

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Monika Krátká

**Účinky agonistů GABA_B receptorů na vývoj
motoriky laboratorního potkana**

Bakalářská práce

Praha 2015

Autor práce: **Monika Krátká**
Vedoucí práce: **Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.**
Oponent práce: **RNDr. Karel Valeš, PhD.**
Datum obhajoby: **2015**

Bibliografický záznam

KRÁTKÁ, Monika. *Účinky agonistů GABA_B receptorů na vývoj motoriky laboratorního potkana*. Praha, 2015. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství. 66 s. Vedoucí práce Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Anotace

Bakalářská práce je v prvé řadě rešeršní, takže práce podá přehled účinků baclofenu a SKF97541 (agonista GABA_B receptorů 10x účinnější než baclofen) na motoriku potkanů. Rešerše bude zaměřena nejenom na výsledky získané na dospělých zvířatech, ale hlavně na vývojové práce. Součástí bakalářské práce bude i pilotní skupina laboratorních potkanů, kterým budou agonisté GABA_B receptorů podáváni denně od 7. do 11. dne po narození. Tato zvířata budou opakovaně testována baterií testů přiměřených pro jednotlivá věková stadia mláďat potkanů.

Klíčová slova

GABA_B receptor, baclofen, agonista GABA_B receptoru, motorický vývoj, vývoj potkana, motorické testy, spasticita

Annotation

This bachelor's work is on the first place research, therefore the main target is to show the overview of effects of "Baclofen" and "SKF97541" (antagonist GABA_B receptors which effect is 10 times potent when compared with "Baclofen"). The research will be focused on not only on results obtained by examination of adult animals but mainly on the results gained from examination of young rat during their development. Moreover, a pilot group of animals, who will be administer with GABA_B receptor antagonists daily from 7th to 11th day after born, will be observed as well. All these animals will be tested by a set of tests appropriate for each age stage of rat pups.

Keywords

GABA_B receptor, baclofen, GABA_B receptor agonist, locomotor development, development of rat, motor skill tests, spasticity

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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, dne 24.4.2015

Monika Krátká

Poděkování

Mnohokrát děkuji panu profesoru MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za odborné vedení, rady a trpělivou pomoc při psaní a realizaci výzkumné části této bakalářské práce.

Dále děkuji paní RNDr. Anně Mikulecké, PhD. za cenné připomínky a rady vztahující se k testům prováděným v behaviorální laboratoři.

Můj dík také Fyziologického ústavu AV ČR, který mi poskytl veškeré zázemí, bez kterého by se výzkumná část neobešla.

Zároveň bych chtěla poděkovat všem členům rodiny, jež mě při psaní této práce trpělivě podporovali.

SEZNAM ZKRATEK

- 3-APHPA - kyselina 3-aminopropyl(hexyl)fosfinická
- 3-APPA - kyselina 3-aminopropylfosfinická
- A - kontrolní skupina
- AVČR - Akademie věd České republiky (veřejná výzkumná instituce)
- B - skupina ovlivněná baclofenem
- C - skupina ovlivněna CGP 35348
- Ca²⁺ - ion vápníku
- CGP 13501 - 3,5-*bis* (1,1-dimethylethyl)-4-hydroxy- α,α -dimethylbenzenepropanal
- CGP 35348 - kyselina 3-aminopropyl(diethoxymethyl)fosfinická
- Cl⁻ - ion chloru
- CNS - centrální nervová soustava
- DMO - dětská mozková obrna
- GABA - kyselina gamma-aminomáslená
- GABA_A - jeden ze tří typů receptoru, jehož ligandem je kyselina gamma-aminomáslená
- GABA_B - jeden ze tří typů receptoru, jehož ligandem je kyselina gamma-aminomáslená
- GABA_C - jeden ze tří typů receptoru, jehož ligandem je kyselina gamma-aminomáslená
- GABA_BR1 - jedna ze dvou podjednotek GABA_B receptoru
- GABA_BR1_a - jedna ze dvou variant podjednotky GABA_BR1
- GABA_BR1_b - jedna ze dvou variant GABA_BR1
- GABA_BR2 - jedna ze dvou podjednotek GABA_B receptoru
- GAD - glutamát-dekarboxyláza
- GTP - guanosintrifosát
- IPSP - inhibiční postsynaptický potenciál
- K⁻ - ion draslíku
- NS - nervová soustava
- P - postnatální den laboratorního potkana, např. P1 = den, ve kterém mládě dosáhlo věku 1 den
- PNS - periferní nervová soustava
- SK&F 97541 - kyselina 3-aminopropyl(methyl)fosfinická

Obsah

ÚVOD.....	8
1 PŘEHLED POZNATKŮ	10
1.1 Potkan jako laboratorní zvíře	10
1.1.1 Historie.....	10
1.1.2 Důvody užití potkana jako laboratorního zvířete.....	10
1.1.3 Motorický vývoj	11
1.1.4 Srovnání vývoje potkana a člověka	12
1.1.5 Srovnání stáří potkana a člověka	13
1.1.6 Motorické testy	16
1.2 GABA receptory	17
1.2.1 GABA _A a GABA _C receptory	17
1.2.2 GABA _B receptory.....	17
1.2.2.1 Struktura	18
1.2.2.2 Mechanismus působení.....	18
1.2.2.3 Klinické účinky.....	19
1.3 Agonisté GABA _B receptorů	19
1.3.1 GABA.....	20
1.3.2 Baclofen.....	21
1.3.2.1 Chemická struktura.....	21
1.3.2.2 Mechanismus účinku.....	22
1.3.3 SK&F 97541.....	22
1.4 Antagonisté GABA _B receptorů	22
1.5 Klinické využití ovlivnění GABA _B receptorů	23
1.5.1 Spasticita	24
1.6 Klinické využití baclofenu	24
1.6.1 Orální způsob podání	25
1.6.2 Intratekální způsob podání (ITB)	25
1.6.3 Léčba a stáří pacienta	26
1.6.4 Léčba hypertonie u kojenců.....	26
1.6.5 Baclofen a abstinenční příznaky u novorozenců a dospělých	27
2 CÍLE A HYPOTÉZY	29
3 METODIKA.....	30
3.1 Testované skupiny.....	30
3.2 Dávky, příprava a aplikace látek	30
3.3 Výběr zvířat.....	31
3.4 Průběh a podmínky testování	31
3.5 Výběr motorických testů	31
3.5.1 Open field	32
3.5.2 Righting test.....	32
3.5.3 Nakloněná rovina	32
3.5.4 Hrazda	33
3.5.5 Lano.....	33
3.5.6 Pravidelný horizontální žebřík	34

3.5.7 Nepravidelný horizontální žebřík	34
3.5.8 Seskok s volbou.....	35
4 VÝSLEDKY	36
4.1 Open field.....	36
4.1.1 Vzdálenost	36
4.1.2 Maximální rychlost.....	36
4.2 Righting test	38
4.3 Negativní geotaxe.....	38
4.4 Hrazda	38
4.4.1 Čas.....	39
4.4.2 Přitažení zadních končetin	39
4.5 Lano.....	40
4.5.1 Čas.....	40
4.5.2 Otočení hlavou nahoru	40
4.6 Pravidelný horizontální žebřík	41
4.6.1 Čas (přejití celého žebříku)	41
4.6.2 Chyby.....	41
4.6.3 Přejití celého žebříku.....	41
4.7 Nepravidelný horizontální žebřík.....	43
4.7.1 Čas (přejití celého žebříku)	43
4.7.2 Chyby.....	43
4.7.3 Přejití celého žebříku.....	43
4.8 Seskok s volbou	45
4.8.1 Čas.....	45
4.8.2 Seskok do kotce se zvířaty.....	45
4.9 Testování hypotéz	47
5 DISKUSE.....	48
SOUHRN	53
REFERENČNÍ SEZNAM.....	55
SEZNAM PŘÍLOH.....	66
PŘÍLOHY	67

ÚVOD

GABA_B receptory, jejichž přirozeným agonistou je kyselina gamma-aminomáselná (GABA), se vyskytují v centrální a autonomní nervové soustavě. Po ovlivnění agonisty vykazují mnoho důležitých funkcí, mezi které patří antinociceptivní a antitusivní účinky, relaxace kosterního i hladkého svalstva a esofagálního sfinkteru, inhibice adenylát cyklázy a potlačení drogových závislostí. Antagonisté vykazují antidepressivní účinky a posílení kognitivních funkcí. Antiepileptický efekt vykazují antagonisté jenom v modelech epileptických absencí.

I přes tento výčet terapeuticky zajímavých efektů se v praxi nejčastěji využívá myorelaxační účinek zprostředkovaný jediným doposud klinicky dostupným agonistou, baclofenem. Tohoto se využívá u pacientů se spasticitou rozličného původu.

Baclofen je možné podávat dvěma způsoby, orálně či pomocí intrathekální pumpy, která látku dostane přímo na místo žádaného působení, tedy do míchy. S tím souvisí i nižší počet nežádoucích účinků, jelikož stačí menší množství než u orálního podání. V této studii je baclofen aplikován intraperitoneálně, což je shodné s orálním podáním v tom, že látka prochází játry.

Myorelaxačních účinků baclofenu je využíváno jak u dospělých tak u dětí. Nejnižší věk, kdy je baclofen indikován, jsou tři roky. Účinky v nižším věku nejsou příliš objasněny a v praxi využívány. To nejspíše pramení z faktu, že podle provedených studií byly zjištěny odlišné farmakologické účinky GABA_B receptorů ve zralém a nezralém mozku. Stejně tak GABA, jež je v centrální nervové soustavě známa jako hlavní inhibiční neurotransmitter, působí na nejčasnějších stadiích vývoje excitačně. Jaký mají ovšem tyto poznatky reálný dopad na vývoj jedince nebylo doposud objasněno a právě na tuto oblast se tato práce zaměřuje.

Kromě indikovaného působení baclofenu v rámci terapie spasticity může být jedinec vystaven přímému působení této látky již v intrauterinní fázi vývoje a to v případě, že ji matka užívá. Baclofen sice není kontraindikací těhotenství a dle dostupných kazuistik je jistá šance, že bude novorozenec bez následků působení této látky. Na druhou stranu ovšem existují zdokumentované případy poukazující na nezanedbatelný výskyt abstinenčních příznaků u novorozenců a to právě z důvodu intrauterinního působení baclofenu a jeho absenci po narození. Jediná zatím prokázaná terapie probíhá prostřednictvím opětovného podání baclofenu a to v pravidelných,

postupně se snižujících dávkách. Podle výše zmíněných kazuistik novorozenecké abstinční příznaky vymizí bez dalších následků. Zda ovšem toto ovlivní motorický vývoj jedince, není prokázáno.

Potkan jako laboratorní zvíře byl vybrán z důvodu, že se jedná o jednoho z velmi mála živočichů, jehož nervový systém a jeho vývoj je detailněji prozkoumán a u něhož se mláďata rodí ve více nezralém stádiu nervové soustavy než je tomu u člověka. To umožňuje ovlivnit mláďata brzy po narození a simulovat tak změny, ke kterým může u člověka dojít v prenatálním období. Dále, i přes některé odlišnosti mezi vývojem potkana a člověka, existuje mnoho podobného. V neposlední řadě je výhodou jeho ekonomická dostupnost.

Tato studie je zaměřena na ovlivnění motoriky prenatálním působením baclofenu a CGP 35348, což je antagonist GABA_B receptorů a to prostřednictvím opakované aplikace těchto látek a následného testování na laboratorních potkanech.

1 PŘEHLED POZNATKŮ

1.1 Potkan jako laboratorní zvíře

1.1.1 Historie

První důkazy o přítomnosti hlodavců pocházejí z Asie a Severní Ameriky a jsou datovány na stáří 54 milionů let (Meng et al., 1994). Rod *rattus* (krysa) byl poprvé zaznamenán před 5-6 miliony lety (Verneau et al., 1998) a to ve Středomoří, Asii a Austrálii (Krinke, 2000). Dnes nejrozšířenější zástupci tohoto rodu, *Rattus norvegicus* (potkan hnědý) a *Rattus rattus* (krysa obecná), pochází ze severní Asie a Mongolska a z Jižní Asie a Indie. Z těchto regionů se do ostatní části světa rozšířily v období Středověku (Krinke, 2000). *Rattus norvegicus* se poprvé vyskytl v Evropě nejpozději v 18. století (Krinke, 2000). Následující století byli různě zbarvení potkani *Rattus norvegicus* chytáni a především v období hladomoru prodáváni na jídlo či na Rat-baiting contests, speciální soutěže v lovu potkanů. Pro laboratorní práci byl potkan poprvé použit na začátku 19. století a jednalo se o albinotického *Rattus norvegicus* (*Rattus norvegicus* var. *alba*) – bylo to první domestikované zvíře chované výhradně pro laboratorní účely (Richter, 1954), přičemž právě z tohoto druhu byly vyšlechtěny dodnes nepoužívanější poddruhy laboratorních potkanů – Wistar, vyšlechtěn roku 1909 ve Wistar Institute, a Sprague Dawley (Krinke, 2000).

1.1.2 Důvody užití potkana jako laboratorního zvířete

Díky výše popsanému bohatému výskytu v různých částech světa a z toho plynoucího raného použití ve výzkumných pracích, se potkan stal nejprozkoumanějším a doposud nejlépe popsaným funkčním modelem systému savců, a tedy nejlépe zmapovaným laboratorním zvířetem. Zároveň je tento druh hlodavce dostupný ve velkém množství poddruhů s rozlišnými rysy. Z hlediska ekonomického je možné odchovat poměrně velké množství jedinců za nízké náklady (Krinke, 2000). Zároveň se potkani rodí v raném stádiu neuroontogeneze, což umožňuje pozorování a testování nezralých jedinců v postnatálním období. Mimoto je poměrně mnoho známo o vývoji jejich centrální nervové soustavy, míchy, descendentních drah a vývoji svalového aparátu (Gramsbergen, 1998).

Díky těmto ojedinělým přednostem je dnes potkan velmi cenným vědeckým objektem (Jacob et al., 1995) hojně používaným například v oblastech imunobiologie, experimentální medicíny zaměřenou na transplantaci, artritidu, diabetes mellitus obou typů či hypertenzi a samozřejmě v oblasti neurověd (Krinke, 2000). K laboratorním účelům se používají jak albinotičtí potkani, tak pigmentovaní (Sengupta, 2011).

