (2003). The openfield as a paradigm to measure the effect of drugs on anxiety - like behaviors a review. *Europ.Journal of Pharmacol.*463, 3-33.
- Rakhade S.N., Jensen F.E. (2009). Epileptogenesis in the immature brain:emerging mechanisms. *Nat Rev Neurol* 5 , 380-391.
- Rektor I., Ošlejšková H. (2010). Stručná epileptologie pro praxi. *Neurologia pre praxi*, 11(3), 544.
- Rice D., Barone S. Jr. (2000). Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives*, 3(108), 511-533.
- Scantlebury M. H., Heida J. G., Hasson H. J., Velíšková J. , Velíšek L., Galanopoulou A.S., Moshé S.L (2007). Age-dependent consequences of status epilepticus: animal models. *Epilepsia*, 48 Suppl 2, 75-82.
- Servít Z. (1983). *Epilepsie*. Praha: Avicenum.

Shaywitz B. A., Gordon J. W., Klopper J. H., Zeltermann D. A., Irvine J. (1979). Ontogenesis of

Spontaneous Activity and Habituation of Activity in the Rat Pup. *Developmental*

*Psychobiology* 12(4), 359-367.

Spear L. P. (1990). Neurobehavioral Assessment during the early postnatal period.

*Neurotoxicology and toxicology*. 12, 489-495

Stafstrom C. E., (2002). Assessing the behavioral and cognitive effects of seizures on the

developing brain In Sutula T., Pitkänen A. Progress in brain research, do seizures damage the brain. Elsevier.

Sýkora P., (2008). Dá sa epilepsia vyliečiť? Kazuistika benígnej parciálnej epilepie

s centrotemporálnymi hrotmi. *Pediatr. Prax.* 3, 171 – 172.

Teitelbaum P, Schallert T, and Wishaw IQ (1983) Sources of spontaneity in motivated

behavior, In *Satinoff E. and Teitelbaum P., Handbook of Behavioral Neurobiology: 6 Motivation*, Plenum Press, New York, 23–61.

Valeš K., Kubík Š. (2010) *Behaviorální metody v neurovědách*. Fyziologický ústav AV ČR.

Vejsada R., Paleček J. (1992) V Kapitoly z moderní neurofyziologie a epileptologie, Libor

Velíšek a kol., UK Praha.

Velíšek, V. A kol. (1992) Kapitoly z moderní neurofyziologie a epileptologie, UK Praha.

- Walsh, R. N., Commins, R. A. (1976). The open field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83, 481-504.
- Wasterlain C.G., Gloss D.S., Niquet J., Wasterlain A.S. (2013) Epileptogenesis in the developing brain. *Handb Clin Neurol.* 111, 427-39.
- Westerga J., Gramsbergen A. (1990). The development of locomotion in the rat. *Developmental brain research*, 57 , 163-174.
- Wiedenmayer C. P., Magariños A. M. , McEwen B. S., Barr G.A. (2005) Age-specific threats induce CRF expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and hippocampus of young rats. *Horm Behav*, 47(2), 139-50.
- Zámečník J. (2007) Neuropatologie glioneuronálních lézí mozku spojených s farmakorezistentní epilepsií. *Čes.-slov. Patol.*, 43, No. 3, p. 79-85