

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Kateřina Matoušková

**Vliv fenytoinu na motorický vývoj
laboratorního potkana**

Bakalářská práce

Praha 2015

Autor práce: Kateřina Matoušková

Vedoucí práce: Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Oponent práce: RNDr. Karel Valeš, PhD

Datum obhajoby:

Bibliografický záznam

MATOUŠKOVÁ, Kateřina. Působení fenytoinu na motorický vývoj laboratorního potkana. Praha: Univerzita Karlova, 2. Lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství, 2015. 50 s., přílohy. Vedoucí bakalářské práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Abstrakt

Fenytoin je antiepileptikum s dobrým antikonvulzivním efektem, ale s prokázanými vedlejšími účinky na motoriku při dlouhodobém užívání. Přesto se pro dostupnost a nízkou cenu nadále používá. Cílem této práce je shromáždit a porovnat dostupné informace o jeho vlivu na motoriku a koordinaci při podání v perinatálním období. Práce je doplněna pilotní studií na 11 potkanech, kterým byl fenytoin podáván v odpovídajícím období (7. – 11. den po narození). Otestovány byly dvě skupiny s dávkou PHT 60 mg/kg a 30 mg/kg a jejich výsledky byly porovnávány s kontrolní skupinou. Pro posouzení motorických schopností jsme využili testování righting reflexu, bar holding test, zkoušku negativní geotaxe, test na laně, test chůze po pravidelném a nepravidelném žebříku a akcelerující rotarod. U bar holding testu, lana a testu na pravidelném a nepravidelném žebříku byly prokázány signifikantní rozdíly u potkanů s PHT 60 mg/kg. U zbylých testů byla patrná tendence k horším výsledkům skupiny s PHT 60 mg/kg. Výsledky naší studie potvrzují ovlivnění motoriky laboratorního potkana po podání fenytoinu. To se shoduje s výsledky dalších autorů a histologickými nálezy zobrazujícími poškození buněk mozečku.

Klíčová slova

fenytoin, laboratorní potkan, motorické testování, vývoj

Abstract

Phenytoin is antiepileptic drug with high anticonvulsant effect but also with proven side effects on motor activities associated with its long-term use. Despite that it is still used due to its availability and low price. The aim of this thesis is to gather and compare accessible information about side effects of phenytoin on motor skills and coordination after PHT treatment during perinatal period. The thesis includes a pilot study of 11 laboratory rats which received PHT treatment in the corresponding period (7. – 11. postnatal day). Two groups with dosage PHT 60 mg/kg and 30 mg/kg were tested and compared with a control group. The tests used for evaluation of motor activity were righting reflex, bar holding test, negative geotaxis reaction, rope test, regular and irregular horizontal ladder walking test and accelerating rotarod test. A significant difference occurred in rats with PHT 60 mg/kg during bar holding test, rope test and regular and irregular horizontal ladder walking test. The group with PHT 60 mg/kg tended to worse results during other tests as well. Our results confirm side effects of phenytoin on motor activity in laboratory rats. That corresponds also with other authors' results and histological findings of cerebellum cell damage.

Keywords

phenytoin, laboratory rat, motor skill testing, development

Prohlášení

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

V Praze 24. 4. 2015

Kateřina Matoušková

Poděkování

Ráda bych poděkovala Prof. MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za jeho trpělivost a cenné rady při vedení mé bakalářské práce a RNDr. Anně Mikulecké, PhD za konzultaci s praktickou částí. Dále děkuji své rodině a blízkým za velkou podporu.

OBSAH

ÚVOD	7
1 PŘEHLED POZNATKŮ	9
1.1 FENYTOIN.....	9
1.1.1 Chemická struktura látky	10
1.1.2 Terapeutická aplikace	11
1.1.3 Mechanismus účinku a farmakokinetika	11
1.1.4 Vedlejší účinky	11
1.1.5 Výsledky studií zabývajících se účinky fenytoinu.....	12
1.2 EPILEPSIE	17
1.2.1 Patogeneze	19
1.3 INHIBICE NERVOVÉHO PŘENOSU PŘI LÉČBĚ EPILEPSIE	20
1.3.1 AED působící na iontové kanály	20
1.3.2 AED působící na receptory	22
1.4 HLAVNÍ MEZNÍKY POSTNATÁLNÍHO VÝVOJE LABORATORNÍHO POTKANA A JEJICH KORELACE S VÝVOJEM ČLOVĚKA	24
1.4.1 0-12 dnů	25
1.4.2 15 dnů.....	26
1.4.3 18 - 21 dnů	26
1.4.4 25 dnů.....	27
2 CÍLE A HYPOTÉZY	28
3 METODIKA	29
3.1 ZVÍŘATA	29
3.2 APLIKACE FENYTOINU	29
3.3 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	30
3.4 BATERIE MOTORICKÝCH TESTŮ	30
3.4.1 Righting on a surface test.....	30
3.4.2 Bar holding test	31
3.4.3 Negative geotaxis test	31
3.4.4 Otočení a šplh po laně.....	31
3.4.5 Test chůze po vodorovném žebříku	32

3.4.6	Rotarod.....	33
4	VÝSLEDKY	34
4.1	RIGHTING ON A SURFACE TEST	34
4.2	BAR HOLDING TEST	34
4.3	NEGATIVE GEOTAXIS TEST	35
4.4	OTOČENÍ A ŠPLH PO LANĚ.....	36
4.5	TEST CHŮZE PO VODOROVNÉM ŽEBŘÍKU	37
4.6	ROTOROD	39
4.7	TESTOVÁNÍ HYPOTÉZ	40
5	DISKUSE	41
	ZÁVĚR.....	45
6	SOUHRN	46
	REFERENČNÍ SEZNAM.....	47
	SEZNAM PŘÍLOH.....	51
	PŘÍLOHY	52

Seznam zkratk

AED	antiepileptika
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-isoxazole-4-propionát
GABA	kyselina gama-aminomáselná
NMDA	N-methyl-D-aspartát
PHT	fenytoin

ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá působením fenytoinu na motorický vývoj. Fenytoin je jedno z nejdéle známých antiepileptik a k terapii se používá už od 30. let minulého století. Epilepsie je onemocnění záchvatové, a tím pro pacienty velmi limitující. Medikamentózní léčbou jsou řešitelné více než dvě třetiny epilepsií. Ale i v případě dobré odpovědi na terapii antiepileptiky, mohou nemocného sužovat důsledky vyvolané nežádoucími vedlejšími účinky podané látky.

Většina pacientů, dle některých autorů až 75 %, se se svou nemocí setká již v mládí. Antiepileptika podávána od útlého věku mají, kvůli ještě zrající nervové soustavě, významné vedlejší účinky. U fenytoinu, je takový efekt prokázán a směřuje především na Purkyňovy buňky a granulózní buňky mozečku, a tedy ovlivňuje motoriku a koordinaci.

Fenytoin je pro své dobré antikonvulzivní účinky používán i k léčbě epileptických záchvatů u novorozenců, ačkoliv jeho vedlejší účinky při takovém podání zatím nejsou dostatečně popsány. Tato práce zahrnuje výsledky měření odchylek v oblasti motoriky v průběhu vývoje u laboratorních potkanů., kterým byl podáván fenytoin v období odpovídajícím lidskému období perinatálnímu.

V dnešní době je fenytoin, coby antiepileptikum první generace, nahrazován novými přípravky. Ty mají zpravidla méně prokazatelných vedlejších účinků. Nicméně fenytoin je pro svou dostupnost a nízkou cenu nadále využíván na příklad v rozvojových státech, ale i u nás.

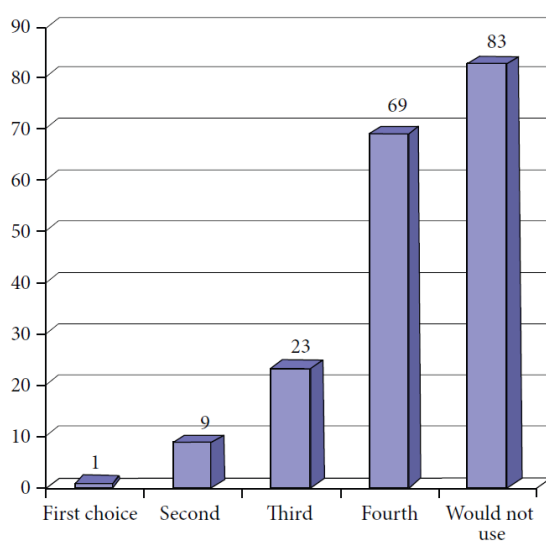
Působení fenytoinu je zdokumentované na lidech i zvířecím modelu, ale o jeho proměnlivosti v průběhu vývoje není mnoho informací. V této práci jsou zdokumentovaná dostupná data o této problematice, spolu s porovnáním s první sérií pokusů, která byla provedena na Fyziologickém ústavu Akademie věd České republiky v akademickém roce 2014/2015.

1 PŘEHLED POZNATKŮ

1.1 Fenytoin

Fenytoin (difenylyhydantoin, PHT) byl syntetizován týmem Heinricha Biltze v roce 1902, v roce 1938 H. Houston Merritt a Tracy Putnam prokázali jeho antikonvulzivní účinky (Karthikeyan, 2009). Jde o běžně užívané antiepileptikum (AED). Terapeutická dávka omezuje rozvoj záchvatu v plné míře a snižuje šíření aktivity epileptického ložiska v mozku (Tauer et al., 1998). U PHT bylo popsáno mnoho nežádoucích účinků, při dlouhodobém užívání může vést k mozečkové dysfunkci a degeneraci (Ohmori et al., 1997). Používá se především pro terapii komplexních parciálních a generalizovaných tonicko-klonických záchvatů (Rogawski a Löscher, 2004).

V posledních dvaceti letech je s nástupem nově vyvinutých antiepileptik fenytoin odsunut do pozadí. To podporují i výsledky studie vypracované v roce 2013, v rámci které bylo vyzpovídáno 200 neurologů a epileptologů o přístupu k terapii epilepsie. Pouze jeden respondent uvedl, že by předepsal PHT jako lék první volby pro nově diagnostikovanou epilepsii. 83% respondentů by PHT nepoužilo vůbec (obr. 1).



Obr. 1 – Pořadí volby fenytoinu jako medikace pro pacienty s nově diagnostikovanou epilepsií (Das et al., 2013)

Této studii se zúčastnili lékaři ze Severní a Jižní Ameriky, Evropy, Asie a Austrálie, s největším zastoupením odborníků z USA (obr. 2). Studií jsou zcela nepokryty africké státy (Das et al., 2013).

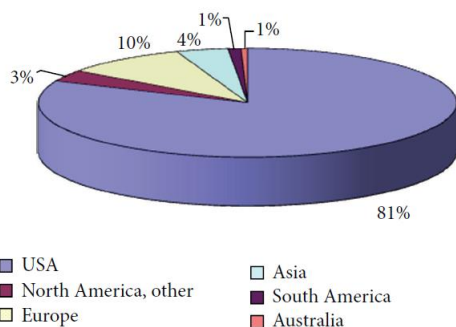
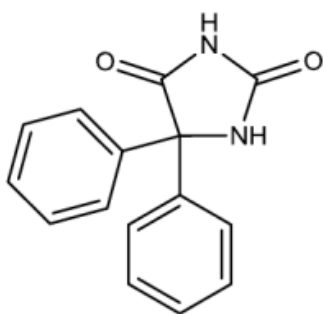


FIGURE 1: Geographical distribution of respondents (percentages).

Obr. 2 – Geografické rozložení respondentů (%) (Das et al.)

1.1.1 Chemická struktura látky

Fenytoin patří mezi monocyklická antiepileptika. Chemicky jde o poměrně slabou kyselinu ($pK_a = 8,3$), (Doležal et al., 2013). Vzorec fenytoinu je 5,5-diphenylimidazolidin-2,4-dion (obr. 3), patří tedy mezi deriváty hydantoinu a připravuje se reakcí benzofenonu s kyanidem draselným a uhlíčanem amonným (Hampl et al., 2002). Je to bílá mikrokrytalická látka nerozpustná ve vodě, ale lépe v organických rozpouštědlech (Melichar et al., 1987), a proto se podává buď v rozpouštědle, nebo ve formě soli.



Obr. 3 – Chemická struktura fenytoinu (Doležal et al., 2013)

1.1.2 Terapeutická aplikace

Podání léku je nejčastěji per os, ale je možné i intravenózní podání. Toho se využívá při terapii status epilepticus (*Lincová a Fargali, 2007*). Pro orální aplikaci je pro dospělého pacienta doporučena dávka 5-7 mg/kg/den ve dvou dílčích dávkách (maximální jednotlivá dávka pro dospělého je 300 mg) a pro děti 3-8 mg/kg/den ve dvou dílčích dávkách (*Suchopár et al., 2009*).

Dnes terapie epilepsie spočívá v podání monoterapie AED II. generace, případně kombinace AED II. a III. generace. Fenytoin spolu s dalšími antiepileptiky I. generace byl základem léčby dříve a novými medikamenty byl nahrazen pro své časté vedlejší účinky. I přes to ale za určitých okolností použit je (*Burešová, 2007*).

1.1.3 Mechanismus účinku a farmakokinetika

PHT působí na napětím řízené sodné kanály. Navázáním brzdí možnost vysokofrekvenčních změn polarity membrány a tím omezuje rozvinutí záchvatu. Kromě tohoto účinku fenytoin pravděpodobně působí i na Na^+/K^+ -ATPasu, Ca^{2+} -kalmodulin-dependentní enzymatický systém a kalciové kanály (*Lincová a Fargali, 2007*). Po orálním podání se fenytoin vstřebává mírně v žaludku, ale převážně v tenkém střevě (*Kirschbaum et al., 1999*). V plazmě je z 80 - 90% vázán na albuminy (*Lincová a Fargali, 2007*). Kirschbaum uvádí u dospělých pacientů vazbu na plasmatické proteiny 87 – 93%, ale u novorozenců, nebo jedinců s poškozením renálních funkcí méně (*Kirschbaum et al., 1999*). Navázáním na proteiny se prodlužuje účinek (*Lincová a Fargali, 2007*). Jeho zastoupení v séru je nejvyšší hodinu a půl až tři hodiny po podání (*Kirschbaum et al., 1999*).