1.1.3 Motorický vývoj

Vývoj potkana po narození, jak z hlediska motoriky, tak psychických a sociálních aspektů, je zásadní a nedílnou součástí studií zahrnujících testování na těchto zvířatech.

Podle Altmana a Sudarshana (1975) je vývoj lokomoce možno rozdělit do tří fází. Během prvního týdne je dominantní pivotování, které v druhém týdnu přechází do velmi nejisté a pomalé chůze a v průběhu třetího týdne zraje konečný vzor chůze a běh. V následujícím textu jsou detailněji popsány mezníky postnatálního vývoje potkana.

První týden: Během prvního týdne po narození nejsou mláďata schopna žádné výrazné lokomoce, končetiny jsou většinou natažené, volně ležící na podložce (Altman a Sudarshan, 1975). Již první den po narození je mládě při plavání schopno vzájemné koordinace mezi končetinami. Od 4. až 5. dne je možné pozorovat spontánní aktivitu předních končetin a od konce prvního týdne pivotování, tedy opakované pohyby předních končetin bez pomoci zadních (Altman a Sudarshan, 1975). Pivotování je považováno ze predominantní formu motorické aktivity v tomto věku (Altman a Sudarshan, 1975). Zároveň jsou zvířata v pronační poloze schopna zvednout hlavu nad podložku (Geisler et al., 1993). Dle Altmana a Sudarshana (1975) je toto možné nejdříve 8. den, přičemž během prvního týdne po narození zůstává ventrální strana těla zvířete na zemi.

Druhý týden: Okolo 8. dne je mládě schopné stát na všech čtyřech a uskutečnit pár kroků (Gramsbegren, 1998). Od 12. dne jsou zvířata schopna zvednout jednu z předních končetin, aniž by ztratila rovnováhu (Altman a Sudarshan, 1975) a od 12. – 13. dne se vyvíjí chůze, jež je pomalá a vrávoravá (Geisler et al., 1993). Ve dnech 14 – 15 zvířata otvírají oči (Altman a Sudarshan, 1975).

Třetí týden: Od 15. – 16. dne je chůze již plynulejší a její rychlost se zvyšuje. Vyvíjí se tak dospělý vzor chůze, přičemž pohyby hlavou, do té doby možné jen během stání, jsou přítomny i při chůzi (Gramsbegren, 1998). Hlava je zároveň držena nad podložkou minimálně po dobu tří minut (Altman a Sudarshan, 1975). Od 18. do 21. dne

postupně narůstá schopnost zvednout se na zadních končetinách (vztyčování) a kompletně dozrávají lokomoční schopnosti (Altman a Sudarshan, 1975).

Výše uvedené schopnosti ve spojení s věkem potkana platí v případě pohybu zvířete v "Open fieldu", tedy volném prostoru bez nutnosti vykonání jakéhokoli pohybu například z důvodu strachu či pocitu ohrožení. Ovšem při změněných podmínkách je možné vyvolat některé pohybové vzory již dříve (Altman a Sudarshan, 1975).

Motoneurony inervující u potkana posturální svaly, a velmi pravděpodobně to platí i pro člověka, jsou pomocí dendritů propojeny ve svazcích. Tyto dendrity začínají vytvářet zmíněné svazky v období, kdy se začíná vyvíjet dospělý vzor posturální kontroly. Z neurofyziologického hlediska jsou tato spojení zodpovědná za synchronní aktivitu motorických jednotek daného svalu inervovaných z odlišných míšních segmentů. Z toho vyplývá, že vývoj dospělého vzoru posturální kontroly v průběhu lokomoce závisí na stupni vývoje descendentních drah ze suprasegmentálních struktur (Grmasbergen, 1998).

1.1.4 Srovnání vývoje potkana a člověka

Na první pohled se může zdát, že vývoj potkana a člověka je poměrně odlišný a to díky velkým rozdílům v době trvání prenatálního a postnatálního vývoje (Vinay et al. 2005). Také podle Rice a Barona (2000) platí, že sled dějů a procesů odehrávajících se během vývoje je mezi živočišnými druhy srovnatelný, ovšem délka jejich průběhu se liší.

Konkrétně u hlodavců, a tedy i potkanů, probíhá vývoj jednotlivých částí mozku, jehož součástí je v obou případech synaptogeneze a myelinizace začínající ve stadiích embrya (Rice a Barone, 2000), řádově ve dnech, kdežto obdobný proces u člověka se odehrává v týdnech až měsících, přičemž jak již výše zmíněno, sled těchto změn je u člověka a potkana velmi podobný (Rice a Barone, 2000). Podle Vinay et al. (2005) je možné pozorovat nápadné podobnosti v postnatálním motorickém vývoji, když porovnáme vývoj potkana ve dnech a vývoj člověka v měsících. Dále se u obou živočichů vývoj centrální nervové soustavy odehrává ve směru rostrokaudálním (kraniokaudálním) (Rice a Barone, 2000) a od proximálních struktur směrem k distálním (Rice a Barone, 2000; Vinay et al., 2005). Další podobnost je patrná v nezralosti motorických funkcí v době narození (Vinay et al., 2005). Naopak mezi větší odlišnosti mezi potkanem a člověkem patří velikost a struktura mozkové tkáně. První

jmenování mají hladkou, lisencefalickou, mozkovou tkáň s méně zastoupeným neocortexem, kdežto mozek člověka tvoří záhyby, tkáň je tedy gyrencefalická, což pramení z naopak fylogeneticky velké expanze neocortexu (Rice a Barone, 2000).

Je také důležité poznamenat, že fyziologická přestavba a změny nervového systému, jež jsou závislé na zevních stimulech a vlivech a genetických předpokladech, pokračují i v průběhu dospělosti a jsou označovány pojmem nervová plasticita (Rice a Barone, 2000).

Výše zmíněný časový poměr dle Vinay et al. (2005), který je možný aplikovat na srovnání postnatálního motorického vývoje, ovšem nelze využít v případě prenatalního zrání centrální nervové soustavy (Vinay et al, 2005). V tomto případě je třeba použít jiný model, podle kterého první postnatální týden potkana, který je zásadní pro sestup descendentních drah do lumbální oblasti a v kterém se odehrává velká část vývoje posturální kontroly (Altman a Sudarshan, 1975), koresponduje se stářím čtyř měsíců lidského plodu (Clancy et al., 2001). Vývoj sestupných drah je u potkana ukončen na konci druhého týdne (Vinay et al., 2005)

Na základě výše uvedených údajů je možné shrnout, že ač se vývoj člověka a potkana v některých ohledech liší, při bližším prozkoumání jsou patrné významné podobnosti, a to především v jednotlivých procesech vývoje a jejich průběhu. Aby se medicína a s ní související nelékařské obory mohly kontinuálně vyvíjet, je třeba převést aktuální teoretické znalosti do praxe. V některých případech je toto ovšem příliš rizikové na to, aby dané postupy mohly být aplikovány rovnou na člověka. Proto je třeba jiný způsob, jak prověřit jejich bezpečnost a efektivitu. Zároveň v některých zkoumaných oblastech, u kterých byl doposud proveden nedostatečný počet studií, je možné se pouze domnívat, že výsledky zjištěné u zvířat budou platit i u lidí. Je tedy zapotřebí nových studií, které nebudou důležité pouze pro jejich výsledky, ale mohou zároveň fungovat jako platné zdroje pro další, na ně navazující testování.

1.1.5 Srovnání stáří potkana a člověka

Pro vědecké účely je velmi podstatné znát a respektovat korelaci věku potkana s věkem člověka. Bylo by snadné porovnat průměrnou očekávanou délku života laboratorního potkana, jež činí 3 až 4 roky, a člověka, která je na světové úrovni 66,7 let, a tímto poměrem se řídit nehledě na období života, v němž se daný jedinec nachází. Jelikož se ovšem korelace stáří těchto dvou živočichů v různých částech života a vývoje liší, není možné výše uvedené srovnání aplikovat (Sengupta, 2011).

Pro porovnání vztahu stáří potkana ke stáří člověka existují různé metody. Některé studie použily například váhu oční čočky se snahou využít jejího vývoje v průběhu savčího života (Hardy et al., 1983). U této metody je ovšem nutné počítat s přesností 3 až 4 měsíce, čímž se tato technika stává nedostatečnou pro stanovení přesného věku zvířete (Sengupta, 2011). Dále existují metody založené na měření váhy stoliček (Pankakoski, 1980), zaznamenávání počtu vrstev v tibií (Broughton et al., 2002) či muskuloskeletální růst (Kahana et al., 2003). Ovšem ani jedna z uvedených technik není sama o sobě přesná, je tedy třeba kombinace několika z nich (Sengupta, 2013).

Narození a dětství: Váha potkana těsně po narození je 5 – 6 g (Baker et al., 1979). Průměrný dospělý samec Sprague-Dawley váží 550 g (Harlan, 2005). Z toho plyne, že porodní váha potkana je přibližně 1 % jeho váhy v dospělosti. Porodní váha člověka je průměrně 2,7 kg. Průměrný dospělý muž pak váží okolo 82 kg. Procentuální zastoupení váhy dospělého jedince je při porodu 3 %. Romijn et. al (1991) pomocí rozličných metod měření určili, že cerebrální cortex donošeného novorozence je nejvíce podobný potkanovi starého 12 – 13 dnů. Pokud porovnáme váhu takto starého zvířete, jež činí přibližně 20 g (Romjin et al., 1991), dojdeme k závěru, že hmotnost takto starého mláděte tvoří 3,6 % jeho hmotnosti v dospělosti. Z toho lze odvodit, že za novorozeného potkana je možné považovat mládě teprve ve věku 12 dnů. Oněch prvních 12 dnů se tak rovná pozdní fázi těhotenství u člověka. Za tohoto předpokladu by se tedy mělo od předpokládané délky života potkana odečíst 12 dnů. Při porovnání stáří pak dostaneme, že 13,8 dne potkana = 1 rok člověka (Quinn, 2005).

Odstavení: Odvykání si od mateřského mléka a přechod na pevnou stravu probíhá u potkana ve stáří 3 týdnů (Baker, 1979) u člověka pak přibližně v 6 měsících. Jelikož mláďata potkana začínají pít mléko téměř ihned po porodu, není v tomto případě třeba odečítat oněch 12 dnů, o které je potkan "napřed" ve vývoji mozkové kůry, stejně tak jako v poměru porodní a očekávané hmotnosti v dospělosti ve srovnání s člověkem. V tomto období je tedy 42,2 dnů potkana = 1 rok člověka (Quinn, 2005).

Puberta: Jedná se o období, kdy je poprvé tělo schopno reprodukce. Ve srovnání s člověkem, mají potkani krátké a zrychlené dětství, přičemž věk, kdy dochází u potkana k pubertě, se různí. V průměru je to 6. týden (Adams a Boice, 1983). U člověka k tomuto dochází v průměru ve 12,5. roce života. Pokud k tomuto bereme v úvahu výše zmíněný fakt, že potkani jsou "narozeni" až ve 12. den věku, platí: 3,3 dnů potkana = 1 rok člověka (Quinn, 2005).

Dospělost: Určit dospělost potkana na základě růstových chrupavek je problematické, jelikož není možné pozorovat úplnému uzavření štěrbin (Bland, 2000). Přesto ale dochází k jejich zúžení, a to ve stáří 7 měsíců (Harlan, 2005). U člověka se štěrbinu epifýz uzavírají přibližně ve stáří 20 let (Sengupta, 2005). Při porovnání pak dojdeme k závěru, že 10,5 dnů potkana = 1 rok člověka (Quinn, 2005). Na rozdíl od toho na základě pozorování chování potkana udávají McCutcheon a Marinelli (2009) již 8. postnatální týden jako období rané dospělosti potkana. V té době není však ještě dokončená puberta.

Stáří: Konec reprodukčního života u samic potkanů přichází v průměru v jednom roce (Durbin et al, 1966). Pokud toto porovnáme s příchodem menopauzy u žen, dostaneme: 11,8 dnů potkana = 1 rok člověka (Quinn, 2005). Při porovnávání období po tomto mezníku do předpokládané smrti, což činí v průměru u potkanů 14 měsíců a u člověka 29 let, dojdeme k závěru: 17,1 dnů potkana = 1 rok člověka (Quinn, 2005).

Celková délka života: 13,8 den potkana = 1 rok člověka

Odstavení (3. týden): 42,2 den potkana = 1 rok člověka

Prepubertální fáze (6. týden): 3,3 den potkana = 1 rok člověka

Adolescence (7. týden): 10,5 den potkana = 1 rok člověka

Dospělost (od 8. týdne): 11,8 den potkana = 1 rok člověka

Stáří (od 1. roku): 17,1 den potkana = 1 rok člověka

Průměr: 16,4 den potkana = 1 rok člověka

Shrnutí poměrů věku člověka a potkana je v jednotlivých fázích vývoje převzato a doplněno od Sengupta, 2011. V závorkách jsou jednotlivá stáří potkana, ve kterém dochází k daným mezníkům ve vývoji.

Jak plyne z výše uvedeného textu a shrnutí, pro srovnání stáří potkana a člověka je třeba znát jednotlivé fáze života obou živočichů a z toho plynoucí poměry, jež se během životních období značně mění. V žádném případě by se tedy potkani neměli brát jako zmenšený model člověka (Sengupta, 2011). Zároveň je třeba brát v potaz odlišnou rychlost vývoje mezi pohlavími jak u potkana, tak u člověka.

1.1.6 Motorické testy

Pro zhodnocení motorického vývoje potkana bylo vyvinuto množství speciálních testů, které zahrnují hodnocení neurologických reflexů a testy na motorickou koordinaci a aktivitu (Altman a Sudarshan, 1975). Jelikož existuje poměrně velké množství těchto testů, budou v následujícím textu popsány jen ty, které byly použity při studii. Průběh testů je popsán v kapitole "Metodika".

Z neurologických testů, které pomocí motorického projevu podávají informaci o stupni a stavu vývoje nervové soustavy (Woodworth et al., 2011), byly vybrány Righting test a test Negativní geotaxe. V prvním z jmenovaných se položí potkan do supinační polohy a měří se čas, za jak dlouho se otočí do pronační polohy. Tento test hodnotí vzpřimovací mechanismy, jež se u potkana objevují hned po narození a dále se vyvíjejí. Nejprve se mládě otáčí pomocí rotace hlavy, ve věku 13. až 14. dne je pak schopno se přetočit pomocí všech čtyř končetin. Ve chvíli, kdy se potkan koordinovaně otočí pomocí všech částí těla, lze u něj sledovat zralý vzor stoje a chůze (Altman a Sudarshan, 1975). Test Negativní geotaxe sleduje schopnost otočení zvířete o 180°, jež je položeno na nakloněnou rovinu (45°) hlavou dolů. První reakce se objevují již v 5. dni. U obou testů jsou rychlost a způsob provedení přímo úměrné věku zvířat. Tyto testy se používají při nižším věku jedinců, přičemž v naší studii mají za úkol potvrdit či vyvrátit fyziologický vývoj nervové soustavy potkana.

Test Hrazda, Horizontální pravidelný a nepravidelný žebřík a Lano spadají pod testy motorické koordinace. První uvedený se zaměřuje převážně na svalovou sílu, tedy jak dlouho jsou zvířata schopná se udržet předními končetinami na hrazdě. Dále se hodnotí, zda jsou schopna si dopomoci přitáhnutím zadních končetin. Toto lze spatřit poprvé ve stáří jedenácti dnů, ovšem u všech jedinců se toto objeví až 21. den (Altman a Sudarshan, 1975). Testy s pravidelným a nepravidelným žebříkem vypovídají o schopnosti koordinace. Hodnotí se čas, za jak dlouho zvíře přejde žebřík a případně počet chyb, tedy kolikrát šláplo mimo příčku. Nepravidelný žebřík klade na koordinaci větší nároky (Brooks a Dunnett, 2009). Test Lano je obdobně jako Hrazda zaměřený na svalovou sílu, kde se měří čas, po který se zvíře udrží na laně, a koordinaci. Ta je hodnocena na základě schopnosti otočit se na laně hlavou nahoru a poprvé se objevuje ve stáří sedmnácti dnů. 21. den jsou tohoto schopna všechna zvířata (Altman a Sudarshan, 1975).

Motorickou aktivitu lze nejlépe hodnotit pomocí testu Open field. Zvíře je dáno doprostřed ohraničeném prostoru a ponecháno zde po dobu 5 minut. Pozoruje se způsob

a množství pohybové aktivity (Brooks a Dunnett, 2009). V této studii se měřila ušlá vzdálenost a maximální naměřená rychlost lokomoce a toto porovnávalo mezi testovanými skupiny pro odhalení případných odchylek.

1.2 GABA receptory

GABA receptory jsou skupina receptorů, jejichž ligandem je GABA (kyselina γ -aminomáselná, γ -aminobutric acid) (Watanabe, 2002).

Byly popsány tři typy GABA receptorů: GABA_A, GABA_B a GABA_C. Receptory GABA_A a GABA_B jsou široce rozšířené v CNS, kdežto GABA_C se nachází u dospělých obratlovců téměř výhradně v sítnici (Ganong, 2005).

GABA receptory představují z klinického hlediska velmi důležitou součást nervového systému. Jejich dysfunkce v centrální nervové soustavě může být podkladem vážných nervových onemocnění. Hypokativita GABAergního systému může například způsobit epilepsii, spasticitu, úzkostné stavy, poruchy spánku, deprese, závislost a bolest (Bettler et al., 2004). Naopak hyperaktivita se pojí se schizofrenií (Benes a Beretta, 2001).

1.2.1 GABA_A a GABA_C receptory

Receptory GABA_A i GABA_C patří do skupiny iontových kanálů a zprostředkovávají rychlý inhibiční účinek GABA (Bowery a Smart, 2006).

GABA_A receptory se skládají z pěti podjednotek (Bowery a Smart, 2006) umístěných kolem póru. V případě aktivace dojde ke zvýšení vodivosti membrány pro Cl⁻ (Melcangic a Bowery, 1996; Ganong, 2005). Hrají klíčovou roli v regulaci excitability mozku a zároveň obsahují vazebná místa pro několik klinicky významných látek včetně benzodiazepinů, barbiturátů a neuroaktivních steroidů (Watanabe, 2002), jež mohou funkci těchto receptorů alostericky modifikovat (Melcangic a Bowery, 1996).

1.2.2 GABA_B receptory

GABA_B receptory jsou metabotropní receptory lišící se od GABA_A receptorů v mnoha ohledech (Kerr a Ong, 1995).

V roce 1980 Bowery et al. (1980) zjistili, že existují GABA receptory, jež reagují na bicucullin či baclofen jinak, než tomu bylo doposud u GABA receptorů

známo. V roce 1981 pak pro odlišení dostali jméno GABA_B (Hill a Bowery, 1981). Byly definovány jako bicuculin insenzitivní GABA receptory (Bowery, 2002). Fakt, že GABA_B receptory nejsou senzitivní k bicuculinu na definici ovšem nestačí, protože stejně tak GABA_C receptory na tuto látku nereagují, ty jsou ovšem zároveň insenzitivní k baclofenu (Johnston, 1986). Dle nejvhodnější definice GABA_B receptorů se tedy jedná o skupinu bicuculin insenzitivních GABA receptorů, pro které je baclofen specifickým agonistou a 2-hydroxy-saclofen specifickým antagonistou (Kerr a Ong, 1995).

GABA_B receptory se nacházejí jak v centrálním a periferním nervovém systému tak mimo něj. V rámci CNS se vyskytují v hojném zastoupení, především pak v mozečku a jeho Purkyňových buňkách a paralelních vláknech (Martinelli at al., 1992) a dále v jádrech thalamu, mozkové kůře a v zadním rohu míšním. Hustota zastoupení ovšem nemusí korelovat s jejich fyziologickou důležitostí (Bowery, 2010).

1.2.2.1 Struktura

GABA_B receptory patří do skupiny GPCRs - G protein coupled receptors, G protein vázající receptory (Kerr a Ong, 1995). Jedná se o heterodimery sestávající ze dvou odlišných podjednotek - GABA_BR1 a GABA_BR2 (Bowery, 2006), jež jsou na svých C-koncích spojeny coiled-coil strukturami (Bowery et al., 2002). Podjednotka GABA_BR1 existuje ve dvou variantách - GABA_BR1_a a GABA_BR1_b (Kerr a Ong, 1995).

GABA_BR1 a GABA_BR2 na sobě funkčně závisí, zároveň však zprostředkovávají v mnoha ohledech odlišné procesy (Bowery, 2006; Robbins et al., 2001). Podle Boweriho et al. (2002) je jejich existence nadále průběžně zkoumána, přičemž prozatím nebyly stanoveny žádné jedinečné farmaceutické či funkční vlastnosti některé z nich. Na rozdíl od toho dle Robbinse et al. (2001) obsahuje GABA_BR1 vazebná místa pro agonisty a antagonisty GABA_B receptoru, zatímco GABA_BR2 umožňuje navázání G proteinu a hraje hlavní roli v dopravení GABA_BR1 na povrch buňky čímž se stává klíčovou pro navázání GABA (Robbins et al., 2001). Dále zahrnuje místo pro alosterickou modulaci (Bowery, 2010).

1.2.2.2 Mechanismus působení

GABA_B receptory mají schopnost na sebe navázat G protein (guanin nukleotid-dependentní protein) (Kerr a Ong, 1995), jehož prostřednictvím pak probíhá komunikace s výkonnými proteiny (Rodbell et al. 1971).

V tomto systému se nejprve naváže agonista na receptor na povrchu buňky, tím se receptor aktivuje a prostřednictvím jeho podjednotek se intracelulárně uvolní a rozštěpí GTP (guanosintrifosát). Oddělené části aktivují GTP vázající proteiny a ty následně regulují aktivitu G proteinů, které zde hrají roli druhého posla. Na konci této kaskády se změni propustnost draslíkových nebo vápníkových kanálů (Rodbell et al., 1980).

GABA_B receptory se nachází jak presynapticky tak postsynapticky. První jmenované se vyskytují častěji (Bowery, 2010) a slouží jako autoreceptory a heteroreceptory ovlivňující uvolnění neurotransmiterů pomocí snížení vodivosti pro Ca²⁺. Druhé jmenované, postsynaptické receptory, svou aktivitou zvýší na membráně vodivost pro K⁺ ionty a následkem toho dojde k hyperpolarizaci (Bowery et al., 2001). Tato hyperpolarizace zprostředkovává dlouhotrvající inhibiční postsynaptický potenciál (IPSP), jež byly evidovány v centrální nervové soustavě (Kerr a Ong, 1995). Po aktivaci GABA_B receptorů, můžeme tedy očekávat výskyt rozličných reakcí jako důsledek inhibice uvolňování transmiterů a/nebo hyperpolarizace neuronu (Bowery, 2006).

1.2.2.3 Klinické účinky

Před více než třiceti lety byly GABA_B receptory poprvé popsány u savců. Od té doby se zjistilo mnohé o jejich fyziologické roli v nervové soustavě savců (Bowery, 2010).

GABA_B receptory se svojí aktivitou mohou podílet na řízení svalového napětí, nocicepce, kognitivních funkcí, příjmu potravy a sytosti, kontroly krevního tlaku, funkcí plic a gastrointestinálního traktu a dále na výskytu epilepsie, afektivních stavech a drogových závislostí (Bowery, 2010).

1.3 Agonisté GABA_B receptorů

Mezi agonisty patří takové látky, jež se vážou na daný receptor a aktivují jeho biologickou odpověď (Tocris, 2015). Agonista GABA_B receptorů, jež se vyskytuje přirozeně je kyselina gamma-aminomáslená (GABA) (Bowery et al., 2006). Dalšími agonisty těchto receptorů jsou baclofen, 3-APPA, 3-APMPA (Bowery, 2010) a SK&F 97541 (Seabrook et al., 1990).

1.3.1 GABA

Jedná se o ligand GABA_A, GABA_B a GABA_C receptorů. Je tedy pokládána za multifunkční molekulu, jež má odlišné funkce v centrálním a periferním nervovém systému a v některých dalších tkáních mimo tento systém (Watanabe, 2002). Především je pak považována za hlavní inhibiční neurotransmitter CNS savců, kde je pravděpodobně zodpovědná za více než 40 % všech inhibičních procesů. Je získávána pomocí Krebsova cyklu a enzymu glutamát-dekarboxylázy (GAD). Je skladována ve váčcích nervových zakončení, jež ji na základě patřičného stimulu a následného vzestupu Ca²⁺ uvolní (Melcangic a Bowery 1996).

Na základě skutečnosti, že ve většině případů je elektrochemický potenciál Cl⁻ v neuronech nižší než v extracelulárním prostředí je chápána jako hlavní inhibiční neurotransmitter obratlovců. Když se GABA naváže na GABA_A receptory, otevřou se Cl⁻ kanály, což umožní tok tohoto iontu do nervové buňky. Dojde k hyperpolarizaci membrány neuronu, což sníží jeho excitabilitu, tedy reaktivitu na excitační neurotransmitery (Watanabe, 2002). Pokud je ale potenciál Cl⁻ intracelulárně vyšší než extracelulárně, elektrochemický gradient "vytlačí" tyto ionty ven z buňky, což zapříčiní depolarizaci membránového potenciálu (Sieghart, 1995). V tomto případě působí GABA jako neurotransmitter excitační. Toto platí pro neonatální neurony, kde je gradient Cl⁻ opačný než v neuronech vyspělého jedince. Aktivace GABA_A receptorů tedy v tomto případě vede k depolarizaci (Bureau et al., 1999) a působí tak jako neurotransmitter excitační (Ganguly et al., 2001).

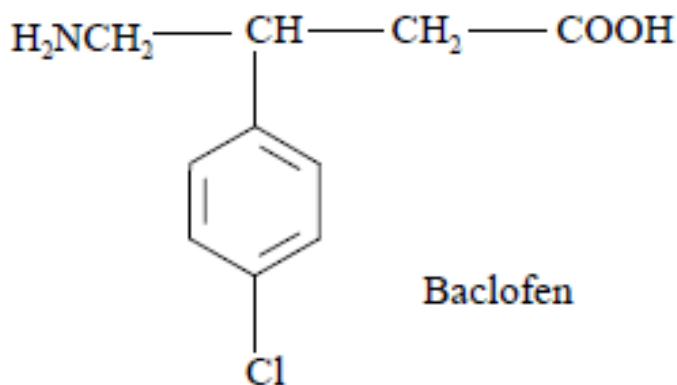
Jak je již výše zmíněno, GABA je syntetizována z glutamátu pomocí enzymu glutamát dekarboxylázy (GAD), v některých situacích jsou ovšem použity i jiné způsoby syntézy (Watanabe, 2002). Biosyntéza glutamátu v mozku je úzce spojena s metabolismem glukózy. Mozková tkáň je od cévního systému oddělena hematoencefalickou bariérou, a ačkoliv glukóza a esenciální aminokyseliny a jejich prekurzory mohou přes tuto bariéru projít díky specifickým transportérům, pro glutamát a jeho prekurzor glutamin je tato bariéra nepropustná. Z tohoto důvodu je glutamát v mozku syntetizován z glukózy. Je zajímavé, že právě glutamát, důležitý excitační neurotransmitter, je prekurzorem GABA, která je u dospělého jedince neurotransmitter inhibiční (Watanabe, 2002).

1.3.2 Baclofen

V sedmdesátých letech byl i přes minimální poznatky v mechanismu působení poprvé prokázán klinicky významný efekt agonisty GABA_B receptorů, baclofenu, a to v léčbě spasticity způsobenou jak roztroušenou sklerózou tak, a to především, traumatickou lézí (Birkmayer, 1972). Od té doby se poznatky o možném využití ovlivnění GABA_B receptorů rozšířily i do dalších oblastí klinické praxe zahrnující nejen kontrolu motorických funkcí, ale i funkcí kognitivních či do oblastí autonomního nervového systému (Kerr a Ong, 1995).

1.3.2.1 Chemická struktura

Baclofen - (gamma-amino-beta-(p-chlorophenyl) butyric acid, beta p-chlorophenyl-GABA) - je lipofilní (Bowery, 1993) derivát kyseliny γ -aminomáselné, jehož sumární vzorec je C₁₀H₁₂ClNO₂ (NCIT, internetový zdroj). Jedná se o bílý krystalický prášek, většinou bez zápachu, rozpustný ve vodě.



Obr. 1 Chemická struktura baclofenu (převzato z Novartis, 2013)

Baclofen byl syntetizován v roce 1962 společností Ciba ve Švýcarsku, konkrétně Heinrichem Keberlem, s cílem zvýšit lipofilní vlastnosti GABA a následně docílit jejího průchodu přes hematoencefalickou bariéru (Keberle et al., 1968), toto se sice nepodařilo docílit (Blacburn, 2010), zato byly následně zjištěny další významné účinky baclofenu. Existují dva optické izomery baclofenu: (S)-(+)-baclofen a (R)-(-)-baclofen (Blackburn, 2010).