1.1.4 Vedlejší účinky

Mezi příznaky intoxikace patří nystagmus, vertigo a ataxie, případně psychotické symptomy a růst frekvence záchvatů. Nežádoucí účinky se projevují

většinou při koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ nebo více. Objevuje se hyperplazie dásní, hirsutismus a také může dojít k poruše metabolismu kyseliny listové a její karenci, což může vést k megaloblastické anémii. Mezi nežádoucí účinky nezávislé na dávce patří vyrážka, krevní dyskrázie, hepatotoxicita, Dupuitrenova kontraktura a teratogenní působení (*Lincová a Fargali, 2007*). Při předávkování může působit mozečkové příznaky (*Seidl a Obenberger, 2004*).

Fenytoin prochází placentou difuzí. Prenatální vystavení působení fenytoinu může vést k fetálnímu hydantoinovému syndromu, u kterého lze pozorovat změny chování, vývojové a strukturální změny (*Nanda et al., 1989*). Tyto účinky jsou vyvolané pravděpodobně ischemickými změnami tkáně způsobenými hypoxií plodu (*Danielsson et al., 1997*). Podrobněji bude vliv fenytoinu na motoriku a kognitivní funkce rozebrán v následující části.

1.1.5 Výsledky studií zabývajících se účinky fenytoinu

Fenytoin patří mezi nejdéle užívaná antiepileptika. Množí se ale doklady o jeho nežádoucích účincích. V této kapitole bych ráda shrnula různé pohledy na tuto problematiku.

Neurotoxicita fenytoinu je způsobena volnými radikály, jejichž vznik podporuje. Ty působí oxidační stres, který vede k poškození buněk a jejich dysfunkci (*Liu et al., 1997*). Malow a kolektiv popisují strukturální změny mozečkové tkáně charakterizované abnormálním zvětšením dendritů Purkyňových buněk (*Mallow et al., 1980*).

De Marco a kol. ve své studii potvrdili spojitost mezi cerebellární atrofii a dlouhodobým užíváním fenytoinu. Atrofii mozečku pozorovali u 20 pacientů z celkových 56. Z těchto 20 probandů, zaznamenali mírné změny u 45%, středně velké také u 45% a u 10% došlo k závažné atrofii (*De Marco et al., 2003*).

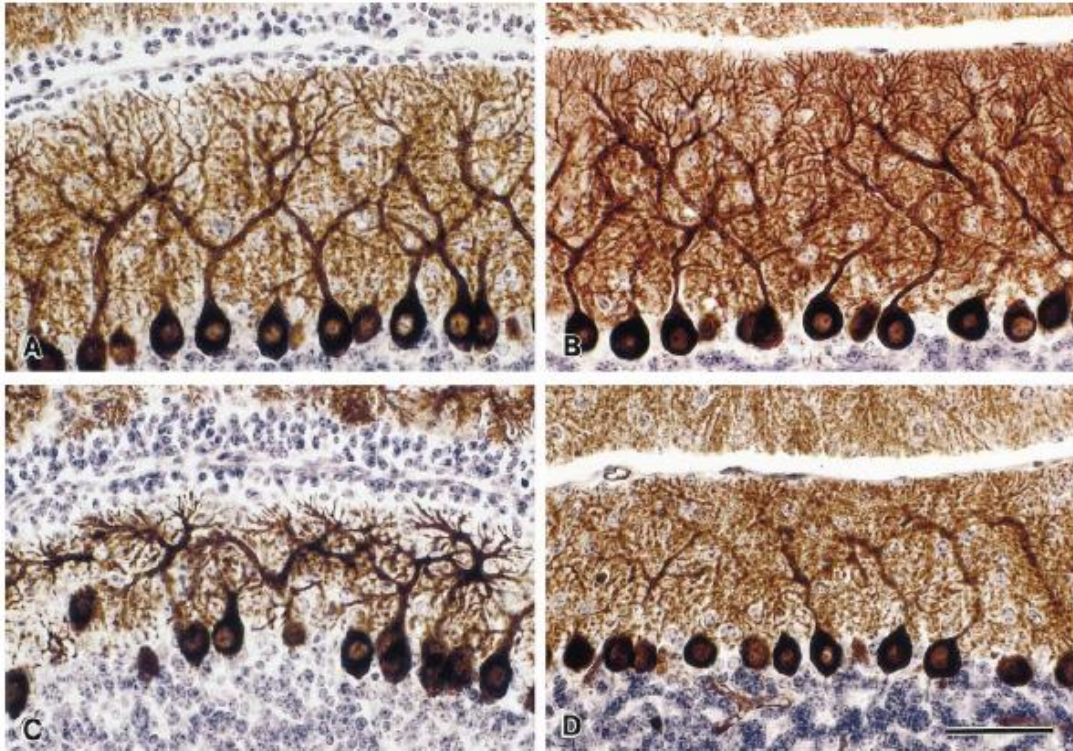
Pro výzkum vlivu PHT na apoptózu, proliferaci a migraci granulárních buněk a rozvoj Purkyňových buněk ve vyvíjejícím se mozečku se používají zvířecí modely. Novorozeným myším byl 2. – 4. den po narození podán orálně PHT ve formě olejové

suspenze v dávce 10 mg/kg. 56. den byla zvířata usmrcena, mozek byl odebrán a zvážen, následně byla provedena histologie. Hmotnost celého mozku i hmotnost pouze mozečku byla signifikantně snížena oproti kontrolní skupině. Dendrity Purkyňových buněk byly chabě vyvinuté a jejich konfigurace byla nezřetelná (*Ohmori et al., 1999*).

Účinky fenytoinu na motoriku jsou popisovány na modelech s laboratorními zvířaty, nejčastěji na myších či potkanech. U myši je mozek hned po narození ve stupni vývoje korespondujícím s vývojem člověka v posledním trimestru těhotenství (*Dobing a Sands, 1973*). Podání fenytoinu v tomto období (2. - 5. den po narození) vede k opoždění righting reflexu a pohybů hlavy během 5. – 9. dne po narození (*Hatta et al., 1999*) a zhoršení výsledků na rotorodu a snížení aktivity v open field testu oproti neovlivněným jedincům (*Ohmori et al., 1999*). Opoždění se projevuje 5. den také v pivotování (*Hatta et al., 1999*).

Při pozdějším podání fenytoinu (5. – 14. den po narození) jsou popisovány změny chování a horší motorická koordinace (*Bath et al., 2013*).

Ogura a kol. sledovali u myši (kmen C57BL) starých dva měsíce vliv fenytoinu na chování, motorické schopnosti a prostorové učení. Pro studii bylo použito 35 vrhů, každý o čtyřech až sedmi mláďatech. Své poznatky podpořili histologickými nálezy (*Obr. 4*). Zvířatům byl fenytoin podáván orálně 5. až 14. den po narození ve formě suspenze (35 mg/kg PHT). Vyšetřována byla spontánní motorická aktivita v boxu z plexiskla o rozměrech 30 x 20 x 13 cm, byla indexována přerušovanými záblesky infračervených paprsků. Myši s dávkou fenytoinu měly tendenci k menší aktivitě, ale nebyl prokázán signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině (*Ogura et al., 2002*). Pro přesnější detekci motorického poškození byl použit test na akcelerujícím rotarodu (0 – 20 otáček za minutu). Mezi testovanými skupinami nebyl prokázán signifikantní rozdíl. Z těchto výsledků usuzují, že použitá dávka fenytoinu při postnatálním podání nemá na myším modelu prokazatelný vliv na zhoršení motoriky (*Ogura et al., 2002*).



Obr. 4 – Histologický preparát zobrazující vermis cerebelli myši 14. a 21. den po narození

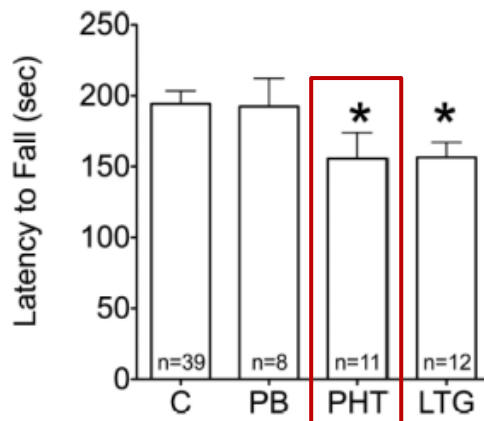
Komentář: A – kontrolní skupina 14. den po narození, B – kontrolní skupina 21. den po narození, C – PHT-skupina 14. den po narození, D - PHT-skupina 21. den po narození; u skupin s PHT je patrná výrazná nezralost těl a dendritů Purkyňových buněk; měřítko: A-D = 50 μ m (Ogura *et al.*, 2002)

U dospělých potkanů (kmen Sprague-Dawley), kterým byl PHT podáván 7., 8., 9., 11., 12. a 13. den po narození, byly zkoumány změny tělesné hmotnosti, motorické a lokomoční schopnosti. Pro studii bylo použito celkem 161 mlád'at, kterým bylo podáno 50 mg/kg PHT ve formě soli intraperitoneálně v šesti dávkách. Před začátkem podávání PHT byla tělesná hmotnost všech mlád'at shodná, nicméně 13. den byla hmotnost u jedinců léčených PHT signifikantně nižší než u kontrolní skupiny (tabulka 1). Ovlivněna byla také rychlost přibývání na hmotnosti (tab. 1).

	7. den	13. den	váhový příbytek od 7. do 13. dne
Kontrola	14,2 \pm 0,36 (2,7)	25,7 \pm 0,48 (3,6)	11,7 \pm 0,49 (3,7)
PHT	15,0 \pm 0,40 (2,5)	23,4 \pm 0,64 (3,6)*	8,5 \pm 0,70 (3,8)*
* Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině \pm Směrodatná odchylka			

Tab. 1 – Hmotnost těla a mozku dospělých potkanů po podání AED 7., 8., 9., 11., 12. a 13. den po narození (Forcelli *et al.*, 2012, a)

Motorická koordinace byla testována na zrychlujícím rotarodu, kde u zvířat s PHT byla latence pádu oproti kontrolní skupině signifikantně kratší (obr. 5).



Obr. 5 – Latence pádu na akcelerujícím rotarodu u dospělých potkanů po podání AED 7., 8., 9., 11., 12. a 13. den po narození. Na ose X jsou znázorněna AED, osa Y vyjadřuje latenci pádu (s). Statisticky významný rozdíl je označen hvězdičkou C = kontrolní skupina, PB = fenobarbital, PHT = fenytoin, LTG = lamotrigin (Forcelli et al., 2012, a)

Lokomoce byla hodnocena testem open field. Dosažená vzdálenost, kterou urazili jedinci během testování, se signifikantně nelišila u skupiny s PHT a kontrolní skupiny. Oproti kontrolám se ale potkani s dávkou fenytoinu nedrželi u stěn a strávili větší časový úsek v centrální části pole (tab. 2), (Forcelli et al., 2012, a).

	Uražená vzdálenost (m)	Čas v centru (%)	Latence vstupu do centra pole (s)
Kontrola	16,4 ± 0,6	11,95 ± 1,2	25,1 ± 5,8
PHT	18,54 ± 0,9	20,92 ± 3,6*	15,3 ± 6,9
* Signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině ± Směrodatná odchylka			

Tab. 2 – Pohyb v otevřeném poli dospělých potkanů po podání AED 7., 8., 9., 11., 12. a 13. den po narození (Forcelli et al., 2012, a)

Popisovány jsou i účinky antiepileptik na aktivitu nervových buněk striata. U potkanů vystavených účinkům PHT je vidět signifikantně nižší frekvence IPSC (inhibiční postsynaptické proudy) oproti kontrolní skupině a nedostatečné zotavení na synapsích GABAergních neuronů (*Forcelli et al., 2012, b*).

Vliv fenytoinu na motivaci zvířat byl zdokumentován testem nuceného plavání u myši. Test spočívá v umístění myši do válce naplněného vodou, hodnocena je doba, po který myš plave během desetiminutového časového limitu. Myšim bylo podáváno perorálně 35 mg/kg PHT ve formě suspenze 5. – 14. den po narození. Doba plavání jedinců ve skupině, které byl podán PHT, byla nižší, ale mezi ní a kontrolní skupinou nebyl prokázán signifikantní rozdíl (*Ogura et al., 2002*).

Glauser popisuje u dětí od 5 do 18 let věku, které podstoupily monoterapii PHT somnolenci (29,8%), apatii (10,6%) a nervozitu (11,7%). Na rozdíl od jiných antiepileptik (phenobarbital) nehovoří o spojitosti užívání PHT se vznikem psychóz nebo depresí (*Glauser et al., 2004*).

Studie týmu doktora Meadora se zabývá působením fenytoinu na kognitivní funkce u lidí. Vychází z ní negativní vliv fenytoinu na rychlost zpracování informací a reakcí na ně a abnormální výsledek vlny P300 (odchylky v řádu msec), která ukazuje rychlost kognitivního zpracování nezávislého na motorické odpovědi. Popsány jsou změny v oblasti paměti, především v prodlevě při vybavování faktů, a zhoršení koncentrace (*Meador et al., 1995*). Shannon a Love zkoumali vliv PHT na paměť, pozornost a učení po akutním podání (30 minut před testováním). Z jejich práce nevychází prokazatelný vliv PHT na prostorovou orientaci (*Shannon a Love, 2004*) a sníženou pozornost a schopnost koncentrace (*Shannon a Love, 2005*), ale popisují snížení schopností učení (*Shannon a Love, 2007*).