1.3.2.2 Mechanismus účinku

Baclofen se váže na presynaptické GABA_B receptory, jež následně inhibují excitační neurotransmitery působící především na motoneurony v míše (Overgard et al., 2015; Mess et al., 2003). Toto má za následek klinicky nejvyužívanější efekt, a to snížení spasticity. Tato popsaná inhibice závisí na podaném množství a uskutečňuje se prostřednictvím snížení přesunu Ca²⁺ do buňky a K⁺ iontů z buňky (Dolphin a Scott, 1986). Další inhibiční účinky působí baclofen v mozkovém kmeni a na ostatních místech CNS (Ford et al., 1996) a PNS (Dolphin a Scott, 1986). Působení baclofenu pak shrnuje Dunlap a Fischbach (1981), podle kterých nabízí tato látka možnost, jak selektivně ovlivnit účast GABA_B receptorů na napěťově řízeném toku vápenatých iontů do buňky, což je součástí výše popsané presynaptické inhibice.

1.3.3 SK&F 97541

SK&F 97541 je agonista GABA_B receptorů, jež je 10krát účinnější než baclofen či 3-APPA (3-aminopropylphosphinic acid) (Seabrook et al., 1990). Tato látka byla syntetizována a následně pojmenována farmaceutickou firmou Eskayef Banglades Limited (Smith Kline & French), které nyní spadá pod Transcom Group (Eskayef Bangladesh, 2014). SK&F 97541 se v současnosti používá v preklinických studiích s cílem ozřejmit veškeré vlastnosti této látky.

1.4 Antagonisté GABA_B receptorů

Antagonista je látka, jež se váže na stejný receptor jako agonista, ovšem vyvolává jinou odpověď. Může se vázat buď na stejné či jiné vazebné místo jako agonista. V obou případech aktivaci daného receptoru agonistou buď znesnadní či zcela zablokuje (Tocris, 2015).

Mezi antagonisty GABA_B receptorů patří CGP 35348, 3-APHPA a phaclofen, přičemž první dva jmenované jsou zhruba 20krát účinnější než-li phaclofen (Seabrook et al., 1990). Firma Ciba Geigy syntetizovala celou řadu dalších antagonistů.

1.5 Klinické využití ovlivnění GABA_B receptorů

Existuje poměrně mnoho účinků, jež mohou GABA_B receptory pomocí svých ligandů zprostředkovat (Bowery, 2010). Dario et al. (2006) například prokázal u agonistů GABA_B receptorů řadu farmakologických efektů zahrnující centrálně řízenou myorelaxaci, snížení závislosti na kokainu a narkotických drogách, (...) stejně jako zlepšení synaptické plasticity. Velíšková et al. (1996) pak prokázala na věku a dávce závislé antikonzulzivní schopnosti baclofenu, stejně tak jako prokonzulzivní schopnosti CGP35348, a to díky přítomnosti rozdílných podjednotek GABA_B. Výčet možných účinků GABA_B receptorů po jejich ovlivnění je uveden v Příloze č. 1.

V klinické praxi je situace ovšem jiná. Ačkoliv existuje mnoho léčiv, mezi které patří například benzodiazepiny, jež centrálně aktivují GABA_A receptory, je k dispozici pouze jediná látka aktivující receptory GABA_B a tou je baclofen (Bowery, 2006), který představuje jednu z možných variant léčby spasticity (Štětkářová, 2012).

Předmětem zájmu v rámci ovlivnění GABA_B receptorů je také jejich pozitivní alosterická modulace, jež byla poprvé popsána Urwylerem et al. (2001). Probíhá pomocí modulátorů, látek zesilujících odpověď na GABA a baclofen, aniž by se projevovaly nežádoucí účinky (Bowery, 2010). Urwyler et al. (2005) prokázali, že látka CGP7930 [2,6-Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol] a jí příbuzná CGP13501 mají schopnost pozitivní alosterické modulace funkce GABA_B receptorů. Za přítomnosti GABA zesilují její účinky, ovšem samy o sobě žádný efekt nevykazují. Působí tedy jen v případě, že je přítomný endogenní agonista a proto mají větší fyziologický efekt než samotný agonista. Podle dalších studií se ukázalo, že CGP7930 zvyšuje afinitu agonisty, ale váže se na jiná vazebná místa (Urwyler et al., 2005), konkrétně na podjednotku GABA_BR2 (Bowery, 2010). Zjištění a popsání těchto schopností může do budoucna znamenat další způsob terapeutického využití GABAergního systému (Urwyler et al., 2005).

Zároveň je nutné zmínit, že podle Turgeona a Albina (1994) mají GABA_B receptory v nezralém mozku jiné farmaceutické účinky, než-li v mozku dospělého jedince a to z důvodu změn ve vazebných vlastnostech těchto receptorů během vývoje centrálního nervového systému.

1.5.1 Spasticita

Spasticita projevující se jako zvýšení tonického napívacího reflexu, závislého na rychlosti pasivního protažení (velocity-dependent) se zvýšenými svalovými reflexy (Kolář, 2009), je poměrně častým projevem postižení centrálního motoneuronu ať již v důsledku traumatu, ischemie, hemoragie, zánětu, degenerativního procesu či nádoru (Štětkářová, 2012).

Etiologie spasticity vychází z přerušení descendentních inhibičních drah a tím k hyperexcitabilitě periferního motoneuronu (Sheean, 2002). Jedna z možností léčby je zmíněné podávání baclofenu, látky působící stejně jako GABA na presynaptické GABA_B receptory, které se nachází mimo jiné v míše a mozku. Jejich aktivací dojde ke snížení vodivosti pro Ca²⁺, což způsobí snížení uvolňování excitačního neurotransmiteru (Davidoff, 1985; Bowery et al., 2001). Tento mechanismus lze využít především při generalizované spasticitě, která zasahuje více tělesných oblastí (Dimitrijevič, 2014).

Protože se projevy spasticity velmi liší, neexistuje žádný standardizovaný postup její léčby. Zároveň je však třeba, aby byla "evidence-based" a odvíjela se od stupně a lokalizace a zároveň od typu postižení (Shamsoddini, 2014).

1.6 Klinické využití baclofenu

Baclofen byl původně vyvinut jako antiepileptikum. Kýžený efekt na epilepsii se sice nepotvrdil, vyšetřovatelé si ovšem všimli, že u některých pacientů snižuje spasticitu (Hsieh a Penn, 2006). Je zajímavé, že na trh byl uveden v roce 1972 pod názvem Lioresal (Blacburn, 2010; Bowery, 1993), ovšem až v roce 1979 byla Bowerym et al. popsána jeho funkce jako agonisty GABA_B receptorů, jenž je stejně účinný jako GABA. Dále autoři již v této studii zmínili, že GABA_B receptory jsou pravděpodobně široce rozšířeny v neuronech periferních tkání. Také projevíli názor, že pokud jsou tyto receptory přítomny i v mozku, dal by se baclofen považovat za důležitou látku při jejich terapeutickém ovlivnění, což se do dnešní doby podařilo nepochybně potvrdit. V sedmdesátých letech byl také poprvé prokázán jeho klinicky nejvýznamnější efekt a to v léčbě spasticity (Hill a Bowery, 1981). Souhrn těchto a dalších klinických účinků baclofenu je zobrazen v Příloze č. 2.

Díky tedy dnes již prokázaným, centrálně zprostředkovaným myorelaxačním účinkům baclofenu, je možné tuto látku považovat za významné a v současnosti jediné

(Bettler et al., 2004) léčivo užívané při léčbě spasticity na podkladě poruchy mozku či míchy, (Bowery, 2010; Ganong, 2005) tedy spojené s dětskou mozkovou obrnou, roztroušenou mozkomíšní sklerózou, míšním traumatem (Hsieh a Penn, 2006; Bowery et al., 1993) a amyotrofickou laterální sklerózou (Bowery et al., 1993). Dále je užíván při léčbě dystonie a rigidity u stiff-man syndromu (Bettler et al., 2004).

Na druhé straně, terapie baclofenem nemá podle Dimitrijevičeva et al. (2014) dlouhotrvající účinky – pokud se podání této látky přeruší, stupeň spasticity se zhorší. Jistou nevýhodou také může být postupná zhoršená citlivost receptorů na tuto látku. Studie zkoumající efekt podání intratekálně podaného baklofenu (ITB) u dětí totiž mimo jiné ukazují, že u léčby probíhající několik let je dávka v průměru vyšší než u studií zahrnující léčbu jeden až jeden a půl roku dlouhou (Overgard et al., 2015).

Existují dva klinicky užívané způsoby podání. Buďto orální cestou v tabletách v množství 10 mg, 20 mg (NCIT, internetový zdroj), 25 mg (Novartis, 2013) či intratekálně injekčně 0,05 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml (NCIT, internetový zdroj).

1.6.1 Orální způsob podání

Orálně podaný baclofen prochází přes hematoencefalickou bariéru jen ve velmi omezeném množství, je tedy zapotřebí vysokých dávek. S tím je spojen poměrně vysoký výskyt nežádoucích účinků (Overgard et al., 2015). Mezi ně patří záchvaty, nevolnost, malátnost, závratě, hypotenze, svalová slabost, halucinace a zmatenost, jež jsou často stěžejně tolerovány (Bowery, 2010).

1.6.2 Intratekální způsob podání (ITB)

Na rozdíl od systémového podání ITB stačí přibližně 500 – 1 000 krát menší dávka (Brennan a Whittle, 2008). Podání přímo do míchy, tedy do oblasti působení, vyžaduje nižší dávku baclofenu, která je zároveň dostatečně nízká na to, aby se nedostala do systémového krevního oběhu, což zabrání vedlejším účinkům. Nízké množství podávané látky zároveň snižuje možnost výskytu tolerance na danou látku (Bowery, 2006). ITB tedy maximalizuje dávku působící na míšní GABA_B receptory a minimalizuje vedlejší účinky spojené s podáváním baclofenu orálně (Mess et al., 2003). Také podle Ganong (2005) a Kolář (2009) potvrzují účinnost baclofenové pumpy při léčbě spasticity.

Tento způsob ošetření spasticity pomocí ITB byl poprvé představen v roce 1984 (Penn a Kroin, 1984) a následně schválen v roce 1996 (Shamsoddini et al., 2014).

Způsob podání je uskutečněn kanylou zavedenou do peritoneální dutiny a napojenou na baclofenovou pumpu (Bowery, 2010). Pumpa musí být plněna jednou za jeden až šest měsíců podle dávky daného jedince a vydrží přibližně 5 let, poté musí být operativně vyměněna za novou (Dimitrijevič, 2014).

1.6.3 Léčba a stáří pacienta

Dle studie od S. Nomura et al. (2012) může být léčba ITB u dětí s dětskou mozkovou obrnou (DMO) započata již v předškolním věku či později a to i přesto že se spasticita začíná projevovat již v batolecím, respektive kojeneckém, období. V návaznosti na toto udává potřebu dalších studií zaměřených na ovlivnění vývoje motorických funkcí u člověka při aplikaci ITB v dětském věku.

Výsledky studií srovnávající vliv ITB na motorické funkce jedinců více věkových kategorií udávají, že jak u potkanů (Nomura et al, 2012), tak u lidí (Motta et al., 2010), je největší zlepšení dosaženo při podání u nižších věkových kategorií. V případě potkanů se jednalo o začátek léčby v P21 (tedy 21. den po narození), kde srovnávací skupina započala léčbu ITB od P35 (Nomura et al., 2012). U lidí se porovnávaly skupiny 4-7 let, 8-18 let a 19-29 let, kde u prvních dvou bylo dosaženo většího zlepšení (Motta et al., 2010).

Na základě studie Turgeona a Albina (1994) jsou vazebné schopnosti GABA_B receptorů specifické pro různý věk potkana a to v závislosti na synpatogenezi v rámci ontogeneze a stejně tak se během vývoje mění rozložení těchto receptorů v neocortexu. Vazebné schopnosti vzrůstají ihned po narození, vrcholu dosahují během prvních dvou týdnů života a následně se s dospíváním snižují. Tyto odlišnosti v průběhu postnatálního vývoje probíhají na základě změny hustoty vazebných míst spíše než na změně jejich afinity, přičemž jejich vazebná místa mohou mít v nezralém mozku odlišné farmakologické vlastnosti. Na základě výše uvedených zjištění Turgeon a Albin (1994) předpokládají, že GABA_B receptory hrají roli při vývoji CNS.

1.6.4 Léčba hypertonie u kojenců

Použití baclofenu u novorozenců bylo prozatím velmi málo zdokumentováno. Moran et al. (2005) popisují dva případy novorozeneckých dětí, u nichž bylo Apgar skóre 2 a 3, a 8 a 3 v první a páté minutě a u nichž byly přítomny záchvaty a zjištěna

hypertonie v obou případech na všech končetinách. Hypertonie byla měřena dle modifikované Ashworth škály (MAS).

V prvním případě byla 32. den věku hypertonie dle MAS 3 až 4 na všech končetinách, léčba baclofenem byla započata 36. den po porodu s dávkou 0,5 mg/kg/den. Hodnoty dle MAS se postupně zlepšovaly a dávka baclofenu byla navyšována do množství 1,5 mg/kg/den. Ve věku 4 měsíců byla MAS horních končetin 2 a dolních končetin 1. Novorozenec neměl po celou dobu žádné záchvaty či křeče.

Ve druhém případě byla v den narození MAS 2 na všech čtyřech končetinách. 24. den věku bylo indikováno podávání baclofenu dávkou 0,35 mg/kg/den, kdy bylo MAS 4 na pravé horní a obou dolních končetinách a MAS 3 na levé horní končetině. Dávka byla postupně zvyšována na 1,5 mg/kg/den. Ve věku čtyř měsíců byla hodnota MAS 1 na všech končetinách. Po celou dobu léčby nebyly přítomny záchvaty ani křeče.

U obou novorozenců bylo tedy zaznamenáno zlepšené řízení svalového napětí a pokles MAS. Žádné vedlejší účinky látky nebyly zaznamenány (Moran et al., 2005).

1.6.5 Baclofen a abstinenční příznaky u novorozenců a dospělých

Je známo, že u dospělých lidí způsobuje náhlé vysazení baclofenu abstinenční příznaky (Delhaas a Verhagen, 1992). Jak reagují děti a novorození na takovéto přerušování podávání baclofenu je v literatuře zaznamenáno již méně.