U myši byly prokázány odchylky v oblasti prostorového učení (pro experiment bylo použito 35 vrhů o 4 – 7 mladých, dávka PHT 35 mg/kg, aplikace orálně 5. – 14. den po narození). Test Morrisova vodního bludiště (test používaný pro studium schopností prostorové orientace) s použitím viditelné plošiny se obě skupiny byly

schopny naučit bez rozdílu a plošinu potkani dosahovali do 5 s. Signifikantní rozdíl byl prokázán po odstranění plošiny. Skupina s dávkou fenytoinu byla schopná lokalizovat místo, kde by se měla plošina nacházet, za delší čas než skupina kontrolní. Rozdíl byl ještě výraznější při opakování testu (*Ogura et al., 2002*).

Test Morrisova vodního bludiště byl proveden i na potkanech v rámci studie zmíněné výše (Forcelli a kol., a). Pro experiment bylo využito 161 mlád'at, kterým byl v 6 dávkách (7., 8., 9., 11., 12., 13. den po narození) aplikován intraperitoneálně PHT v dávce 50 mg/kg. Nejprve proběhl pětidenní trénink po čtyřech pokusech se skrytou plošinou. Šestý den potom následoval zkušební pokus, v rámci kterého byla plošina odebrána a zvířata byla vypuštěna ze zatím nepoužité startovní pozice. Tento test má za cíl zjistit případné tvoření a použití kognitivních map. Jedinci s PHT neměli během testování signifikantně změněné výsledky oproti kontrolní skupině. Po odstranění plošiny šestý den, ale byla prokázána signifikantní preference pro cílový kvadrant, což naznačuje nepoškozenou orientaci v prostoru a paměť (*Forcelli et al., 2012, a*).

1.2 Epilepsie

Epilepsie je chronické neurologické onemocnění, které pacienta výrazně limituje v řadě aspektů života. Zmínky o této nemoci pocházejí už ze starověku. Jistou formou epilepsie pravděpodobně trpěl na příklad Julius César nebo Sokrates. V průběhu let si vysloužila mnoho názvů od „svaté nemoci“ po „nemoc ohavnou“ a také řadu více či méně kuriózních terapeutických přístupů. Racionální léčba epilepsie se rozvinula až převážně v minulém století (*Moráň, 2007*). Chorobu typicky charakterizují opakované epizodické změny činnosti mozku, při kterých se nervové vzruchy šíří nervovým systémem bez regulace, kterou zajišťují inhibiční procesy. Navenek se projevují jako vůlí neovladatelné záchvaty s různou manifestací často doprovázené poruchou vědomí. Záchvat se ale může být i subklinický.

Opakovanými záchvaty trpí jen 0,5% populace, ale jistou formu za život prodělá asi 5% (*Seidl a Obenberger, 2015*). Epileptická aktivita může být lokální, potom

mluvíme o parciálních záchvatech. Ty začínají stereotypně v části jedné hemisféry, nejčastěji v mozkové kůře. Dle průběhu rozlišujeme záchvaty jednoduché a komplexní, které doprovází porucha vědomí. Záchvat primárně generalizovaný začíná oboustranně. Pokud lokální záchvat přejde do generalizovaného, je označen za sekundárně generalizovaný (*Seidl a Obenberger, 2015*). Mezi záchvaty generalizované patří například grand mal. Pokud trvá záchvat déle než 20 minut, nebo mezi jednotlivými záchvaty nedojde k obnovení normálních funkcí mozku, hovoříme o stavu zvanému status epilepticus.

Antiepileptika jsou látky s antikonvulzivním účinkem, které nejčastěji regulují šíření záchvatu pomocí ovlivnění membrány nervových buněk nebo ovlivněním účinků příslušných neurotransmiterů na synapsích.

Od roku 1857 se pro terapii epilepsie používaly bromidy, jsou tedy prvním medikamentem užívaným pro léčbu epilepsie. Na počátku 20. století s objevením fenobarbitalu nastupuje první generace AED. Mezi ně řadíme zmíněný fenobarbital, fenytoin, primidon a etosuximid. Nevýhodou těchto látek je poměrně vysoká míra nežádoucích účinků (*Burešová, 2007*). Dle Seidla je teratogenita fenytoinu při užívání v průběhu gravidity pro plod až 6% (*Seidl a Obenberger, 2015*). Antiepileptika druhé generace se začala dostávat do širšího používání v 60. letech minulého století, kdy byly objeveny účinky karbamazepinu. Kromě něj sem spadá i valproát. V 90. letech došlo k uvedení tzv. nových antiepileptik neboli antiepileptik třetí generace. Do této skupiny lze zařadit vigabatrin, lamotrigin, topiramát, gabapentin, tiagabin, felbamat, levetiracetam a pregabalín (*Burešová, 2007*). Typy epilepsie a používaná antiepileptika jsou uvedeny v tabulce 3 (*Hynie, 1995*).

<i>Typ a podtyp epilepsie</i>	<i>Běžná AED</i>	<i>Novodobá AED</i>
I. Parciální záchvaty se symptomatologií		
A. jednoduchou	KB, VA, FN, FB	GA, VB, LA, TI, TO
B. komplexní		
C. přecházející v generalizované záchvaty		
II. Generalizované záchvaty		
A. typ absence	VA, ES, (CL)	LA
B. myoklonický	VA, CL	LA, OX
C. typ tonicko-klonický	KB, VA, FN, PR, FB	LA
III. Neklasifikovatelné záchvaty	KB, VA, (FN, FB, CL)	FE, LA, VB
IV. Status epilepticus	DI, CL, FN, FB	

Tab. 3 – Typy epilepsie a používaná AED; CL – klonazepam, DI-diazepam, ES – etosuximid, FB – fenobarbital, FE – felbamat, FN – fenytoin, GA – gabapentin, KB – karbamazepin, LA – lamotrigin, OX – oxkarbazepin, PR – primidon, TI – tiagabin, TO – topimarát, VA – valproát, VB – vigabatrin (*Burešová, 2007*)

1.2.1 Patogeneze

Epileptický záchvat je nekontrolovaný abnormální a synchronní výboj skupiny gangliových buněk v mozku. Epileptickou aktivitu způsobují poškozené neurony s redukcí axosomatických inhibičních synapsí. Mnohdy se tvoří také sekundární a terciární ložisko, tj. v odpovídajícím umístění v druhé hemisféře a v oblasti s vysokou epileptickou pohotovostí, amygdale a hipokampu (*Seidl a Obenberger, 2015*). Mezi záchvaty mozek funguje podle všeho normálně (*Silva et al., 2003*). K poruchám vědomí dochází drážděním ascendentního aktivačního systému retikulární formace a talamu, kam mohou výboje propagovat (*Seidl a Obenberger, 2015*). Princip, kterým se paroxysmální aktivita v mozku šíří, je velmi složitý. *Silva et al.* analyzovali základní modely drah epileptických záchvatů a určili, za jakých podmínek k šíření dochází (*Silva et al., 2003*). Lokalizace a cesta šíření určuje charakter a vzhled záchvatu (*Burešová, 2007*).

1.3 Inhibice nervového přenosu při léčbě epilepsie

Medikamentózní léčba epilepsie nebývá nasazena hned po prvním záchvatu. Terapie je především směřována na úpravu životosprávy a nastavení režimových opatření. Je zahájena, objeví-li se záchvaty další, především pokud nastanou bez zjevné příčiny. Antiepileptika neléčí epilepsii jako takovou, ale zabraňují vzniku, rozvoji a šíření epileptické aktivity (Burešová, 2007). AED jsou primárně určeny pro léčbu epileptických záchvatů (Rogawski a Löscher, 2004). Používají se ale také pro léčbu jiných neurologických, ale i psychiatrických onemocnění. Pro terapii bipolární poruchy je užíván karbamazepin, lamotrigin a valproát. Valproát se používá i pro léčbu migrény, stejně jako gabapentin a topiramát. Lze ovlivnit i neuropatické bolesti pomocí karbamazepinu, gabapentinu, lamotriginu, levetiracetamu, oxkarbazepinu, pregabalínu a valproátu (Landmark, 2007). Pomocí AED je dnes možné poskytnout většině pacientů s epilepsií uspokojivou kontrolu nad jejich nemocí. Vzruchy patologicky šířící se během záchvatu jsou inhibovány, aniž by byla omezena normální nervová aktivita mozku (Rogawski a Löscher, 2004). Podle zacílení účinku AED je dělíme na několik skupin.

1.3.1 AED působící na iontové kanály

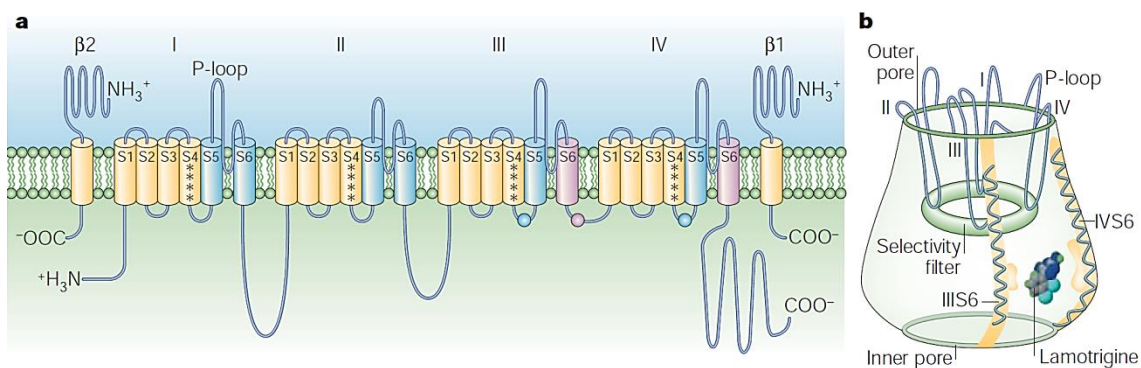
1.3.1.1 Napětím řízené sodíkové kanály

Napětím řízené sodíkové kanály jsou klíčové pro tvorbu akčních potenciálů při normální mozkové činnosti, ale i během záchvatu (Köhling, 2002). Modulace otevírání sodíkových kanálů v mozku je využívána pro terapii generalizovaných parciálních záchvatů, zejména tonicko-klonických křečí. K těmto antiepileptikům je řazen fenytoin, lamotrigin, karbamazepin, oxkarbazepin a zonisamid (Rogawski a Löscher, 2004).

Napětím řízené sodíkové kanály jsou tvořeny transmembránovými proteiny, které iniciují akční potenciály (Hille, 2001). Tyto kanály se skládají z podjednotek α a β . α podjednotku tvoří čtyři klenuté homologní části, které formují centrální pór kanálu. β podjednotka reguluje kanál zvyšováním nervové excitability (Lason et al.,

2013). Když je neuron depolarizován k prahu akčního potenciálu, protein sodíkového kanálu změní v řádu stovek mikrosekund svou konfiguraci. Tím kanál otevře a dovolí průchod sodných iontů. Sodíkové kanály v mozku přecházejí mezi jednotlivými stavy velmi rychle a tím umožňují nejenom normální funkce mozku, ale i šíření epileptické aktivity (Hille, 2001; Rogawski a Löscher, 2004).

Většina tradičně používaných antiepileptik působících na sodíkové kanály (fenytoin, karbamazepin, lamotrigin, topiramát, oxcarbazepin, zonisamid) je účinná převážně na rychlou inaktivaci kanálu a produkuje přechodné napětím a frekvencí dependentní snížení vodivosti kanálu (obr. 6). Proces pomalé inaktivace ovlivňuje lacosamid (Lasoń et al., 2013).



Obr. 6 – AED a napětím řízené sodné kanály

Komentář:

a – primární struktura podjednotek napětím řízených sodíkových kanálů. Hlavní α -podjednotka se opakuje 4x (I-IV) a je lemovaná dvěma pomocnými β -podjednotkami. Válce představují pravděpodobné α -spirálovité transmembránové segmenty. Modré válce (S5, S6) utvářejí pór. Hvězdičky na válci S4 označují napětím řízený senzor. Růžové kolečko určuje inaktivační částice v inaktivovaném vchodu, modrá kolečka označují místa implikovaná ve formování receptoru pro inaktivaci vchodu; IIS6 a IVS6 (růžové segmenty) jsou místa navázání léčiv, včetně AED blokujících napětím řízené sodíkové kanály

b - Systematické ztvárnění póru napětím řízeného sodíkového kanálu. S5 a S6 – transmembránové α -spirálovité segmenty se homologně opakují (I-IV) a tvoří stěny póru. Zevní ústí póru a filtry intové selektivity tvoří P-smyčky. Klíčovými segmenty jsou S6 III a IV, které obsahují vazebná místa pro AED (zvýrazněno žlutou barvou).

Přejato a se svolením pozměněno z REF.35 © (2001) American Society for Biochemistry and Molecular Biology. (Rogawski a Löscher, 2004)

Pro objasnění mechanismu inaktivace sodných kanálů můžeme říct, že fenytoin tuto inaktivaci podněcuje. Proces rychlé inaktivace vede k uzavření intracelulárního ústí kanálu krátkou smyčkou aminokyselinového rezidua mezi doménami α podjednotky sodíkového kanálu, slouží jako sklopné víčko. V dalším průběhu, během pomalé inaktivace, dochází k prolongovaným depolarizacím, které mohou nastat spolu s epileptiformní aktivitou (Rogawski a Löscher, 2004).