Podle dostupných informací od Delhaas a Verhagen (1992), získaných na základě kazuistiky těhotenství a porodu ženy užívající ITB, je nejenže těhotenství za tohoto způsobu léčby možné, ale zároveň se pod lékařským dohledem narodila zcela zdravá holčička bez abstinenčních příznaků. 29letá žena s lézí C6-7 dostávala baclofen pomocí intratekální pumpy o dávce 1 mg/den. V průběhu těhotenství byla dávka pro narůstající spasticitu a autonomní dysregulaci postupně zvyšována. Ve 35. týdnu gravidity, kdy dávka dosáhla 1,4 mg/den, se tyto příznaky staly již neúnosnými. Z tohoto důvodu byl ve stejném týdnu proveden císařský řez. Apgar skóre novorozeného byl 9 a 10 v první a páté minutě, přičemž pooperační spasticitu bylo nadále možné velmi dobře ošetřit (Delhaas a Verhagen, 1992).

V další kazuistice je popsán případ matky, u níž byl indikován intratekální baclofen na ošetření tetanu. Léčba byla úspěšná a matka porodila, ač předčasně, zdravé dítě (Engrand et al., 2001).

Situace u těhotných pacientek s indikovaným baclofenem podávaným orálně je jiná. Existuje několik málo dokladů o průběhu těhotenství, porodu a o zdraví dítěte,

jehož matka brala v těhotenství baclofen orálně. Dva případy popisují normální porodní a poporodní průběh po intrauterinním vystavení baclofenu v dávkách 25-30 mg/den (Wetherby et al. 2004; Goldkamp et al., 2011). V dalších třech případech je popsán komplikovaný poporodní průběh a to právě díky abstinčním příznakům u novorozence.

V jednom případě byla dávka matky 30 mg/den, jiná farmaka nebyla podávána. Dítě se narodilo 33. týden. Od 3. dne po porodu se začaly projevovat abstinční příznaky jako vysoko položený pláč, třes, hypertonie. Baclofen byl podáván od 3. do 6. dne s počínající dávkou 0,5 mg/den a konečnou 0,067 mg/den. 18. den bylo novorozeně propuštěno domů a to bez abnormálních neurologických příznaků. Žádné vedlejší účinky se neprojevíly (Duncan a Delvin, 2013).

Jiná pacientka, paraplegická matka, s dávkou 80 mg/den porodila novorozence s Apgar skóre 10 v první i páté minutě. Od 2. dne se začaly objevovat abnormální pohyby (zjištěno retrospektivně na základě výpovědi matky) a 7. den se projevíly generalizované záchvaty. 11. den po porodu byla podána první dávka baclofenu a to 1 mg/den. Třicet minut po podání doposud přítomné křeče přestaly. Dávka byla nadále postupně snižována a to do dvacátého pátého dne (Ratnayaka et al., 2001).

Ve třetím případě pacientka s dávkou 20 mg/den porodila císařským řezem a to ve 39. týdnu + 2. Novorozenec měl Apgar skóre 7 a 8 v první a páté minutě. V tomto případě bylo podávání baclofenu dopředu naplánováno. Poprvé byl podán bezprostředně po porodu a to v dávce 0,5 mg/den. Množství se postupně snižovalo a konečná dávka byla aplikována devátý den po narození. U novorozence nebyly pozorovány žádné abstinční příznaky či záchvaty, propuštěno bylo 16. den. Neurologické vyšetření v tento den a následně v 6. týdnu bylo v normě. (Moran et al., 2004)

V prvních dvou uvedených případech byly provedeny testy na vyloučení jiné příčiny abstinčních příznaků, než baclofenového původu. V obou případech byly tyto testy negativní (Duncan a Delvin, 2013; Ratnayaka et al., 2001).

2 CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem této práce bylo zjistit, zda perinatální ovlivnění GABA_B receptorů změni motorický vývoj mláďat laboratorního potkana, zda se tyto změny budou lišit u skupin s podávanými látkami a případně zda změna motoriky bude přetrvávat do dospělého věku. Byly testovány tři skupiny potkanů, dvě s aplikovanými látkami a jedna kontrolní, se kterou se tyto porovnávaly. Ovlivnění receptorů bylo docíleno aplikací agonisty a antagonisty těchto receptorů od 7. do 11. dne věku potkana. Jako agonista byl zvolen v současnosti klinicky užívaný baclofen, jako antagonistu látka CGP 35348. K následnému zhodnocení motorického vývoje byly použity vybrané motorické testy.

Hypotéza 1

H₀ Vývoj motoriky potkanů se po aplikaci baclofenu významně nezmění v porovnání s kontrolní skupinou.

H_A Vývoj motoriky potkanů se po aplikaci baclofenu významně změní alespoň v jednom z provedených motorických testů v porovnání s kontrolní skupinou.

Hypotéza 2

H₀ Vývoj motoriky potkanů se po aplikaci CGP 35348 významně nezmění v porovnání s kontrolní skupinou.

H_A Vývoj motoriky potkanů se po aplikaci CGP 35348 významně změní alespoň v jednom z provedených motorických testů v porovnání s kontrolní skupinou.

Hypotéza 3

H₀ Motorické deficity u potkanů ovlivněných aplikací baclofenu nepřetrvávají do rané dospělosti v žádném z motorických testů.

H_A Motorické deficity u potkanů ovlivněných aplikací baclofenu přetrvávají do rané dospělosti alespoň v jednom z motorických testů.

Hypotéza 4

H₀ Motorické deficity u potkanů ovlivněných aplikací CGP 35348 nepřetrvávají do rané dospělosti v žádném z motorických testů.

H_A Motorické deficity u potkanů ovlivněných aplikací CGP 35348 přetrvávají do rané dospělosti alespoň v jednom z motorických testů.

3 METODIKA

Studie zaměřená na postnatální vývoj motoriky laboratorního potkana po ovlivnění GABA_B receptorů mezi 7. a 11. dnem byla provedena ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České Republiky (AVČR). Celkový počet zvířat zavzatých do studie a rozdělených do tří skupin byl osmnáct. Testování proběhlo u každé skupiny sedmkrát v předem určené dny, ve stejnou denní dobu a stejným člověkem. Tato studie byla schválena Odbornou komisí Fyziologického ústavu ČAV a prováděna v souladu s vyhláškou k zákonu na ochranu zvířat proti týrání a směrnicemi Evropské komise číslo x.

3.1 Testované skupiny

Byly testovány tři skupiny zvířat. První, kontrolní, skupina devíti zvířat (dále jako skupina A) obdržela dávky fyziologického roztoku a to z důvodu, že obě podávané látky – baclofen a CGP 35348, byly zvířatům aplikovány práve ve fyziologickém roztoku. Druhé skupině (dále jako skupina B), jež obsahovala pět zvířat, byl aplikován baclofen. Třetí skupině (dále jako skupina C) čítající čtyři zvířata, byla podávána látka CGP 35348.

3.2 Dávky, příprava a aplikace látek

Obě podávané látky a fyziologický roztok byly aplikovány peritoneálně a to nikoliv injekční stříkačkou, ale mikroposunem tak, aby podávané množství bylo opravdu přesné. Peritoneální způsob podání je srovnatelný s orálním způsobem využívaným v klinické medicíně. Aplikace probíhaly jedenkrát denně od 7. do 11. dne věku zvířat. Agonista GABA_B receptorů, baclofen, byl podáván skupině B v dávce 3 mg/kg. Vybraný antagonist GABA_B receptorů, CGP 35348, byl injikován skupině C v množství 50 mg/kg. Dávky byly zvoleny na základě starších výsledků s ovlivněním modelových epileptických záchvatů, kde byly podprahové. Příprava baclofenu a CGP 35348 probíhala každý den bezprostředně před podáním, tak, aby podávaný roztok byl čerstvý. Injikovaný objem byl vždy 1 ml/kg. Kontrolní skupině byl aplikován fyziologický roztok, a to 1 ml/kg.

3.3 Výběr zvířat

Do studie bylo zahrnuto osmnáct albinotických samců laboratorního potkana kmene Wistar. Tento kmen potkana je jeden z nejpoužívanějších v oblasti laboratorního užití zvířat, a proto je k dispozici i ve zvěřinci Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Samci byli ke studii vybráni z důvodu, že samice potkana vykazují estrální cykly, během kterých se mění dráždivost CNS, což by bylo s touto studií neslučitelné.

3.4 Průběh a podmínky testování

Zvířata byla chována ve zvěřinci se stálou teplotou vzduchu $23 \pm 1^\circ\text{C}$ a s vlhkostí vzduchu $60 \pm 5\%$. Jednotlivé skupiny stejně starých samců byly vytvořeny z několika vrhů a to pátý den po narození, tedy v době, kdy lze s mláďaty nejdříve manipulovat. Ke každému novému vrhu byla přiřazena jedna samice. Mláďata byla odstavena od matky ve stáří 21 dnů. Zvířata pobývala v oddělených kotcích v různých početných skupinách a to dle stáří jedinců. Testovací laboratoř měla stálou teplotu vzduchu 24°C , klimatizaci a umělé osvětlení. Před každým testováním byla zvířata jednotlivě zvážena a tyto údaje následně zaznamenány. Testování probíhalo 12., 15., 18., 21., 25., 31. a 60. den věku zvířat a to vždy mezi druhou a pátou hodinou odpolední. Každé zvíře mělo jeden pokus na provedení testu.

3.5 Výběr motorických testů

Vybrané testy měly za cíl co nejpřesněji zhodnotit vývoj motoriky potkana a odhalit případné odchylky. Výběr byl proveden na základě jedné z největších studií zaměřených na postnatální vývoj lokomoce laboratorního potkana (Altman a Sudarshan, 1975). Tento výběr byl doplněn dalšíma dvěma testy použitými ve studii zkoumající vliv perinatální hypoxie na motorický vývoj laboratorního potkana (Vachovcová, 2012). Testy probíhaly vždy ve stejném, předem určeném, pořadí od těch méně náročných k náročnějším tak, aby došlo k co nejmenšímu ovlivnění výsledků únavou. Průběh testů byl následující: Open field, Righting test, Nakloněná rovina, Hrazda, Lano, Pravidelný a nepravidelný horizontální žebřík a Seskok s volbou. Jelikož jsou uvedené testy různě náročné a odpovídají tak různému stupni zralosti CNS byly prováděny v takových fázích vývoje, kdy už odpovídají motorickým schopnostem typickým pro daný věk. Zvířata byla testována vždy v totožném pořadí tak, aby měla vždy k dispozici stejný čas na odpočinek.

3.5.1 Open field

Tento test probíhal v zařízení připomínající velký, z vrchu otevřený čtvercový kotec z černých desek. Délka stran byla ve věku zvířat 15. až 31. dnů 50 cm a ve stáří 60. dnů 80 cm. Do tohoto zařízení bylo zvíře umístěno a pět minut ponecháno. Po celou dobu se pomocí kamery umístěné nad středem nahrávala aktivita zvířete. Následně pomocí programu Observer firmy Noldus byla vypočítána ušlá vzdálenost a maximální rychlost zvířete. Test byl prováděn 15. až 60. den věku.



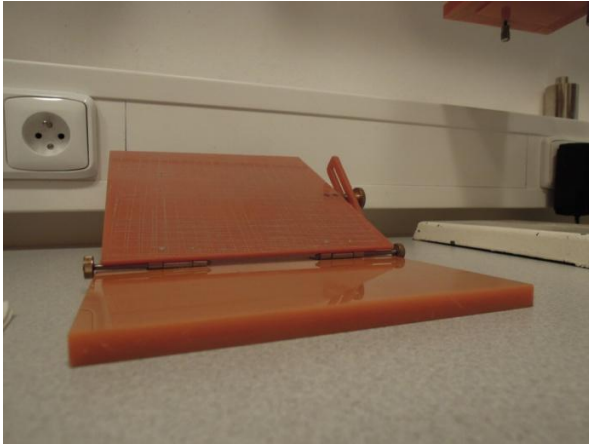
Obr. 1 Open field a příslušenství (archiv autora)

3.5.2 Righting test

Test byl prováděn na rovné a tvrdé ploše, kam bylo zvíře umístěno v supinační poloze. Měřila se doba, za kterou se otočilo do pronační polohy. Test byl prováděn 12. až 31. den.