1.3.1.2 Napětím řízené kalciové kanály

Napětím řízené kalciové kanály se svým mechanismem i molekulární strukturou blíží kanálům sodným (Lasoň et al., 2013). Můžeme je rozdělit na kanály aktivované nízkým a vysokým napětím. Blokátory kanálů aktivovaných nízkým napětím jsou etosuximid a zonisamid. Mezi blokátory kanálů aktivovaných vysokým napětím patří gabapentin a levetiracetam (Lasoň et al., 2013).

1.3.2 AED působící na receptory

1.3.2.1 GABA receptory

Podstatným principem fungování některých antiepileptik je zesílení inhibičních vlivů na přenos nervových vzruchů zprostředkovaný neurotransmiterem kyselinou gama-aminomáselnou (Rogawski a Löscher, 2004). GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem v mozku savců (Lasoň et al., 2013). Neurony využívající GABA receptory se vyskytují např. v neokortexu, hipokampu a amygdale (Landmark, 2007), jde o klíčové oblasti epileptické aktivity, a proto stojí za pozornost i když GABA neurony zde nejsou zastoupeny ve vysokém počtu (Rogawski a Löscher, 2004). GABA působí přes ionotropní receptory GABA_A a metabotropní receptory GABA_B (Lasoň et al., 2013). Farmakologicky významným receptorem, na který se váže tato kyselina, je GABA_A receptor (Landmark, 2007). Podání blokátorů GABA_A receptorů vede k útlumu činnosti inhibičních mechanismů na synapsi, které zprostředkovávají

GABA_A receptory a může vést ke vzniku záchvatu (Rogawski a Löscher, 2004). Tento pentamerní komplex tvoří pět podjednotek – dvě podjednotky α , dvě β a jedna podjednotka γ , nebo δ (Lasoň et al., 2013). Na GABA_A receptor cílí benzodiazepin, fenobarbital, gabapentin nebo topiramát (Landmark, 2007). Gabapentin podporuje syntézu kyseliny gama-aminomáselné (Rogawski a Löscher, 2004). Vigabatrin inhibuje katabolický enzym GABA transaminázu a tím zvyšuje množství GABA na presynaptickém neuronu, tedy posiluje její inhibiční vliv (Landmark, 2007). Aktivace GABA_A receptoru v mozku generuje rychlé inhibiční postsynaptické potenciály, díky kterým je možno regulovat a předcházet epileptickou aktivitu (Lasoň et al., 2013).

Tiagabin funguje na principu blokády zpětné resorpce GABA na presynaptickém nervovém zakončení a glii (Landmark, 2007).

Širokospektré antiepileptikum valproát zvyšuje syntézu GABA kyseliny a snižuje činnost enzymů podílejících se na katabolismu GABA. Jsou popisovány jeho účinky na napětím řízené sodíkové a vápenaté kanály (Rogawski a Löscher, 2004). Dle Landmarka jsou ale již považovány za klinicky nevýznamné (Landmark, 2007).

1.3.2.2 Glutamátové receptory

Kyselina glutamová je nejvýznamnější excitační neurotransmitter na bázi aminokyseliny v centrální nervové soustavě. Aktivuje ionotropní receptory NMDA a AMPA (ty jsou pojmenovány podle svých agonistů – kyseliny N-methyl-D-aspartátové a kyseliny α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolopropionické), kainátový receptor a metabotropní glutamátové receptory spojené s G-proteinem (regulační protein schopný vázat guanosinové nukleotidy), (Lasoň et al., 2013). Zablokováním podtypů glutamátových kanálů, NMDA a AMPA receptorů, dochází ke snížení záchvatové aktivity in vitro i in vivo (Dingledine et al., 1999). S epileptickými záchvaty souvisí pokles pH mozkové tkáně, který by měl vést k protonové inhibici aktivity NMDA receptoru (Lasoň et al., 2013). AMPA receptory jsou zodpovědné za tvorbu rychlých excitačních postsynaptických potenciálů (Lasoň et al., 2013).

Antagonisté AMPA a kainátového receptoru (fenobarbital, valproát, topiramát) vykazují antikonvulzivní efekt. Jejich nepříznivé účinky na paměť a motorickou koordinaci jedince při experimentech na laboratorních zvířatech, jsou méně významné, než ty vyvolané působením na NMDA receptory (*Lason et al., 2013*).

Do skupiny antiepileptik působících na glutamátový receptor řadíme na příklad levetiracetam. Působí přímou inhibicí exocytózy neurotransmiteru, glutamátu (*Landmark, 2007*).

1.4 Hlavní mezníky postnatálního vývoje laboratorního potkana a jejich korelace s vývojem člověka

Pohyb je funkcí nervové soustavy a vyvíjí se podle geneticky zakódovaného programu. Postupně dochází k rozvoji motorických funkcí a reflexů (*Vojta, 1995*).

Porovnání vývoje potkana s vývojem člověka je komplikované, protože potkan se rodí s dobře vyvinutými motorickými funkcemi, za kterými ale zaostávají funkce senzorické. Přesto je možné určit společné prvky.

U mláďat potkanů, stejně jako u lidí, dochází k dozrávání centrální nervové soustavy až po narození. Do stadia zralosti centrální nervové soustavy srovnatelného s novorozencem dospívá kolem desátého dne života (*Nejedlý, 1965*). Potkani se rodí s očima zalepenýma, otevírají je až kolem čtrnáctého dne (*Altman a Sudarhan 1975*). I přes to se mezi desátým a dvanáctým dnem objevuje první reakce na světelný podnět (*Velíšek et al., 1992*), podobnou korovou odpověď můžeme pozorovat i u novorozeného dítěte.

Nejvíce změn probíhá během prvních dvou týdnů, kdy dochází ke zrání senzorické a motorické kůry a k myelinizaci nervových vláken (*Westerga a Gramsbergen, 1990*). U člověka také dochází po narození k diferenciaci nervové soustavy apoptózou nervových buněk, u potkana k velkému rozdílu mezi počtem nervových buněk před a po narození nedochází.

Mozeček dozrává jako poslední u potkanů i u lidí. U potkanů k tomu dochází mezi 10. a 21. dnem, kdy dozrávají granulární buňky (*Westerga a Gramsbergen, 1990*), oproti přibližně šesti letům u člověka. Důsledky lézí mozečku ale můžeme pozorovat už před 15. dnem (*Gramsbergen, 1982*).

Motorické projevy jsou posuzovány podle spontánních pohybů a vývoji posturální reaktivity. Vývoj směřuje ke kvadrupedální chůzi, která je pro potkana je dominantním způsobem lokomoce. Vzpřimování začíná od hlavy a postupuje kranio-kaudálně (*Altman a Sudarshan, 1975*).

Období mezi 21. a 25. dnem můžeme převést na mladší školní věk, tedy přibližně 6. - 12. rok ve vývoji člověka (*Alavardashvili et al., 2005*). Pohlavní zrání samců potom probíhá mezi 35. a 50. dnem života, u samic dříve. Dospělosti potkan dosahuje v 60. den (*Nejedlý, 1965*).

Posturální vývoj závisí na vývoji svalové soustavy a kontrole nervového systému. Pro stabilní vzpřímení je podstatné posturální trupové svalstvo a svalstvo končetin. Fázičká aktivace musculus soleus začíná 12. den a tonizace srovnatelné s dospělým jedincem dosahuje 21. den po narození (*Geisler et al., 1993*).

1.4.1 0-12 dnů

Altman a Sudarshan pozorovali přirozenou aktivitu zvířat po dobu tří minut. Již od prvního dne můžeme pozorovat elevaci ramenních pletenců a na konci prvního týdne života je již udrží nad podložkou polovinu sledované doby. Během prvního týdne probíhají spontánní pohyby končetinami, laterální pohyby hlavou po podložce (*Altman a Sudarshan, 1975*).

Druhý den se u 50 % jedinců objevuje elevace hlavy na pár sekund, pátý den už u všech. Laterální a vertikální pohyby hlavou jsou přítomny také při plazení a pivotování (*Geisler et al., 1993*). Na rozdíl od uvedených autorů, Clarac popisuje nedokonalé plazení od druhého dne (*Clarac et al., 1998*).

Elevaci hlavy po celou dobu sledování (3 minuty) Altman a Sudarshan pozorovali až u třítýdenních mláďat (*Altman a Sudarshan, 1975*).

Mezi desátým a dvanáctým dnem dozrává opora o horní končetiny. Dvanáctý den je mládě schopno zvednout jednu končetinu nad podložku, aniž by ztratilo rovnováhu, což umožňuje chůzi po čtyřech. Do tohoto období řadíme tedy počátek kvadrupedální lokomoce (*Altman a Sudarshan, 1975*). Chůze je ale nejistá, není ještě vyvinuta dokonalá stabilizace trupu a končetin (*Geisler et al., 1993*).

1.4.2 15 dnů

Kolem patnáctého dne života mláďata otevírají oči a se získanou zrakovou kontrolou se usnadňuje i lokomoce (*Altman a Sudarshan, 1975*). Chůze se výrazně mění. Zadní končetiny zůstávají v addukci a ve stejné fázi se neuchylují do zevní rotace. Ramena a pánev jsou ve stejné úrovni, trup i končetiny jsou zastabilizovány i při pohybu (*Geisler et al., 1993*). Pohyby hlavou, které byly patrné pouze při stoji, jsou přítomny i při lokomoci (*Gramsbergen, 1998*). Začátkem třetího týdne života se objevuje vyzrálá reakce na otočení do supinační pozice, dojde k rychlému návratu do pozice pronační (*Altman a Sudarshan, 1975*). Od 13. dne se objevuje vztyčování a 15. dne je již srovnatelné s projevem dospělého jedince (*Geisler et al., 1993*), došlo tedy k funkčnímu dozrání zadních končetin. Neobjevuje se ale v takové frekvenci jako u dospělého (*Altman a Sudarshan 1975*).

1.4.3 18 - 21 dnů

Při elektromyografickém sledování činnosti svalstva dolní končetiny se 16. až 17. den také projevila aktivace kontralaterálních zádových svalů (sledováno u *musculus longissimus*, *musculus gastrocnemius*), ale 18. den převládá aktivita svalů ipsilaterálních (*Gramsbergen, 1998*).

Od 20. dne začíná velmi aktivní období, kdy mláďata rozvíjí své schopnosti převážně hrou mezi sebou. Chůze přechází v běh. Koordinace pohybu a reakce jsou na

tak vysoké úrovni, že přestává být možné provést test otočení na záda, jak je uvedeno výše. I při testování geotaktických reakcí většina místo cílené reakce utíká z plošiny (Altman a Sudarshan, 1975). Vývoj aktivity musculus longissimus 21. dne v průběhu lokomoce podle elektromyografického záznamu odpovídá dospělému jedinci (Gramsbergen, 1998).

Všichni jedinci by měli být schopni udržet se po zavěšení na hrazdu za přední končetiny (Altman a Sudarshan 1975).

1.4.4 25 dnů

V tomto období vrcholí hravé období a velmi časté je zápasení mezi sourozenci. Motorické schopnosti mláďete jsou srovnatelné s dospělým jedincem. Potkan je schopen přizpůsobení při pohybu po různém povrchu. Zdokonalují se také komplexní motorické vzory, jako je skákání (Altman, Sudarshan, 1975).

2 CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem této bakalářské práce bylo shromáždění dostupných dat o nežádoucích účincích fenytoinu na motorické schopnosti a následně jejich porovnání s výsledky motorických testů a determinace případných odchylek v průběhu vývoje potkana. K účelu práce proběhla první série pokusů na jedenácti zvířatech. Ve skupině byli zastoupeni jedinci s dvěma různými dávkami fenytoinu, obojí po čtyřech zvířatech, a kontrolní skupina. Měření proběhlo v různých vývojových stádiích potkana a motorické testy byly přizpůsobeny schopnostem odpovídajícím danému stupni vývoje.

Hypotéza 1

- H_0 Motorika potkanů není po opakovaném podání PHT signifikantně změněna.
- H_A Motorika potkanů je po opakovaném podání PHT ovlivněna oproti kontrolní skupině signifikantně alespoň v jednom testu.

Hypotéza 2

- H_0 Není rozdíl mezi motorickým postižením u skupiny s vyšší dávkou fenytoinu a skupiny s dávkou nižší.
- H_A Vedlejší účinky jsou patrnější u skupiny s vyšší dávkou.

Hypotéza 3

- H_0 Vedlejší účinky jsou stejně výrazné v průběhu vývoje.
- H_A U mladších jedinců jsou vedlejší účinky výraznější než u starších potkanů.

3 METODIKA

Tato pilotní studie byla prováděna v rámci řešení grantu GAČR číslo P304/12/G069 Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky. Experiment byl schválen Odbornou komisí Fyziologického ústavu a byl shledán v souladu se zákonem České republiky o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat.

Testování probíhalo vždy za stejných podmínek v zatemněné, uměle osvětlené místnosti se stálou teplotou 23°C a s odvětráním. Testy prováděl jeden člověk vždy ve stejném pořadí a ve stálou denní dobu, mezi 14:00 a 17:00.

Z technických důvodů proběhlo testování 12., 15., 19., 22., 25., 31. a 60. den po narození mláďat.

3.1 Zvířata

K experimentu byli využiti samci potkanů kmene Wistar. 5. den po narození byl utvořen z tří vrhů jeden umělý vrh o jedenácti samcích. Zvířata byla chována ve stabilním prostředí s pravidelným světelným režimem po 12 hodinách (6:00 – 18:00). Ve zvěřinci byla držena konstantní teplota $22 \pm 1^\circ\text{C}$ a vlhkost $55 \pm 5\%$.

V průběhu celého testování bylo se zvířaty zacházeno s maximální ohleduplností.

3.2 Aplikace fenytoinu

Zvířata byla rozdělena do tří skupin. V první, kontrolní skupině, byli potkani tři. Druhá a třetí skupina byly zastoupeny čtyřmi zvířaty. Fenytoin byl podáván mláďatům intraperitoneálně od 7. do 11. dne po narození. Druhá skupina dostávala dávku 60 mg/kg, třetí skupina 30 mg/kg. Kontrolní skupině bylo podáno stejné třísložkové rozpouštědlo (polyethylenglykol + alkohol + voda), jaké bylo použito pro rozpuštění fenytoinu.

3.3 Statistické zpracování dat

Data získaná z uvedených testů byla podrobena statistické analýze provedené softwarem SigmaStat (SigmaStat® SPSS). Nejprve proběhl rozbor dat, zda odpovídají Gaussovskému rozložení a dle toho bylo určeno parametrické nebo neparametrické zpracování dat. Základním testem je analýza rozptylu ANOVA s následným párovým srovnáváním dat. Nejběžněji je používán Holm-Sidakův test. Hladina statistické významnosti byla u všech testovaných dat určena na $P < 0,05$.

3.4 Baterie motorických testů

Testování zvířat probíhalo vždy ve stejnou denní dobu v laboratoři s konstantní teplotou a osvětlením. Zvířata byla podrobena celkem sedmi testům, které byly použity v různé kombinaci ve vazbě na vývoj zvířat. Jednotlivé testy byly prováděny vždy ve stejném pořadí.

3.4.1 Righting on a surface test

Dle *Altmana a Sudarshana (1998)* dochází po manuálním převedení z pronáční polohy do polohy supinační k otočení zpět ze zad na břicho. V průběhu vývoje se rychlost a způsob mění. Provedení testu bylo posuzováno podle času, za který se jedinec byl schopen přetočit. Koordinované přetočení během jedné sekundy bylo bráno jako úspěšné provedení testu. Vyšší hodnoty značí horší koordinaci jedince.

3.4.2 Bar holding test

Zvíře je zavěšeno na hrazdu za přední končetiny (*obr. 7*). Hodnocen je čas, po který se udrží (limitem je 120 s). U starších je možné pozorovat vylezení na hrazdu s pomocí zadních končetin. Pro testování v rámci naší studie bylo limitem 80 s.



Obr. 7 – Bar holding test (*archiv autorky*)

3.4.3 Negative geotaxis test

Potkan je postaven na šikmou plochu hlavou dolů. Správnou reakcí je otočení o 180°. (*Altman, Sudarshan 1975*) Úspěšné zvládnutí testu bylo hodnoceno číslem 1, jiné reakce číslem 0.

3.4.4 Otočení a šplh po laně

Potkan je umístěn na zavěšené lano hlavou dolů (*obr. 8*). Vyspělou reakcí je otočení hlavou vzhůru s případným lezením nahoru. Úspěšnost byla klasifikována třemi kritérii. Hodnocen byl čas, po který se potkan udrží na provaze. Úspěšné otočení bylo hodnoceno číslem 1, neúspěšné číslem 0. Lezení vzhůru bylo ohodnoceno číslem 1, jiné reakce číslem 0. (*Altman, Sudarshan 1975*)



Obr. 8 – Otočení a šplh po laně (*archiv autorky*)

3.4.5 Test chůze po vodorovném žebříku

Zvířata jsou umístěna na aparát skládající se ze dvou plexiskel po stranách a kovových příček, které tvoří vodorovný žebřík. Ten je dlouhý 1 m a je ve výšce 30 cm nad podložkou. Uspořádání příček může být pravidelné, nebo nepravidelné pro ztížení úkolu. Rozestup příček pravidelného žebříku je 1 cm. U nepravidelného jsou příčky rozmístěny dle vždy stejného schématu se vzdálenostmi od 1 cm do 5 cm (*Metz, et al., 2009*).

Pro experiment byl použit jeden pravidelný žebřík a jeden nepravidelný s rozestupy menšími než 5 cm, protože studie probíhala převážně na mladých jedincích, kteří by se mohli protáhnout mezi příčkami a znehodnotit tak pokus. Test byl prováděn vždy jednou. Hodnocena byla vzdálenost, kterou zvíře urazilo, čas (limit 90 s) a počet chyb. Jako chyba byl pokládán jasný krok vedle nebo sklouznutí nohy z příčky.

3.4.6 Rotarod

V tomto testu je hodnocena motorická koordinace, díky které je potkan schopen udržet se na rotujícím válci. Měří se latence pádu při různých rychlostech otáčení. Při opakování jsou testovány i schopnosti učení (*Buitrago et al., 2004*). V této práci byl test prováděn vždy jedenkrát. U 22 a 25 denních potkanů byla použita rychlost 5 otáček/min a 15 otáček/min, u 31 denních 15 otáček/min a 30 otáček/min. Po 60 sekundách bylo postupně zvyšováno otáčení až k vyšší hodnotě.

4 VÝSLEDKY

4.1 Righting on a surface test

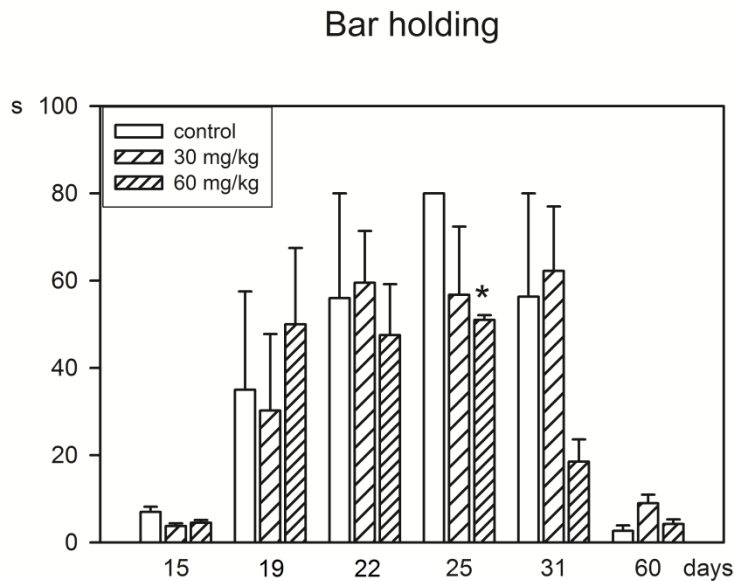
Test byl prováděn na 12denních a 15denních mláďatech. Ani v jedné skupině potkani s dávkou fenytoinu nevykazovali odchylky od skupiny kontrolní. U všech proběhlo otočení ze zad na břicho během jedné sekundy.

4.2 Bar holding test

Test byl prováděn ve všech vývojových stádiích, tedy od 15 po 60denní zvířata. Signifikantní rozdíl byl shledán u 25denních zvířat u skupiny s dávkou fenytoinu 30 mg/kg (*obr. 9*). U 15denních se objevily nejlepší výsledky vždy v kontrolní skupině. U 15denních potkanů je pozorovatelný horší výsledek obou skupin s dávkou fenytoinu, je ale nesignifikantní. Ve zbylých měřeních je tendence velmi rozmanitá. U skupiny s 60 mg/kg dávkou fenytoinu bylo subjektivně možné pozorovat dyskoordinaci předních a zadních končetin. Z tabulky můžeme usoudit méně časté pády potkanů kontrolní skupiny od 19denních mláďat a největší frekvence pádů u skupiny s vyšší dávkou fenytoinu (*tab. 4*).

	kontrola	60 mg/ kg PHT	30 mg/kg PHT
15-denní	3/3	4/4	4/4
19-denní	2/3	3/4	3/4
22-denní	1/3	4/4	2/4
25-denní	0/3	4/4	2/4
31-denní	0/3	1/4	1/4
60-denní	0/3	1/4	0/4

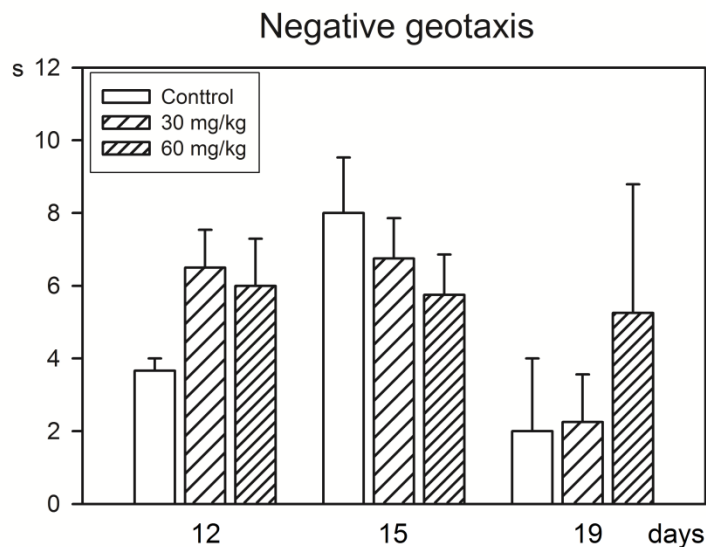
Tabulka 4 – Frekvence pádů v bar holding testu



Obr. 9 – Sloupcový diagram ukazující výsledky bar holding testu u 15-60denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje čas (s), po který se zvířata udržela na hrazdě.

4.3 Negative geotaxis test

Signifikantní rozdíl nevykázala žádná ze skupin 12, 15 a 19denních potkanů, ale u 19denních je patrné nejpomalejší otočení u skupiny s PHT 60 mg/kg (*obr. 10*).



Obr. 10 - Sloupcový diagram ukazující výsledky testu negativní geotaxe u 12-19denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje čas (s) během kterého se zvířata otočila o 180°.

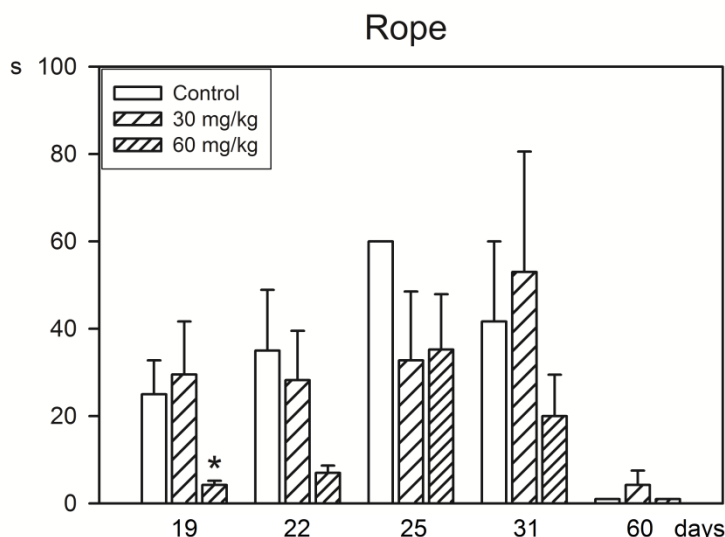
U 19denních potkanů u dvou potkanů z každé skupiny došlo k utíkání z plošiny, test pro ně byl ohodnocen číslem 0, tzn. nehodnoceno.

4.4 Otočení a šplh po laně

Test byl prováděn na zvířatech 19., 22., 25., 31. a 60. den po narození. Signifikantní rozdíl v tomto testu byl prokázán u 19denních potkanů s PHT 60 mg/kg (*obr. 11*). U téže skupiny 22. den po narození vyšla hladina statistické významnosti $P=0,064$. 19. a 22. den také u skupiny s 60 mg/kg dávkou fenytoinu došlo k otočení hlavou nahoru jen u jednoho zvířete, v kontrolní skupině se otočila zvířata všechna (*tab. 5*).

Šplh po laně vzhůru se objevil poprvé u potkana ze skupiny v nižší dávkou fenytoinu, a to 19. a 22. den. Od 31. dne již lezení nahoru po laně bylo zaznamenáno u všech kontrolních zvířat.

60. den se na laně déle než 1s udrželo jen jedno zvíře, patřilo do skupiny s nižší dávkou fenytoinu, ostatní se ve většině případů, kromě jednoho zvířete ze skupiny s vyšší dávkou, slezli dolů.



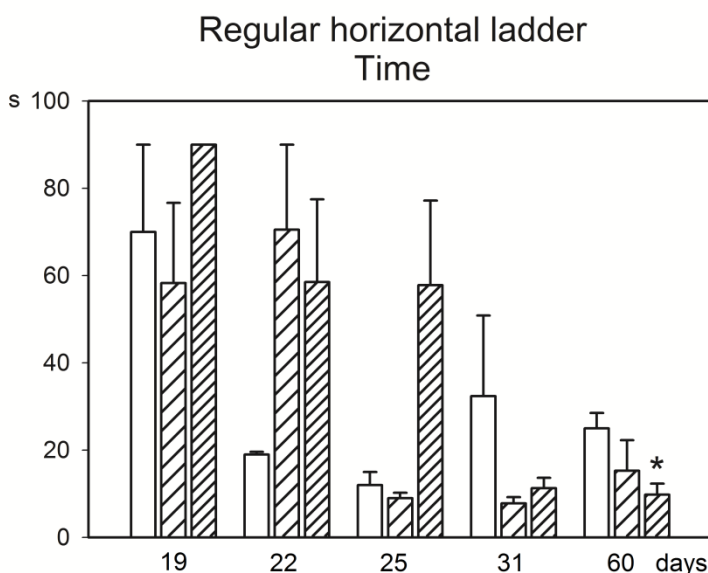
Obr. 11 - Sloupcový diagram ukazující výsledky testu na laně u 12-19denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje čas (s), po který se zvířata udržela na laně. Statisticky významný rozdíl proti kontrolám je označen hvězdičkou.