3.5.3 Nakloněná rovina

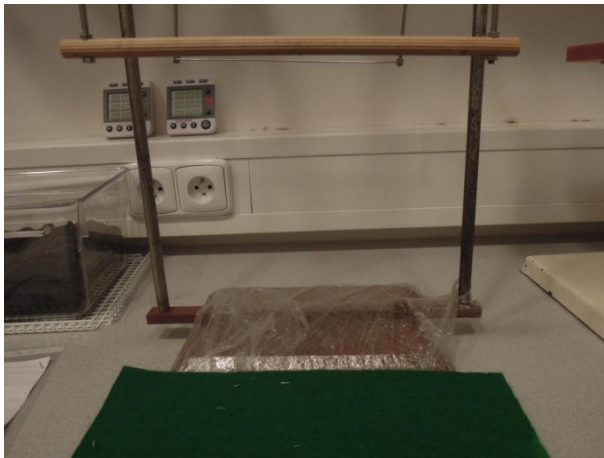
Test probíhal na 45° nakloněné plošině s mírně zdrsňelým povrchem tak, aby zvířata nesjížděla dolů. Zvíře se umístilo doprostřed plošiny hlavou směrem dolů a měřil se čas, za který se otočilo o 180°. Test byl prováděn 12. až 15. den, starší zvířata z nakloněné roviny aktivně slézala. (viz Obr. 2)



Obr. 2 Nakloněná rovina (archiv autora)

3.5.4 Hrazda

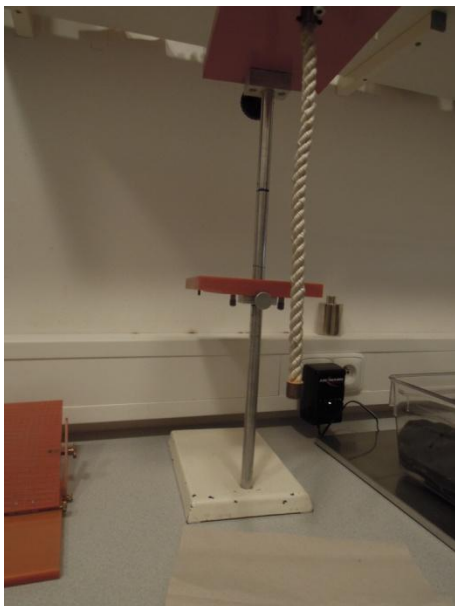
Zvíře bylo zavěšeno na horizontální 25 cm dlouhou dřevěnou hrazdu, která byla umístěna 25 cm nad podložku a měla kulatý průměr 1 cm. Měřila se doba, po kterou se zvíře udrželo na hrazdě. Zároveň se zaznamenávalo, zda se dostalo horní končetiny na hrazdu. Časový limit byl 120 sekund. Test byl prováděn 12. až 60. den. (viz Obr. 3)



Obr. 3 Hrazda (archiv autora)

3.5.5 Lano

Na lano zavěšené na platformě ve výšce 50 cm, spodním koncem 20 cm nad zemí a s průměrem 1 cm, bylo zavěšeno zvíře. Test byl prováděn 12. až 60. den, přičemž 12. a 15. den byla mláďata dána na lano hlavou nahoru a 18. až 60. den hlavou dolů. Časový limit byl 120 sekund. U druhé varianty se navíc zaznamenávalo, zda se zvíře otočilo hlavou nahoru. (viz Obr. 4)



Obr. 4 Lano (archiv autora)

3.5.6 Pravidelný horizontální žebřík

Test sestával z horizontálně umístěného žebříku z kovových příček umístěných 1 cm od sebe. Žebřík byl lemován průhledným plexisklem tak, aby zvířata nemohla spadnout případně seskočit. Na každém konci byl umístěn kotec 4 cm od konce žebříku směrem k jeho středu. Na straně, kde zvíře začínalo, byl kotec prázdný. Na straně opačné pak byli sourozenci, aby mělo testované zvíře motivaci žebřík přejít. Měřil se čas, za který zvíře přešlo celý případně část žebříku. Časový limit byl 120 sekund. Dále se zaznamenával jednak počet chyb, tedy počet došlápnutí mimo příčku a dále, zda zvíře přešlo žebřík až na druhý konec. Test byl prováděn 18. až 60. den.

3.5.7 Nepravidelný horizontální žebřík

Test sestával ze stejných pomůcek jako test Pravidelný horizontální žebřík. Jediný rozdíl byl v nepravidelnosti kovových příček, jež byly v tomto případě umístěny ve vzdálenostech 0,5, 1 a 1,5 cm, které se nepravidelně střídaly. Měřil se čas, za který zvíře přešlo celý případně část žebříku. Časový limit byl 120 sekund. Dále se zaznamenával jednak počet chyb, tedy počet došlápnutí mimo příčku a dále, zda zvíře přešlo žebřík až na druhý konec. Test byl prováděn 21. až 60. den.

3.5.8 Seskok s volbou

Test byl prováděn pomocí plošiny umístěné ve výšce 25 cm mezi dvěma kotci jedním prázdným a druhým s ostatními zvířaty testované skupiny. Zvíře se umístilo doprostřed této platformy a měřila se doba, za kterou se zvíře rozhodlo dobrovolně sesunout (v mladším věku) či aktivně seskočit do jednoho z kotců. Zároveň se zaznamenávalo, pro který kotec se zvíře rozhodlo. (viz Obr. 5)



Obr. 5 Seskok s volbou (archiv autora)

3.6 Statistické zpracování dat

Naměřená data byla zpracována pomocí statistického softwaru SigmaStat kde prošla deskriptivní statistikou. Následně pak byly vyhodnoceny výsledky a to pomocí t-testu v případě srovnávání dvou různých hodnot nebo pomocí jednosměrné analýzy rozptylu One way ANOVA v případě zjišťování signifikantní odlišnosti hodnot jednoho testu mezi třemi testovanými skupinami. Signifikantní hranice byla stanovena na $p < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

Výsledky jsou uvedeny dle jednotlivých testů a znázorněny pomocí sloupcových grafů s vyznačenými průměrnými hodnotami, středními chybami průměru a signifikantními rozdíly. Kontrolní skupina, v legendě grafu jako Controls, je dále označována jako "skupina A" s počtem zvířat devět. Skupina s baclofenem, v legendě grafu jako Baclofen, je dále označována jako "skupina B" s počtem zvířat pět. Skupina s CGP 35348, v legendě grafu jako CGP 35348, dále označována jako "skupina C" obsahovala zvířata čtyři. U pěti testů je pak pomocí tabulek znázorněna procentuální úspěšnost zvířat v hodnocených úkonech.

4.1 Open field

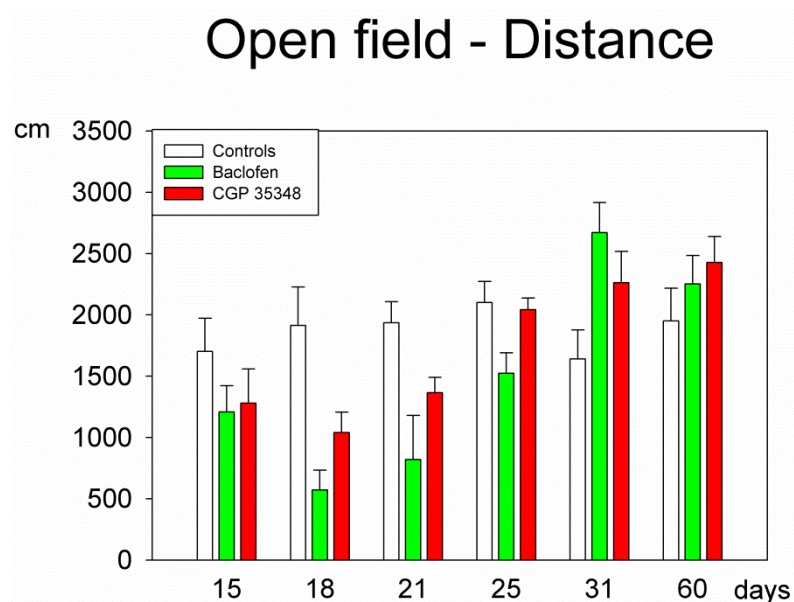
V testu Open field byly měřeny dvě hodnoty: ušlá vzdálenost a maximální dosažená rychlost.

4.1.1 Vzdálenost

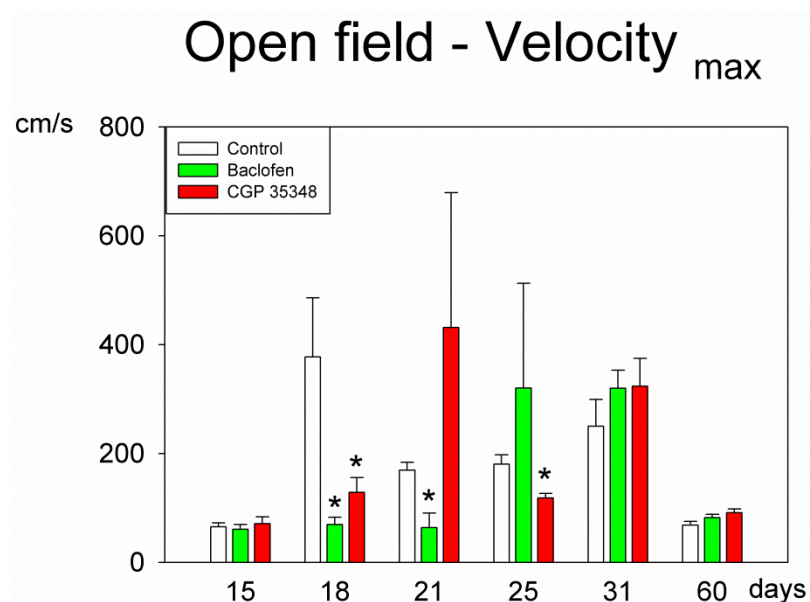
U skupiny A došlo od 15. do 25. dne k postupnému zvyšování průměrné ušlé vzdálenosti, která se mezi 25. a 31. dnem zmenšila. Obě ovlivněné skupiny měly od 15. do 25. dne kratší ušlou vzdálenost než skupina A (viz Příloha č. 3, 4 a 5). Tento rozdíl byl signifikantní u skupiny B vzhledem ke skupině A 18. a 21. den. 25. den se tento rozdíl obrátil a 31. a 60. den měly skupina B i C větší ušlou vzdálenost. V 31. den byla tato vzdálenost u skupiny B signifikantně větší ve srovnání se skupinou A. Zároveň se jednalo o největší naměřenou hodnota u tohoto testu. (viz Graf 7a)

4.1.2 Maximální rychlost

U skupiny A byl patrný od 15. do 31. dne postupný nárůst maximální možné rychlosti, až na 18. den, kdy byla tato hodnota oproti ostatním výrazně vysoká. U skupiny B tento výkyv proběhl 25. den a u skupiny C 21. den. Dále byla u skupiny B signifikantně snižená maximální rychlost oproti skupině A 18. a 21. den. Stejně tak u skupiny C byla tato hodnota signifikantně snižená 18. a 25. den. (viz Graf 7b)



Graf 7a Open field (vzdálenost) Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Open field. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná dosažená vzdálenost (cm). Hvězdičkami označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.



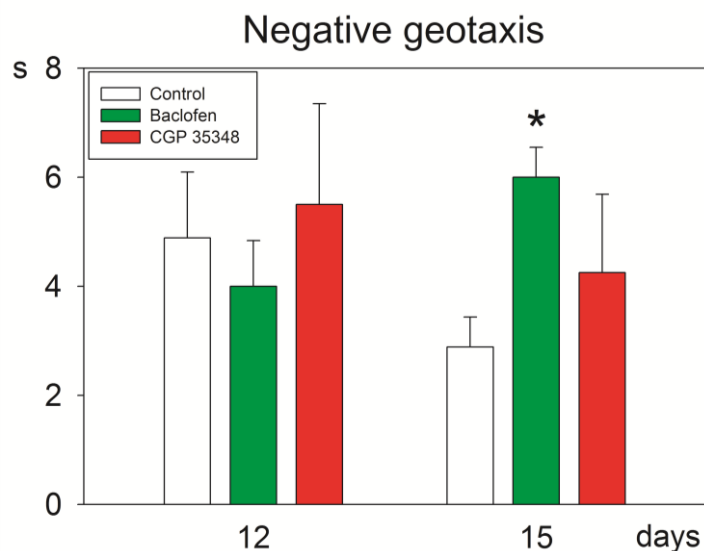
Graf 7b Open field (maximální rychlost) Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Open field. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná maximální rychlost (cm/s). Hvězdičkami označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

4.2 Righting test

Zvířata ve všech třech skupinách se v testovaných dnech otočila do jedné sekundy. Aplikace žádné látky tedy neměla na průběh tohoto testu vliv.

4.3 Negativní geotaxe

Zvířata ve skupině A mezi 12. a 15. dnem zkrátila dobu, za kterou se otočila. Ve skupině B se naopak doba otáčení prodloužila a 15. den byla signifikantně delší vzhledem ke skupině A. Ve skupině C došlo, obdobně jako u skupiny A, ke zkrácení doby otáčení. (viz Graf 1)



Graf 1 Negativní geotaxe Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Negativní geotaxe. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná doba v sekundách (s), za kterou se mláďata otočila na nakloněné rovině. Hvězdičkou označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

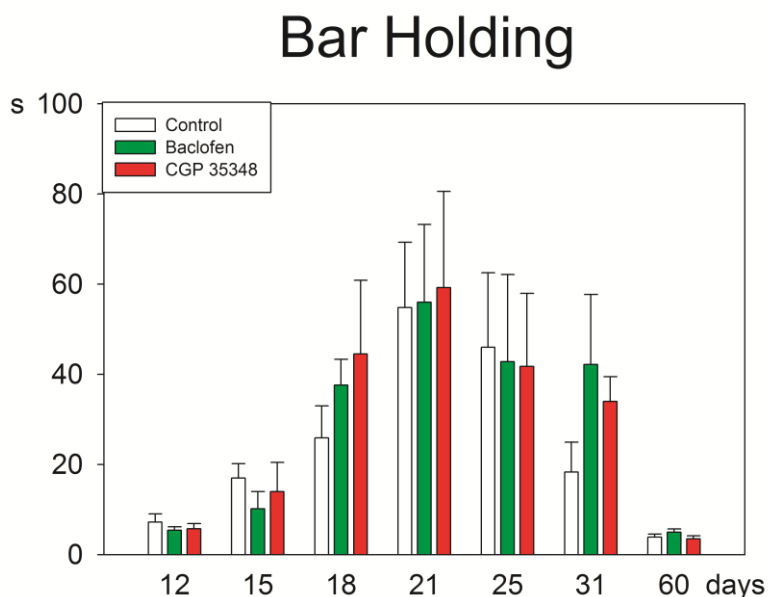
4.4 Hrazda

U tohoto testu byla měřena hodnota čas, po který se zvířata udržela na hrazdě. Dále byla zaznamenávána zvířata, jež se přitáhla zadními končetinami (ZKK).

4.4.1 Čas

U všech tří skupin se do 21. dne výrazně prodlužuje doba, po kterou se zvířata udrží na hrazdě. Poté se doba zkracuje, nejvýrazněji u skupiny A mezi 25. a 31. dnem. Šedesátidenní zvířata měla všechna nejkratší dobu, po kterou se na hrazdě udržela, to proto, že v tomto věku

již zvířata dosáhla ocasem na podložku a následně z hrazdy aktivně slezla (viz Příloha č. 6). (viz Graf 2)



Graf 2 Hrazda Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Hrazda. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná doba (s), po kterou se zvířata udržela na hrazdě. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

4.4.2 Přitažení zadních končetin

Ani jedno zvíře ve věku 12. a 15. dne nebylo schopné se přitáhnout zadními končetinami. Skupina A měla nejvyšší úspěšnost přitažení 25. den, jež 31. den o něco klesla a 60. den se dostala na nulu. Nejvíce zvířat ve skupině B a C se přitáhlo 21. den a to s úspěšností 100% v obou případech (viz Příloha č. 7). Na rozdíl od toho se z těchto skupin 31. den nepřitáhlo ani jedno zvíře. (viz Tab. 1)

věk/ skupina	A	B	C
P12	0	0	0
P15	0	0	0
P18	22,2	20	25
P21	22,2	100	100
P25	77,7	80	75
P31	66,6	0	0
P60	0	0	0

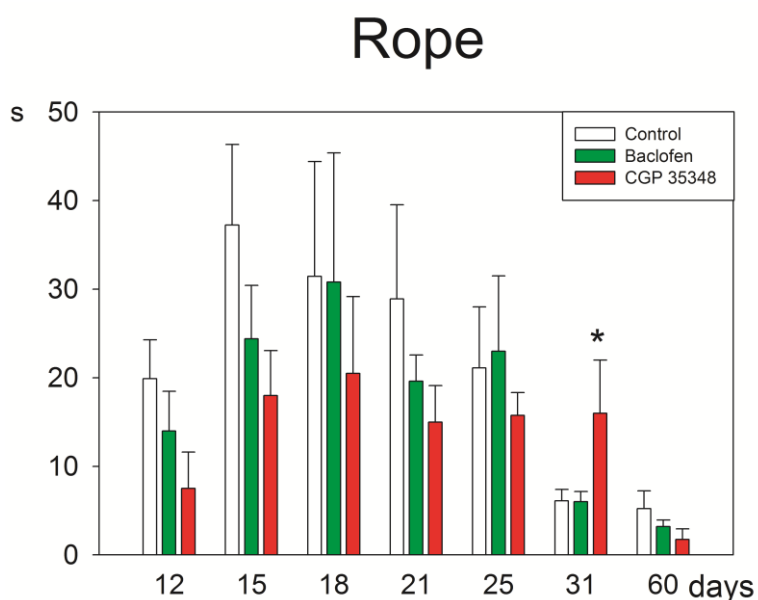
Tab. 1 Přitažení zadních končetin V tabulce jsou procentuálně (%) vyjádřena zvířata jednotlivých skupin a věku, která v testu Hrazda přitáhla zadní končetiny.

4.5 Lano

U testu Lano byly měřeny hodnoty čas, který se zvíře udrží na laně a od 18. dne byla zaznamenávána zvířata, která se otočila hlavou nahoru.

4.5.1 Čas

U skupiny A se doba strávená na laně zkracovala od 15. dne, u skupiny B mezi 18. a 21. dnem a 25. a 60. dnem a u skupiny C mezi 31. a 60. dnem. Mezi 21. a 31. dnem nedošlo u poslední skupiny k výrazným změnám, přičemž 31. den byla doba strávená na laně signifikantně ve srovnání s ostatními skupinami. (viz Graf 3)



Graf 3 Lano Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Lano. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná doba (s), po kterou se zvířata udržela na laně. Hvězdičkou označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

4.5.2 Otočení hlavou nahoru

Skupina A v porovnání s ovlivněnými skupinami má téměř po celou dobu testování nižší procento potkanů, kteří se na laně otočili hlavou nahoru. Nejvyšší procento otočených potkanů má jednoznačně skupina C (viz Příloha č. 8 a 9), a to až na 60. den, kde se otočilo pouze jedno zvíře, jedno se neotočilo a zbylá dvě se odmítla lana chytit. (viz Tab. 2)

věk/ skupina	A	B	C
P18	77,7	80	100
P21	44,4	100	100
P25	77,7	100	100
P31	66,6	80	100
P60	77,7	100	25

Tab. 2 Otočení hlavou nahoru V tabulce jsou procentuálně (%) vyjádřena zvířata jednotlivých skupin a věku, která se v testu Lano otočila hlavou nahoru.

4.6 Pravidelný horizontální žebřík

U testu Pravidelný horizontální žebřík byly měřeny hodnoty čas, za který zvířata přejdou žebřík, případně jeho část, chyby a byla zaznamenávána zvířata, která přešla celý žebřík až na druhý konec.

4.6.1 Čas (přejítí celého žebříku)

U skupiny A se s věkem rychle zkracovala doba, za kterou zvířata přešla žebřík, zatím co u obou ovlivněných skupiny byl vývoj odlišný a především 25. den strávila zvířata z těchto skupin na žebříku poměrně dlouhou dobu. U skupiny B byla tato hodnota vzhledem ke skupině A signifikantní. (viz Graf 4a)

4.6.2 Chyby

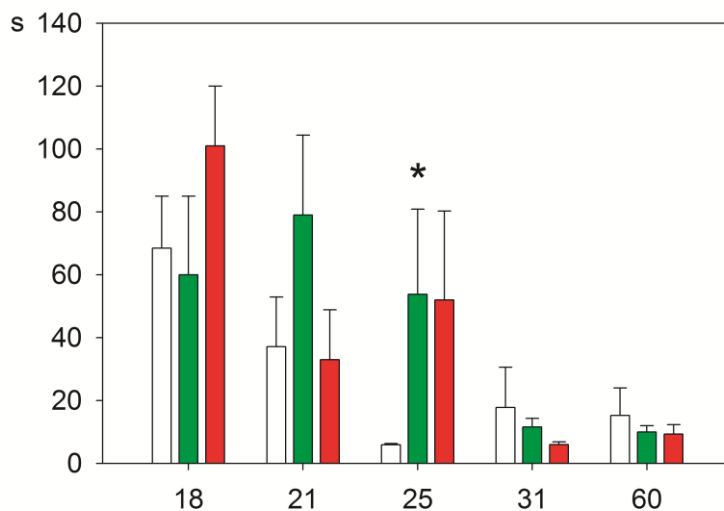
U skupiny A došlo mezi 18. a 21. dnem k výraznému snížení počtu chyb, poté byl počet chyb na přibližně stejné úrovni. U skupiny B byl průběh podobný, ovšem s větším průměrným počtem chyb. Skupina C měla 18. den nejvíce chyb, tato hodnota byla naměřena jako signifikantní ve srovnání oběma zbylými skupinami. Ke 31. dni se tento rozdíl obrátil a skupina C dosáhla naopak signifikantně nejmenší (nulový) počet chyb vzhledem ke skupině A. (viz Graf 4b)

4.6.3 Přejítí celého žebříku

U skupiny A i C je patrné postupné zvyšování počtu zvířat, jež přešla celý horizontální žebřík. Tento nárůst je u skupiny B opožděn a 31. a 60. den se rozdíly vyrovnávají.

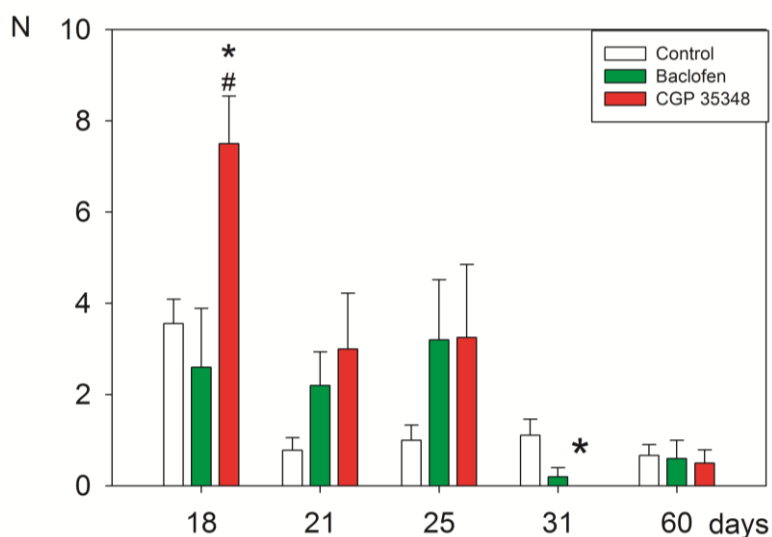
(viz Tab 3)

Horizontal ladder / Time



Graf 4a Pravidelný horizontální žebřík Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Pravidelný horizontální žebřík. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná doba (s), za kterou zvířata přešla žebřík. Hvězdičkami označen signifikantní rozdíl vůči skupině A a křížkem vůči skupině B. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

Horizontal ladder / Errors



Graf 4b Pravidelný horizontální žebřík (počet chyb) Sloupcový graf znázorňující počet chyb v testu Pravidelný horizontální žebřík. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněn průměrný počet chyb. Hvězdičkou označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

věk/ skupina	A	B	C
P18	33,3	0	25
P21	77,7	40	75
P25	100	60	75
P31	88,8	100	100
P60	100	100	100

Tab. 3 Přejítí celého žebříku V tabulce jsou procentuálně (%) vyjádřena zvířata jednotlivých skupin a věku, která v testu Pravidelný horizontální žebřík překonala žebřík od začátku do konce.

4.7 Nepravidelný horizontální žebřík

U testu Nepravidelný horizontální žebřík byly měřeny hodnoty čas, za který zvířata přejdou žebřík, případně jeho část, Chyby a byla zaznamenávána zvířata, která přešla celý žebřík až na druhý konec.

4.7.1 Čas (přejítí celého žebříku)

Čas, za který zvířata přešla žebřík, se u skupiny A nejmýrazněji zkrátil mezi 21. a 25. dnem. U ostatních dvou skupin bylo zkracování času stráveného na žebříku patrné až od 25. dne. Ve stejný den byl zároveň u skupiny C tento rozdíl signifikantní vzhledem ke skupině A. (viz Graf 5a)

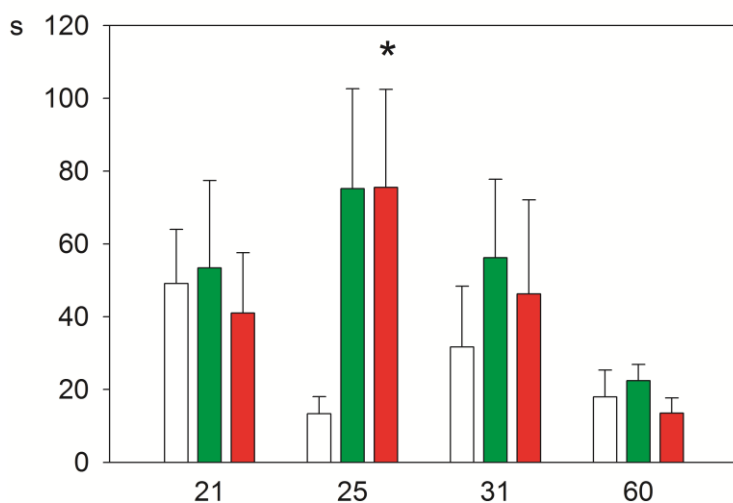
4.7.2 Chyby

Skupina A měla ve všech dnech počet chyb stabilní a to v průměru menší než jedna. U ostatních dvou skupin byl patrný nárůst počtu chyb mezi 21. a 25. dnem a následný pokles do 60. dne. U skupiny C byl naměřen 25. den signifikantně větší počet chyb vůči skupině A. (viz Graf 5b)

4.7.3 Přejítí celého žebříku

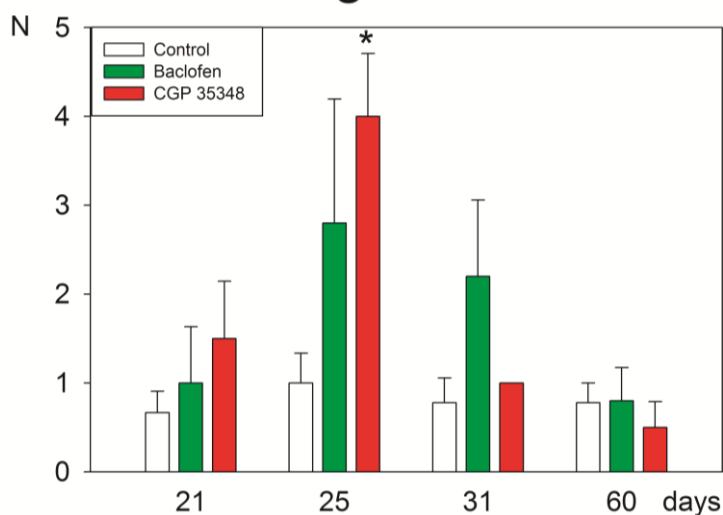
Skupina B měla v porovnání s ostatními skupinami nejnižší úspěšnost v překonání celého žebříku. V ostatních ohledech se tato úspěšnost mezi jednotlivými skupinami a v různých fázích vývoje příliš nelišila. (Tab. 4)

Horizontal irregular ladder - Time



Graf 5a Nepravidelný horizontální žebřík Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Nepravidelný horizontální žebřík. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná doba (s), za kterou zvířata přešla žebřík. Hvězdičkou označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

Horizontal irregular ladder - Errors



Graf 5b Nepravidelný horizontální žebřík (počet chyb) Sloupcový graf znázorňující počet chyb v testu Nepravidelný horizontální žebřík. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněn průměrný počet chyb. Hvězdičkou označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

věk/ skupina	A	B	C
P21	77,7	60	100
P25	100	40	50
P31	77,7	80	75
P60	100	100	100

Tab. 4 V tabulce jsou procentuálně (%) vyjádřena zvířata jednotlivých skupin a věku, která v testu Horizontální nepravidelný žebřík překonala žebřík od začátku do konce.

4.8 Seskok s volbou

U tohoto testu byly měřeny hodnoty čas, za který zvíře opustilo platformu a byla zaznamenávána zvířata, která seskočila do kotce s ostatními potkany.

4.8.1 Čas

U skupiny A se doba, než zvíře opustilo platformu, výrazně zkracovala mezi 18. a 21. dnem. Obě ovlivněné skupiny měly již 18. den nejmenší nejkratší čas strávený na plošině, což bylo signifikantní u skupiny B vůči skupině A. Následně se zvyšoval až do 31. dne, kde byl naopak u skupiny C signifikantně větší než u skupiny A. Zvířata ve věku do 31. dne z platformy neseskakují, ale dobrovolně se sesunou.