	Otočení			Šplh vzhůru			Spuštění dolů		
	kontrola	60 mg/kg PHT	30 mg/kg PHT	kontrola	60 mg/kg PHT	30 mg/kg PHT	kontrola	60 mg/kg PHT	30 mg/kg PHT
19-denní	3/3	1/4	4/4	0/3	0/4	1/4	0/3	0/4	0/4
22-denní	3/3	1/4	2/4	0/3	0/4	1/4	2/3	0/4	0/4
25-denní	3/3	3/4	2/4	3/3	3/4	2/4	0/3	3/4	2/4
31-denní	3/3	4/4	4/4	3/3	1/4	1/4	1/3	4/4	2/4
60-denní	0/3	2/4	2/4	0/3	0/4	0/4	3/3	3/4	3/4

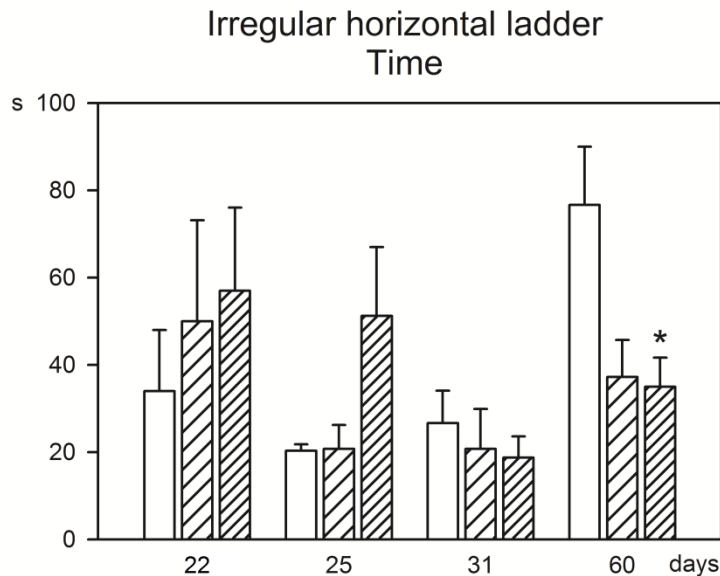
Tabulka 5 – Frekvence otočení, šplhání a spuštění dolů při testování na laně

4.5 Test chůze po vodorovném žebříku

U tohoto testu byl zaznamenán signifikantní rozdíl u pravidelného (*obr. 12*) i nepravidelného žebříku (*obr. 13*), v obou případech u 60denních potkanů. Oproti kontrolní skupině potkani s 60 mg/kg a 30 mg/kg dávkou fenytoinu byli rychlejší.

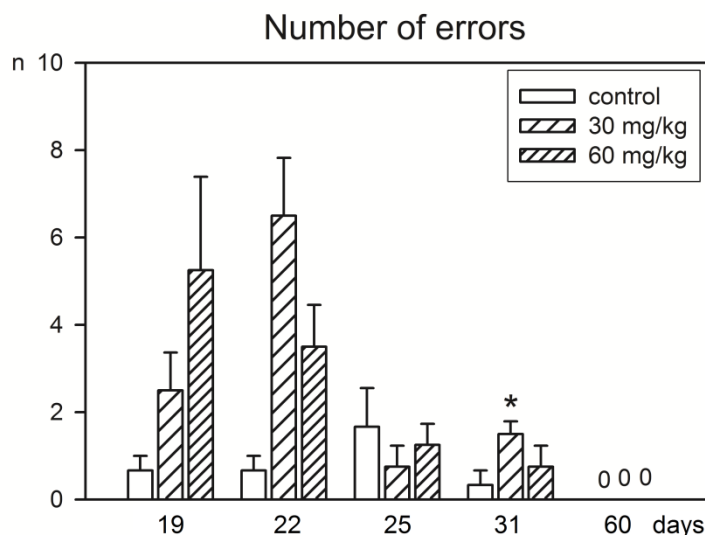


Obr. 12 - Sloupcový diagram ukazující výsledky testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku u 19-60denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje čas (s), za který zvířata žebřík přešla. Statisticky významný rozdíl proti kontrolám je označen hvězdičkou.



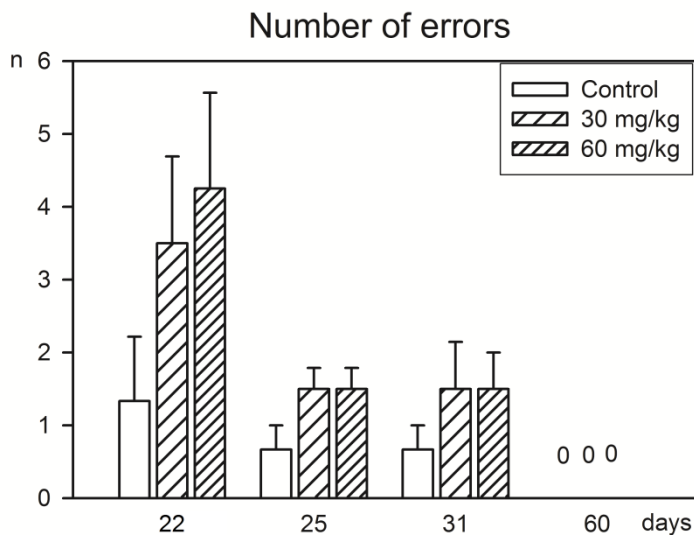
Obr. 13 - Sloupcový diagram ukazující výsledky testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku u 19-60denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje čas (s), za který zvířata žebřík přešla. Statisticky významný rozdíl proti kontrolám je označen hvězdičkou.

Rozdíl v počtu chyb na pravidelném žebříku byl signifikantní u 22 a 31denních zvířat (*obr. 14*), kdy nejvíce chyb udělali potkani ve skupině s 60 mg/kg dávkou fenytoinu a výrazně nejméně kontrolní skupina.



Obr. 14 - Sloupcový diagram ukazující počet chybných kroků u testu chůze po pravidelném horizontálním žebříku u 19-60denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje počet chyb. Statisticky významný rozdíl proti kontrolám je označen hvězdičkou.

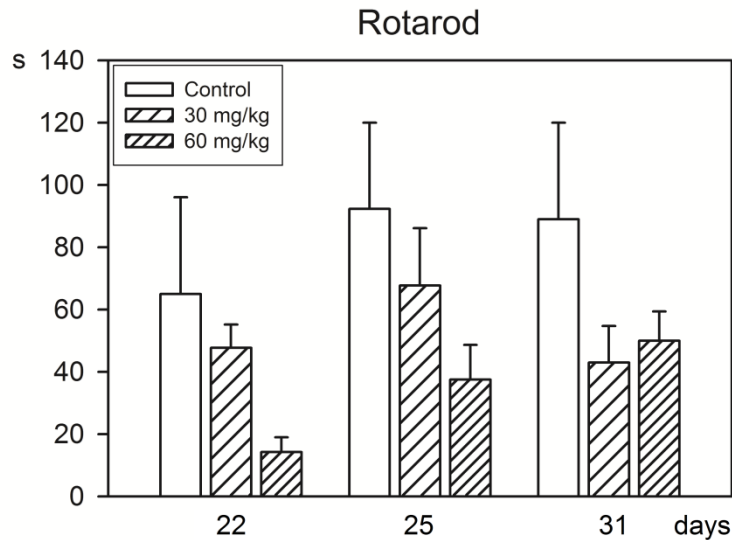
Rozdíly v počtu chyb u nepravidelného žebříku signifikantní nevyšly (*obr. 15*), ačkoliv je zde jasná tendence k horším výsledkům u skupin s dávkou fenytoinu oproti kontrolní skupině.



Obr. 15 - Sloupcový diagram ukazující počet chybných kroků u testu chůze po nepravidelném horizontálním žebříku u 19-60denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje počet chyb.

4.6 Rotorod

U žádné ze skupin nebyl prokázán signifikantní rozdíl v tomto testu. Je ale jasně patrná tendence horších výsledků zvířat s dávkou fenytoinu oproti kontrolní skupině (*obr. 16*). U 22denních potkanů s vyšší i nižší dávkou došlo k pádu ještě před zrychlením, tedy při rychlosti 5cm/s. Stejně tak ve skupině s dávkou 60 mg/kg fenytoinu i při druhém měření (25denní) žádný potkan nevydržel více než 60 s, a tedy spadli již při nižší rychlosti. Pouze u kontrolní skupiny došlo k udržení po celou dobu, a to u dvou jedinců 25. a 31. den.



Obř. 16 - Sloupcový diagram ukazující výsledky testu na akcelerujícím rotarodu u 22-31denních potkanů. Na ose X jsou znázorněny jednotlivé věkové skupiny. Osa Y označuje latenci pádu (s).

4.7 Testování hypotéz

Hypotéza 1

H_0 Byla odmítnuta pro signifikantní rozdíly u bar holding testu a testu chůze po pravidelném a nepravidelném žebříku.

H_A Byla potvrzena, tj. motorika potkanů je po opakovaném podání PHT ovlivněna oproti kontrolní skupině signifikantně alespoň v jednom testu.

Hypotéza 2

H_0 Byla odmítnuta pro signifikantně rozdílný výsledek u počtu chyb skupiny s 60 mg/kg a 30 mg/kg na pravidelném žebříku.

H_A Byla potvrzena, tj. vedlejší účinky jsou patrnější u skupiny s vyšší dávkou.

Hypotéza 3

H_0 Nepodařilo se vyvrátit

H_A V provedených testech se nepodařilo se prokázat, že u mladších jedinců jsou vedlejší účinky výraznější než u starších potkanů.

5 DISKUSE

Vedlejší účinky fenytoinu při jeho užívání v průběhu gravidity jsou podloženy mnoha studii. Byly zdokumentovány dlouhodobé dopady na motoriku a motorické učení (*Wolanski a Azcurra, 2005, Vorhees, 1994*). V oblasti kognitivních funkcí bylo popsáno zhoršení paměti u lidí vystavených fenytoinu in utero (*Meador et al., 1995*) a vliv na pracovní paměť, prostorovou navigaci (*Schilling et al., 1999*). Byl také popsán hydantoinový syndrom (*Nanda et al., 1999*). Změnami v oblasti kognitivních funkcí po akutním podání se zabývali Shannon a Love, kteří popisují sníženou schopnost motorického učení (*Shanon a Love, 2007*).

Pro své antikonvulzivní účinky je fenytoin používán i k léčbě epileptických záchvatů u novorozenců, ačkoliv jeho vedlejší účinky v dlouhodobém horizontu při takovém podání zatím nejsou dostatečně popsány. V této práci byly uvedeny výsledky měření odchylek v oblasti motoriky v průběhu vývoje u laboratorního potkana po postnatálním podání fenytoinu ve stáří korespondujícím s dítětem po narození.

Tato problematika byla zpracována na myším modelu ve studii zabývající se jednoduchými motorickými projevy u mláďat s dávkou fenytoinu podanou po narození (*Hatta et al., 1999*) a ve studii sledující výsledky testování na rotarodu a sledováním spontánní lokomoce jedinců (*Ohmori et al., 1999*). Porovnání s experimentem, který je popisován v této bakalářské práci, je poněkud obtížné kvůli použití jiného druhu laboratorního zvířete a také pro jiný způsob aplikace fenytoinu.

V naší studii jsme nepozorovali u provedení righting reflexu rozdílnou odpověď potkanů z jednotlivých skupin. Naopak na myším modelu s podáním fenytoinu 2. - 4. den po narození (Hatta a kol.) byl zaznamenán signifikantní rozdíl oproti kontrolní skupině. Rozdílný výsledek zde může být způsoben více faktory. Fenytoin byl ve zmíněné studii podáván orálně ve formě suspenze (10 mg, 17,5 mg, 25 mg a 35 mg PHT/kg) 2. – 4. den, což odpovídá třetímu trimestru lidské gravidity. My podávali

fenytoin (rozpuštěný ve směsi ethylenglykolu, alkoholu a vody) 7. – 11. den intraperitoneálně. Dalším rozdílem je použití Jcl:IRC myši oproti potkanům Wistar.

Při testování bar holding byl signifikantní rozdíl dosažen jen při porovnání kontrolní skupiny a skupiny s dávkou 30 mg/kg PHT 25. den. Kratší latence pádu byla patrná i u skupiny s 60 mg/kg PHT, ale byly zde velké odchylky. U skupiny s vyšší dávkou fenytoinu bylo možné subjektivně sledovat horší motorickou koordinaci a ataxii dolních končetin. 60. den už u všech jedinců byl test ukončen vědomým seskokem zvířete z hrazdy.

U testu negativní geotaxe nevykázala signifikantní rozdíl žádná ze skupin zvířat. Test byl prováděn pouze dvakrát, 12. a 15. den po narození, protože potom už zvířata utíkala z plošiny a znemožnila tak další testování.

Při testování otočení a šplhu po laně byl prokázán signifikantní rozdíl u 19denních potkanů s PHT 60 mg/kg a u 22denních potkanů vyšla hladina statistické významnosti $P=0,064$. U 19 a 22denních zvířat s 60 mg/kg dávkou došlo k otočení hlavou nahoru u méně jedinců než v kontrolní skupině. 60. den po narození se na laně potkani z morfologických důvodů neudrželi.

Test chůze po vodorovném žebříku ukázal signifikantní rozdíly v pravidelné a nepravidelné modifikaci i v počtu chyb na pravidelném žebříku. 60denní potkani s dávkou fenytoinu 60 mg/kg a 30 mg/kg přešli oba žebříky za signifikantně kratší čas než kontrolní skupina. To mohlo být způsobeno změnami v oblasti prostorové paměti a učení, které popisuje Schilling (*Schilling et al., 1999*). Počet chyb byl signifikantně vyšší u skupiny s 60 mg/kg dávkou PHT oproti kontrolní skupině u 22 a 31denních zvířat. Průměrný počet chyb u nepravidelného žebříku byl nižší než u pravidelného u všech skupin. To může být způsobeno pořadím testů, kdy první absolvovali potkani vždy pravidelný žebřík a až poté následoval přechod nepravidelného žebříku.

Nejvíce se problematikou působení fenytoinu podaného po narození zabýval Forcelli se svým týmem. Analyzovali vývoj motorické koordinace a spontánní lokomoce potkanů po podání fenytoinu 7., 8., 9., 11., 12. a 13. den po narození

(Forcelli *et al.*, 2012, a). Pro experiment, který je součástí této práce, byla zvolena aplikace látky 7. – 11. den po narození. Je zde tedy rozdíl v podání látky, který mohl zapříčinit, mimo jiné vlivy, neshodné výsledky. Porovnání motorické koordinace na akcelerujícím rotarodu je obtížné mimo jiné proto, že pro studii Forcelliho a kol. probíhalo testování opakovaně s přestávkami mezi jednotlivými pokusy (celkem 10x v rámci každého měření). V rámci našeho experimentu byla zvířata na rotarodu testována při každém měření jen jednou, nebylo tedy popsáno motorické učení.

Forcelli a kol. zdokumentovali signifikantně kratší latenci pádů u skupiny s fenytoinem oproti kontrolní skupině. 22. den jsme u skupiny s 60 mg/kg dávkou fenytoinu pozorovali větší zhoršení motorické koordinace a zaznamenali častější pády ještě před zrychlením rotarodu. I při dalších měřeních jsme viděli u skupiny s vyšší dávkou nejhorší výsledky. Tyto změny ale nebyly signifikantní. To přisuzuji nízkému počtu probandů a tomu, že test byl prováděn vždy pouze jedenkrát.

K názoru, že fenytoin nemusí v dospělosti mít vliv na zhoršení motorických schopností, dospěl po analýze provedení testu na akcelerujícím rotarodu Ogura a kol. Neprokázali signifikantní rozdíl u myší, kterým byl podán fenytoin, oproti kontrolní skupině. Přesné porovnání s tímto experimentem ale není možné z důvodu použití jiného druhu zvířat a také pro rozdílný princip aplikace. Podávali fenytoin od 5. do 14. dne po narození ústy ve formě suspenze v množství 35 mg/kg (Ogura *et al.*, 2002).

Lokomoci hodnotili Forcelli a kol. testem open field, u kterého vyšly nesignifikantní rozdíly v uražené vzdálenosti, ale byl prokázán rozdíl v chování a aktivitě potkanů v průběhu testu. Potkani s dávkou fenytoinu strávili více času v centrální části pole oproti kontrolní skupině.

Subjektivním hodnocením motivace probandů v průběhu testování vycházejí jako nejaktivnější potkani ze skupiny s PHT 30 mg/kg. To se neshoduje se studií Ogury a kol. sledující motivaci u myší. Popsali na testu nuceného plavání kratší dobu plavání myší s PHT v porovnání s kontrolní skupinou, což by svědčilo o slabší motivaci. Jejich výsledky ale nebyly prokázány jako signifikantní.

V oblasti vlivu fenytoinu na kognitivní funkce můžeme porovnat výsledek Forcelliho a Ogury, kteří pomocí Morrisova vodního bludiště testovali prostorovou orientaci. Studie na potkanech (Forcelli a kol.) neprokázala poškození paměti a orientace v prostoru (Forcelli *et al.*, 2012, a). Naopak experiment na myších (Ogura a kol.) prokázal signifikantní rozdíl při lokalizování skryté plošiny mezi skupinami s PHT a bez, který se zvýraznil opakováním testu (Ogura *et al.*, 2002). Rozdílný výsledek může být způsoben použitím jiného laboratorního zvířete a odlišným schématem dávkování fenytoinu – 5. – 14. den po narození (Ogura a kol.) versus 7., 8., 9., 11., 12. a 13. den po narození (Forcelli a kol.).

Na výsledcích zmíněných autorů i potkanů z naší studie, kterým byl podán fenytoin, je patrná větší nemotornost a horší motorická koordinace (viz výsledky rotarodu), ale změny nevyšly signifikantní, pravděpodobně z důvodu malého počtu probandů. Totéž pozoruji u výsledků nepravidelného žebříku, kde je jasná tendence k většímu počtu chyb u skupin s oběma dávkami PHT. Z důvodu velkého rozptylu dat nebyly prokázány signifikantní změny ani v jednom měření, ale je zde patrná tendence ke změněnému provedení motorických testů potkanů s PHT v porovnání s kontrolní skupinou.

Přesto u některých testů (čas přechodu pravidelného a nepravidelného žebříku, počet chyb u pravidelného žebříku, bar holding test, test na laně) se signifikantní rozdíl objevil i přes malý počet porovnávaných zvířat. Proto je nutné tuto studii rozšířit testováním většího počtu probandů.

ZÁVĚR

Cílem této práce bylo shrnout dostupné informace o vedlejších účincích fenytoinu s důrazem na vliv na motoriku a koordinaci a tyto poznatky následně porovnat s první sérií pokusů na 11 laboratorních potkanech.

V rámci naší pilotní studie byly testovány tři skupiny potkanů s různými dávkami fenytoinu (PHT 60 mg/kg, PHT 30 mg/kg, kontrolní skupina) baterií motorických testů a jejich výsledky byly následně statisticky zhodnoceny. Zaznamenáno bylo i subjektivní hodnocení. Ze všech testů se signifikantní rozdíl vyskytl u 25denních potkanů s PHT 60 mg/kg při bar holding testu. Statisticky významné výsledky se ukázaly také u testů na pravidelném a nepravidelném horizontálním žebříku, a to v času přechodu pravidelného a nepravidelného žebříku u 60denních potkanů s PHT 60 mg/kg a v počtu chyb při přechodu pravidelného žebříku u 31denních potkanů s PHT 60 mg/kg. Signifikantní byl také rozdíl u 19denních potkanů při testu na laně. Výrazně kratší čas, po který se zvířata udržela, byl patrný i u 22denních potkanů, ale nevyšel jako statisticky významný ($P=0,064$).

Také u dalších testů byla patrná tendence k horším výsledkům potkanů s vyšší dávkou fenytoinu, např. u rotarodu a počtu chyb při přechodu nepravidelného horizontálního žebříku, ale z důvodu velkého rozptylu dat nebyly rozdíly prokázány jako statisticky významné.

Z naší studie vyplývá, že fenytoin po podání 7. – 11. den po narození ovlivňuje motorický projev a koordinaci potkanů. Je pravděpodobné, že vedlejší účinky na motoriku se mohou objevit i u dětí, které fenytoin užívají časně po narození. Pro přesnější popsání jeho vlivu je ale nutné rozšířit stávající studii větším počtem zvířat a doplnit ji o další testy.

6 SOUHRN

V této práci jsou shrnuta dostupná data o vedlejších účincích fenytoinu na motorický vývoj, jejich porovnání mezi sebou a se studií na 11 laboratorních potkanech, která byla v rámci práce provedena. Práce obsahuje kapitoly o fenytoinu, epilepsii, principu působení antiepileptik, postnatálním vývoji potkana od narození po dospělost (60 dnů po narození) a praktickou část.

Potkanům byl intraperitoneálně podáván fenytoin v dávkách 60 mg/kg, 30 mg/kg a jeho účinky byly porovnávány s kontrolní skupinou. Aplikace proběhla 7. – 11. den po narození mláďat, v období korespondujícím s perinatálním obdobím vývoje člověka. V rámci každého měření potkani podstoupili baterii motorických testů, která se skládala z hodnocení righting reflexu, bar holding testu, negativní geotaxe, otočení a šplhání po laně a testu chůze po pravidelném a nepravidelném žebříku. Testy byly zařazeny s ohledem na stupeň vývoje potkana.

Zaznamenali jsme tendenci k horším výsledkům skupiny s PHT 60 mg/kg u více testů. Signifikantní rozdíl se vyskytoval u výsledků bar holding testu, času přechodu pravidelného a nepravidelného žebříku, počtu chyb na pravidelném žebříku a testu doby udržení na laně. Z toho vyplývá, že u potkana ovlivňuje podání fenytoinu jeho motorické schopnosti a schopnosti koordinace, který je výraznější při podání vyšší dávky, ale nemění se se stářím potkana.

REFERENČNÍ SEZNAM

- ALAVERDASHVILI, M., KUBOVÁ, H., MAREŠ, P. Motor performance and behavior of immature rats are not compromised by a high dose of topiramate. *Epilepsy*. 2005, vol. 7, issue 2, s. 222-230. DOI: 10.1016/j.yebeh.2005.04.013.
- ALTMAN, J., SUDARSHAN, K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*. 1975, vol. 23, č. 4, s. 150-161. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780195162851.003.0014.
- BATH, K. G., SCHARFMAN, H. E. Impact of early life exposure to antiepileptic drugs on neurobehavioral outcomes based on laboratory animal and clinical research. *Epilepsy*. 2013, vol. 26, issue 3, s. 427-439. DOI: 10.1016/j.yebeh.2012.10.031.
- BUITRAGO, M. M., et al. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiology of learning and memory*, 2004, 81.3: 211-216.
- BUREŠOVÁ, J. v: KAŇOVSKÝ, P., HERZIG, R. Speciální neurologie. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 336 s. ISBN 978-80-244-1664-9.
- CLARAC, F., VINAY, L., CAZALETS, J., FADY, J., JAMON, M. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. *Brain Research Reviews*. 1998, vol. 28, 1-2, s. 35-43. DOI: 10.1016/s0165-0173(98)00024-1.
- DANIELSSON, B. R., et al. Initiation of phenytoin teratogenesis: pharmacologically induced embryonic bradycardia and arrhythmia resulting in hypoxia and possible free radical damage at reoxygenation. *Teratology*, 1997, 56.4: 271-281.
- DAS, R. R., GRIESEMER, D. A., KOTHARE, S. V. The Role of Phenytoin in the Treatment of Localization Related Epilepsy: An International Internet-Based Survey of Neurologists and Epileptologists. *ISRN neurology*, 2013, 2013.
- DE MARCO, F. A., et al. Cerebellar volume and long-term use of phenytoin. *Seizure*, 2003, 12.5: 312-315.
- DINGLELINE, R., et al. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological reviews*, 1999, 51.1: 7-62. DOBBING, J., SANDS, J. Quantitative growth and development of human brain. *Archives of disease in childhood*, 1973, 48.10: 757-767.
- DOLEŽAL, M., et al. Farmaceutická chemie léčiv působících na centrální nervový systém. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2013.
- Forcelli et al., a - FORCELLI, P. A., KOZLOWSKI, R., SNYDER, C., KONDRATYEV, A., GALE, K. Effects of Neonatal Antiepileptic Drug Exposure on Cognitive, Emotional, and Motor Function in Adult Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011, vol. 340, issue 3, s. 558-566. DOI: 10.1124/jpet.111.188862.

- Forcelli et al., b - FORCELLI, P. A., JANSSEN M. J., VICINI, S., GALE, K. Neonatal exposure to antiepileptic drugs disrupts striatal synaptic development. *Annals of Neurology*. 2012, vol. 72, issue 3, s. 363-372. DOI: 10.1002/ana.23600.
- GEISLER, H. C., WESTERGA, J., GRAMSBERGEN, A. Development of posture in the rat. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 1993, 53.4: 517-524.
- GLAUSER, T. A. Effects of antiepileptic medications on psychiatric and behavioral comorbidities in children and adolescents with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 2004, 5: 25-32.
- GRAMSBERGEN, A., BRIL, B., BRENIÈRE, Y. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development?. *Neuroscience*. 1998, vol. 22, issue 4, s. 337-358. DOI: 10.1016/s0166-4115(08)60959-0.
- HAMPL, F., PALEČEK, J. *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 413 s. ISBN 80-708-0495-5.
- HATTA, T., OHMORI, H., MURAKAMI, T., TAKANO, M., YAMASHITA, K., YASUDA, M. Neurotoxic Effects of Phenytoin on Postnatal Mouse Brain Development Following Neonatal Administration. *Neurotoxicology and Teratology*. 1999, vol. 21, issue 1, s. 21-28. DOI: 10.1016/s0892-0362(98)00028-2.
- HILLE, B. *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer, 2001, xviii, 814 p. ISBN 08-789-3321-2.
- HYNIE, S. *Speciální farmakologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1995, xiii, 242 s. ISBN 80-718-4205-2.
- KARTHIKEYAN, M., SAQUIB A. A. K., KARTHIKEYAN, D. Therapeutic applications of phenytoin. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2009, vol. 2, issue 3. ISSN 0974-2441.
- KIRSCHBAUM, K., GURK-TURNER, C. Phenytoin vs fosphenytoin. *BUMC Proceedings*. 1999, vol. 12, s. 168-172.
- KÖHLING, R. Voltage-gated Sodium Channels in Epilepsy. *Epilepsia*. 2002, vol. 43, issue 11, s. 1278-1295. DOI: 10.1007/springerreference_121228.
- LANDMARK, C. J.: Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Medical Science Monitor*, 13 (1), RA1-7, 2007. Retrieved 9. 9. 2008 from www.medscimonit.com.
- LASON, W., CHLEBICKA, M., REJDAK, K., SIMEONE, T.A., RHO, J.M. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacological Reports*. 2013, vol. 65, issue 4, s. 59-66. DOI: 10.1016/b978-012373961-2.00160-0.
- LINCOVÁ, D., FARGHALI, H. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, xxiv, 672 s. ISBN 978-807-2623-730.

- LIU, C., et al. Phenytoin-mediated oxidative stress in serum of female epileptics: a possible pathogenesis in the fetal hydantoin syndrome. *Human & experimental toxicology*, 1997, 16.3: 177-181.
- MALLOW, D. W.; HERRICK, M. K.; GATHMAN, G. Fetal exposure to anticonvulsant drugs. Detailed pathological study of a case. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 1980, 104.4: 215-218.
- MEADOR, K. J., D. W. LORING, E. E. MOORE, W. O. THOMPSON, M. E. NICHOLS, R.E., OBERZAN, M. W. DURKIN, B. B. GALLAGHER a D. W. KING. Comparative cognitive effects of phenobarbital, phenytoin, and valproate in healthy adults. *Neurology*. 1995, vol. 45, issue 8, s. 1494-1499. DOI: 10.1212/wnl.45.8.1494.
- MELICHAR, B. *Chemická léčiva*. 3. vyd. Praha: Avicenum, Praha, 1987, 956.
- METZ, G. A., WHISHAW I., Q. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. *Journal of Visualized Experiments*. 2009, issue 28. DOI: 10.3791/1204.
- MORÁŇ, M. *Praktická epileptologie*. 2. vyd. Praha: Triton, 2007, 163 s. ISBN 978-807-3870-232.
- NANDA, A., et al. Fetal hydantoin syndrome: a case report. *Pediatric dermatology*, 1989, 6.2: 130-133.
- NEJEDLÝ, K. *Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat*. Vyd. 1. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1965, 629 s. Příručky pro vysoké školy.
- OGURA, H., et al. Neurotoxic damage of granule cells in the dentate gyrus and the cerebellum and cognitive deficit following neonatal administration of phenytoin in mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 2002, 61.11: 956-967.
- OHMORI, H., OGURA, H., YASUDA, M., NAKAMURA, S., HATTA, T., KAWANO, K., MICHIKAWA, T., YAMASHITA, K., MIKOSHIBA, K. Developmental Neurotoxicity of Phenytoin on Granule Cells and Purkinje Cells in Mouse Cerebellum. *Journal of Neurochemistry*. 1999, vol. 72, issue 4, s. 1497-1506. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.721497.x.
- OHMORI, H., YAMASHITA, K., HATTA, T., YAMASAKI, S., KAWAMURA, M., HIGASHI, Y., YATA, N., YASUDA, M. Effects of low-dose phenytoin administered to newborn mice on developing cerebellum. *Neurotoxicology and Teratology*. 1997, vol. 19, issue 3, s. 205-211. DOI: 10.1016/s0892-0362(97)00014-7.
- ROGAWSKI, M. A., LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*. 2004, vol. 5, issue 7, s. 553-564. DOI: 10.1038/nrn1430.
- SEIDL, Z., OBENBERGER, J. *Neurologie pro studium i praxi*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 363 s. ISBN 80-247-0623-7.

- SHANNON, H. E., LOVE, P. L. Effects of antiepileptic drugs on attention as assessed by a five-choice serial reaction time task in rats. *Epilepsy*. 2005, vol. 7, issue 4, s. 620-628. DOI: 10.1016/j.yebeh.2005.08.017.
- SHANNON, H. E., LOVE, P. L. Effects of antiepileptic drugs on learning as assessed by a repeated acquisition of response sequences task in rats. *Epilepsy*. 2007, vol. 10, issue 1, s. 16-25. DOI: 10.1016/j.yebeh.2006.11.004.
- SHANNON, H. E., LOVE, P. L. Effects of antiepileptic drugs on working memory as assessed by spatial alternation performance in rats. *Epilepsy*. 2004, vol. 5, issue 6, s. 857-865. DOI: 10.1016/j.yebeh.2004.08.017.
- SCHILLING, M. A., INMAN S. L., MORFORD L. L., MORAN M. S., VORHEES C.V. Prenatal Phenytoin Exposure and Spatial Navigation in Offspring. *Neurotoxicology and Teratology*. 1999, vol. 21, issue 5, s. 567-578. DOI: 10.1016/s0892-0362(99)00019-7.
- SILVA, F. L., BLANES, W., KALITZIN, S. N., PARRA, J., SUFFCZYNSKI, P., VELIS, D. N., SCHERRER, J., CALVET, J.. Epilepsies as Dynamical Diseases of Brain Systems: Basic Models of the Transition Between Normal and Epileptic Activity. *Epilepsia*. 2003, vol. 44, s12, s. 112-140. DOI: 10.1007/978-3-7091-8306-9_9.
- SUCHOPÁR, J. *Remedia compendium*. 4. vyd. Editor Štěpánka Valentová. Praha: Panax, 2009, xlii, 946 s. ISBN 978-809-0280-649.
- TAUER, U., KNOTH, R., VOLK, B. Phenytoin alters Purkinje cell axon morphology and targeting in vitro. *Acta neuropathologica*. New York: Springer-Verlag, 1998, vol. 95, issue 6, s. 583-591. DOI: 10.1007/s004010050844.
- VELÍŠEK, L. *Kapitoly z moderní neurofyziologie a epileptologie*. Praha: Univerzita Karlova, 1992, 91 s. ISBN 80-706-6595-5.
- VOJTA, V., PETERS, A. *Vojtův princip: svalové souhry v reflexní lokomoci a motorická ontogeneze*. 1. vyd. Praha: Grada, 1995, 181 s. ISBN 80-716-9004-X.
- VORHEES, C. V., et al. A new method for evaluating air-righting reflex ontogeny in rats using prenatal exposure to phenytoin to demonstrate delayed development. *Neurotoxicology and teratology*, 1994, 16.6: 563-573.
- WESTERGA, J., GRAMSBERGEN, A. Development of locomotion in the rat: the significance of early movements. *Early Human Development*. 1993, vol. 34, 1-2, s. 89-100. DOI: 10.1016/0378-3782(93)90044-u.
- WOLANSKY, M., AZCURRA, J. Permanent motor activity and learning disorders induced by exposure to phenytoin during gestation and early infancy in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*. 2005, vol. 27, issue 2, s. 299-310. DOI: 10.1016/j.ntt.2004.12.006.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Bar holding test (tabulka)	52
Příloha č. 2: Negativní geotaxe (tabulka)	52
Příloha č. 3: Otočení a šplh po laně (tabulka)	53
Příloha č. 4: Chůze po pravidelném žebříku (tabulka)	54
Příloha č. 5: Chůze po nepravidelném žebříku (tabulka).....	55
Příloha č. 6: Rotarod (tabulka).....	56

PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Bar holding test

(hodnocen čas v sekundách)

	12. den	15. den	19. den	21. den	25. den	31. den	60. den
1	-	5	13	80	80	80	2
2	-	7	80	8	80	80	5
3	-	9	12	80	80	9	1
4	-	4	58	60	50	22	4
5	-	4	80	21	49	31	7
6	-	8	10	73	54	8	2
7	-	2	14	36	51	13	4
8	-	2	4	37	14	21	11
9	-	4	80	80	80	80	8
10	-	4	29	80	80	80	13
11	-	5	8	41	53	80	4

Vysvětlivky:

- ... nehodnoceno

Příloha č. 2: Negativní geotropismus

(hodnocen čas v sekundách)

	12. den	15. den	18. den	21. den	25. den	31. den	60. den
1	4	10	0	-	-	-	-
2	4	9	6	-	-	-	-
3	3	5	0	-	-	-	-
4	5	7	15	-	-	-	-
5	9	3	0	-	-	-	-
6	3	8	6	-	-	-	-
7	7	5	0	-	-	-	-
8	7	6	0	-	-	-	-
9	6	8	4	-	-	-	-
10	9	9	5	-	-	-	-
11	4	4	0	-	-	-	-

Vysvětlivky:

- ... nehodnoceno

Příloha č. 3: Otočení a šplh na laně

(hodnocen čas v sekundách, otočení, šplh a spuštění)

	12. den	15. den	19. den	otočení	šplh vzhůru	spuštění dolů	22. den	otočení	šplh vzhůru	spuštění dolů
1	-	-	36	1	0	0	33	1	0	1
2	-	-	29	1	0	0	60	1	0	1
3	-	-	10	1	0	0	12	1	0	0
4	-	-	7	1	0	0	11	1	0	0
5	-	-	3	0	0	0	6	0	0	0
6	-	-	4	0	0	0	8	0	0	0
7	-	-	3	0	0	0	3	0	0	0
8	-	-	8	1	0	0	8	0	0	0
9	-	-	38	1	0	0	27	1	0	0
10	-	-	12	1	0	0	18	0	0	0
11	-	-	60	1	1	0	60	1	1	0

	25. den	otočení	šplh vzhůru	spuštění dolů	31. den	otočení	šplh vzhůru	spuštění dolů	60. den	otočení	šplh vzhůru	spuštění dolů
1	60	1	1	0	60	1	1	0	1	0	0	1
2	60	1	1	0	60	1	1	0	1	0	0	1
3	60	1	1	0	5	1	1	1	1	0	0	1
4	54	1	1	1	15	1	0	1	1	0	0	0
5	60	1	1	0	48	1	1	1	1	1	0	1
6	12	0	0	1	9	1	0	1	1	1	0	1
7	15	1	1	1	8	1	0	1	1	1	0	1
8	8	0	0	1	6	1	0	1	1	1	0	1
9	3	0	0	1	18	1	0	1	1	0	0	1
10	60	1	1	0	60	1	1	0	1	0	0	1
11	60	1	1	0	128	1	1	0	14	1	0	0

Vysvětlivky:

- ... nehodnoceno

1 ... ano

0 ... ne

Příloha č. 4: Chůze po pravidelném žebříku

(hodnocen čas v sekundách, počet chyb a uražená vzdálenost)

	12. den	15. den	19. den			22. den		
			čas /s/	chyby	vzdálenost	čas /s/	chyby	vzdálenost
1	-	-	90	0	100%	20	1	100%
2	-	-	30	1	100%	18	0	100%
3	-	-	90	1	100%	19	1	100%
4	-	-	90	0	0%	90	1	33%
5	-	-	90	4	33%	14	3	100%
6	-	-	90	10	50%	90	5	100%
7	-	-	90	7	50%	40	5	100%
8	-	-	90	0	0%	90	5	50%
9	-	-	30	4	100%	90	10	50%
10	-	-	90	3	33%	90	7	50%
11	-	-	23	3	100%	12	4	100%

	25. den			31. den			60. den		
	čas /s/	chyby	vzdálenost	čas /s/	chyby	vzdálenost	čas /s/	chyby	vzdálenost
1	9	2	100%	69	0	100%	18	0	100%
2	18	0	100%	18	0	100%	29	0	100%
3	9	3	100%	10	1	100%	28	0	100%
4	90	0	33%	10	2	100%	8	0	100%
5	39	1	100%	10	1	100%	9	0	100%
6	12	2	100%	7	0	100%	5	0	100%
7	90	2	50%	18	0	100%	17	0	100%
8	9	2	100%	6	2	100%	8	0	100%
9	9	0	100%	7	1	100%	6	0	100%
10	6	1	100%	6	2	100%	11	0	100%
11	12	0	100%	12	1	100%	36	0	100%

Vysvětlivky:

- ... nehodnoceno

Příloha č. 5: Chůze po nepravdělném žebříku

(hodnocen čas v sekundách, počet chyb a uražená vzdálenost)

	12. den	15. den	19. den	22. den			25. den		
				čas /s/	chyby	vzdálenost	čas /s/	chyby	vzdálenost
1	-	-	-	12	0	100%	20	0	100%
2	-	-	-	60	1	100%	18	1	100%
3	-	-	-	30	3	100%	23	1	100%
4	-	-	-	23	7	100%	50	2	100%
5	-	-	-	90	2	100%	52	1	100%
6	-	-	-	25	2	100%	13	1	100%
7	-	-	-	90	6	66%	90	2	50%
8	-	-	-	13	6	100%	10	2	100%
9	-	-	-	90	2	25%	23	1	100%
10	-	-	-	7	5	100%	15	2	100%
11	-	-	-	90	1	100%	35	1	100%

	31. den			60. den		
	čas /s/	chyby	vzdálenost	čas /s/	chyby	vzdálenost
1	36	1	100%	50	0	100%
2	12	0	100%	90	0	100%
3	32	1	100%	90	0	100%
4	12	2	100%	37	1	100%
5	22	0	100%	25	1	100%
6	10	2	100%	25	0	100%
7	31	2	100%	53	0	100%
8	48	3	100%	40	0	100%
9	10	1	100%	17	0	100%
10	11	0	100%	58	0	100%
11	14	2	100%	34	0	100%

Vysvětlivky:

- ... nehodnoceno

Příloha č. 3:

(hodnocen čas v sekundách, dosažená rychlost otáčení rotarodu při a pády)

	12. den	15. den	19. den	22. den		
				čas	rychlost	pád
1	-	-	-	81	15	1
2	-	-	-	109	15	1
3	-	-	-	5	5	1
4	-	-	-	8	5	1
5	-	-	-	13	5	1
6	-	-	-	8	5	1
7	-	-	-	28	5	1
8	-	-	-	41	5	1
9	-	-	-	40	5	1
10	-	-	-	70	5	1
11	-	-	-	40	5	1

	25. den			31. den			60. den
	čas	rychlost	pád	čas	rychlost	pád	
1	120	15	0	27	19	1	-
2	120	15	0	120	30	0	-
3	37	5	1	120	30	0	-
4	52	5	1	60	30	1	-
5	18	5	1	23	18	1	-
6	19	5	1	52	30	1	-
7	61	5	1	65	30	1	-
8	60	5	1	76	30	1	-
9	27	5	1	43	30	1	-
10	116	15	1	23	24	1	-
11	68	5	1	30	30	1	-

Vysvětlivky:

- ... nehodnoceno

1 ... ano

0 ... ne