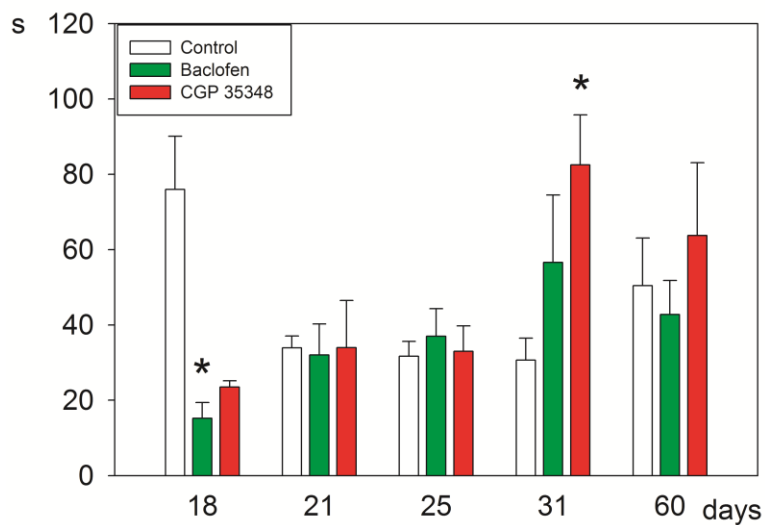
4.8.2 Seskok do kotce se zvířaty

U skupiny A byl mezi 18. a 21. dnem velký nárůst zvířat, jež se dostala do kotce s ostatními zvířaty, kde první testovací den bylo takto úspěšné pouze jedno zvíře, přičemž některá mláďata zůstala do konce vypršení časového limitu na platformě. U ostatních skupin nebyl podobný výkyv patrný. (viz Tab. 5)

věk/ skupina	A	B	C
P18	11.2	60	75
P21	100	80	50
P25	55.5	80	75
P31	66.6	20	75
P60	66.6	80	100

Tab. 5 V tabulce jsou procentuálně (%) vyjádřena zvířata jednotlivých skupin a věku, která v testu Seskok s volbou seskočila do kotce s ostatními zvířaty.

Jumping down



Graf 6 Seskok s volbou Sloupcový graf znázorňující výsledky testu Seskok s volbou. Na ose X zobrazen věk potkanů ve dnech. Na ose Y znázorněna průměrná doba (s), za kterou zvíře opustilo platformu. Hvězdičkami označen signifikantní rozdíl vůči skupině A. V legendě grafu popsány jednotlivé testovací skupiny.

4.9 Testování hypotéz

Hypotéza 1

H_0 byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám ve vývoji motoriky potkanů po aplikaci baclofenu

H_A se potvrdila

Hypotéza 2

H_0 byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám ve vývoji motoriky potkanů po aplikaci CGP 35348

H_A se potvrdila

Hypotéza 3

H_0 se potvrdila.

H_A byla odmítnuta vzhledem k absencím změn v motorice v rané dospělosti potkanů po aplikaci baclofenu

Hypotéza 4

H_0 se potvrdila

H_A byla odmítnuta vzhledem k absencím změn v motorice potkanů v rané dospělosti po aplikaci CGP 35348

5 DISKUSE

Díky početným studiím GABA_Aergního systému, jež byly v minulosti provedeny, je v současné době známo mnohé jak o funkci, tak o mechanismu působení GABA_B receptorů. Podkladem jejich účinků je v rámci centrální nervové soustavy velice významná inhibiční schopnost těchto receptorů. Klinické projevy této inhibice zahrnují především snížení svalového napětí a bolesti, řízení krevního tlaku, pozitivní ovlivněním drogových závislostí a antikonvulzivní i prokonvulzivní účinky.

V souvislosti s tímto dlouhodobým výzkumem byly vyvinuty látky, které podmiňují nebo naopak blokují aktivitu těchto receptorů. Lze je rozdělit do dvou skupin, na agonisty a antagonisty. První z nich, baclofen a SK&F 97541, aktivují biologickou odpověď receptoru. Druhá skupina zahrnující CGP 35348, 3-APHPA a phaclofen naopak tuto aktivitu blokuje. V současnosti je klinicky dostupná pouze jedna z nich, a to baclofen, který bývá indikován pro schopnost významně snížit svalové napětí, čímž se stává metodou volby při ošetření spasticity.

Existují dva způsoby podání, kde každý z nich má své přednosti i nevýhody. Při užití baclofenu orální cestou je zapotřebí větší množství látky v porovnání s druhým způsobem podání, kterým je intrathekální pumpa. Tento rozdíl se pohybuje v řádu pětiset a až tisíce násobku (Brennan a Whittle, 2008). S tím souvisí minimální výskyt vedlejších účinků u druhého způsobu podání, mezi které patří nevolnost, hypotenze, ospalost, záchvaty, zmatenost či závratě a které mohou být až důvodem k přerušení léčby. Zároveň se při vysokých dávkách může s přibývajícím časem vyskytnout snížení citlivosti receptorů a tedy ke zhoršení účinku, jež vede k dalšímu navýšení dávky. Na druhé straně existují i komplikace při aplikaci baclofenu intrathekální pumpou a to nejčastěji v souvislosti se zavedeným aparátem. Jedná se o migraci, katetru vedoucího látku od pumpy do míchy, prosakování mozkomíšního moku v oblasti přechodu katetru do míchy či zánět v důsledku přítomnosti cizího tělesa (Penn et al. 2006).

Jsou zdokumentovány kazuistiky, kde baclofen dlouhodobě snížil spasticitu vzniklou na základě nejrůznějších onemocnění CNS či traumatických lézí a to nejen v dospělém (Hsieh a Penn, 2006), ale i dětském věku (Motta et al., 2010, Overgard et al., 2015), kde nejnižší věk probanda byl čtyři roky (Motta et al., 2010). Užití baclofenu v ještě nižším věku dokumentují práce, kde byla tato látka úspěšně použita při léčbě hypertonu u hypertonu (Moran et al., 2005). Jejich počet je ovšem velmi omezený a zároveň již neinformují, zda měla tato léčba vliv na motorický vývoj léčených jedinců.

Dále jsou doložené případy, kdy se u novorozenců, jejichž matky užívaly baclofen v těhotenství, vyskytl ihned po narození abstinenční syndrom. Jediným způsobem léčby bylo opětovné podávání pravidelných a postupně se snižujících dávek baclofenu (Delhaas a Vervagen, 1992; Duncan a Devlin, 2013; Moran et al. 2004). Ani v těchto případech nebylo ovšem zdokumentováno, zda mělo intrauterinní či postnatální působení této látky vliv na následný vývoj. Díky nedostatečnému počtu kazuistik zároveň není možné určit velikost rizika intrauterinního působení baclofenu (Moran et al., 2004).

Stejně tak chybí laboratorní výzkumné práce, které by se zaměřovali na toto téma. Sice existují mnohé, jež pojednávají o vývoji GABAergního systému či o změně účinků GABA souvisejících se zráním nervové soustavy. Není známa ovšem žádná experimentální práce, která by dokumentovala vývoj motoriky po ovlivnění GABA_B receptorů, jak je tomu v této studii.

Pro testování této problematiky byli použiti potkani a to z několika důvodů. Za prvé je ve srovnání s ostatními laboratorními zvířaty vývoj jejich nervového systému nejlépe zdokumentován. Dále, jelikož se stupeň zralosti centrální nervové soustavy donošeného lidského novorozence nejvíce podobá té u potkana starého 11. dnů, je možné ovlivnit motorický vývoj tohoto zvířete podáním látky postnatálně a srovnávat tak změny vývoje, ke kterým by v případě lidského jedince došlo prenatálně. Zároveň se jedná o nejpoužívanější laboratorní zvíře, je tak možné následného srovnání s ostatními studii na související témata.

Ovlivnění GABA_B receptorů proběhlo v této studii od 7. do 11. dne věku potkana, což ve srovnání s člověkem znamená prenatální a těsně postnatální období. Jedné skupině byl v této době peritoneálně aplikován baclofen, druhé antagonist GABA_B receptorů CGP 35348 a třetí, kontrolní skupině, fyziologický roztok a to z toho důvodu, že obě podávané látky byly rozpuštěné právě ve fyziologickém roztoku.

K hodnocení vývoje motoriky a jeho případným odchylkám byly použity specifické motorické testy, které byly v minulosti použity v jedné z největších studií zaměřených na postnatální vývoj lokomoce laboratorního potkana (Altman a Sudarshan, 1975). Výběr zahrnoval kombinaci osmi testů, jež se zaměřovaly na různé projevy motorických dovedností a mohlo tak být následně provedení komplexního hodnocení motorického vývoje. První test posuzující motorickou aktivitu byl Open field. Další skupina zahrnovala neurologické testy, podávají informaci o stupni a stavu vývoje nervové soustavy (Woodworth et al., 2011). Jednalo se o Righting test a test Negativní

geotaxe. Třetí skupina pak hodnotila motorickou koordinaci a svalovou sílu a jednalo se o testy Hrazda, Lano, Horizontální pravidelný a nepravidelný žebřík a Seskok s volbou. Výsledky testů se zaznamenávaly a následně statisticky vyhodnotily. Pokud není uvedeno jinak, uvedené signifikantní hodnoty jsou vypočítány vzhledem ke kontrolní skupině.

V prvním prováděném testu Open field byla po dobu pěti minut pomocí kamery zaznamenávána motorická aktivita. Pomocí k tomu určeného programu se následně vypočítala celková ušlá vzdálenost a maximální vykonaná rychlost každého zvířete. V rámci první měřené hodnoty vyšlo, že obě ovlivněné skupiny ušly od 15. do 25. dne kratší vzdálenost než-li kontrolní skupina, kde 18. a 21. den byl tento rozdíl u skupiny s baclofenem signifikantní. 25. den se tento rozdíl obrátil. 31. a 60. den byla ovlivněným skupinám naměřena delší vzdálenost, kde u skupiny s baclofenem byl tento rozdíl 31. den signifikantní. U měření hodnoty maximální rychlosti se u kontrolní skupiny projevil od prvního dne testování postupný nárůst hodnoty, a to kromě 18. dne, kdy byl zaznamenán prudký vzestup ve vykonané rychlosti. Ovlivněné skupiny také vykázaly podobný výkyv ovšem s jistým zpožděním. U skupiny s CGP35348 tomu bylo 21. den a u zvířat s baclofenem 25. den. Dále baclofenová skupina prokázala v 18. a 21. den signifikantně nižší rychlost. Stejně tak potkani s antagonistou měli 18. a 25. den signifikantně snížené hodnoty. Motorická aktivita byla tedy u obou ovlivněných skupin významně ovlivněna a to především ve smyslu snížení, přičemž více signifikantních změn prokázala zvířata s baclofenem.

V pořadí další testy byly Righting test a Negativní geotaxe. Výsledky prvního z nich, jež hodnotil vzpřimovací mechanismy položením zvířete do supinační polohy, nezaznamenaly žádné odchylky ani jedné skupiny. Druhý neurologický test probíhající 12. a 15. den, byl zaměřený na čas potřebný k přetočení se na nakloněné rovině. Přinesl jednu signifikantní hodnotu a to u skupiny s baclofenem, která 15. den potřebovala významně delší dobu. Rovněž druhé ovlivněné skupině byl naměřen delší čas a to v oba testovací dny. Neurologické testy tedy odhalily významně zhoršené vzpřimovací schopnosti u potkanů ovlivněných baclofenem.

Ač hodnotila poslední skupina testů především schopnost motorické koordinace a svalovou sílu, dalším možným faktorem ovlivňujícím výkon zvířat byl strach z výšky. Testovací aktivity byly totiž prováděné v průměru dvacet centimetrů nad zemí. Prvním úkonem byla výdrž na hrazdě. Měřil se čas, jak dlouho se zvíře na tyči udrží a dále se hodnotila schopnost přitažení zadních končetin. V případě výdrže nebyla naměřena

žádná signifikantní hodnota. Jediný rozdíl byl zaznamenán 18. a 31. den, kdy obě ovlivněné skupiny vydržely na hrazdě o chvíli déle než kontrolní skupina. Zajímavé je, že jak první měřený den (12.) tak poslední (60.) vykazaly všechny skupiny stejné hodnoty. Při hodnocení schopnosti přitáhnout zadní končetiny k hrazdě, jež hodnotila velmi významně svalovou sílu a koordinaci, byly jediné rozdíly prokázány 21. den, kde všechna zvířata ovlivněných skupin tento úkol vykonala. V kontrolní skupině toto dokázala pětina zvířat. Dalším testem bylo lano, kde se hodnotila délka výdrže a od 18. den schopnost otočit se hlavou nahoru. V porovnání s kontrolní skupinou vykazala zvířata s CGP35348 ve všech dnech kratší výdrž na laně a to až na 31. den, kde se toto otočilo a ovlivněná zvířata zůstala na laně signifikantně déle. Skupina s baclofenem měla taktéž o něco nižší hodnoty oproti kontrolám, žádná z nich ovšem nebyla významná. Otočení hlavou nahoru vykazala zvířata z obou ovlivněných skupin ve větším zastoupení než zvířata kontrolní. Následující dva testy hodnotily především koordinaci a přesnost prováděných pohybů. V obou případech se jednalo o přejítí žebříku, jednou s pravidelnými a podruhé s nepravidelnými příčkami. Zaznamenával se čas, chyby, tedy stoupnutí mimo příčku, a zvířata, která přešla celý žebřík. V případě pravidelného žebříku strávily obě ovlivněné skupiny tímto úkolem výrazně delší dobu než kontrolní zvířata. U skupiny s baclofenem byla tato hodnota 25. den signifikantní. V počtu chyb vykazala naopak skupina s CGP 35348 18. den významně vyšší počet a to vzhledem k oběma dalším skupinám. 21. a 25. den pak obě ovlivněné skupiny vykonaly více chyb než skupina kontrolní. Oproti tomu 31. den žádné zvíře ze skupiny s CGP35348 neprovedlo ani jednu chybu, což se projevilo jako signifikantní. Při hodnocení přechodu celého žebříku projevila zvířata s baclofenem opožděný průběh vzhledem k ostatním skupinám. V čase přejítí nepravidelného žebříku obě ovlivněné skupiny strávily tímto 25. den více času než kontrolní zvířata. U skupiny s CGP35348 byl tento rozdíl signifikantní. U počtu provedených chyb bylo taktéž 25. den zaznamenáno větší číslo u ovlivněných zvířat, kde u skupiny s CGP 35348 byla tato hodnota významná. V úspěšnosti přechodu celého žebříku měla skupina s baclofenem nejhorší výsledky. Významné rozdíly nebyly ovšem zaznamenány. Posledním testem byl Seskok s volbou. Zde byla zvířata dána na vyvýšenou plošinu nad dvěma kotci, jedním prázdným a druhým s ostatními zvířaty. Měřil se čas potřebný pro opuštění plošiny a zaznamenávala zvířata, která se rozhodla pro kotec s ostatními potkany. V prvním případě vyšel zajímavý výsledek a to v u obou ovlivněných skupiny, které strávily na plošině výrazně kratší dobu než kontrolní zvířata. U skupiny s baclofenem

bylo toto signifikantní. 21. den a 25. den měla všechna testovaná zvířata podobné výkony. 31. den pak naopak ovlivněná zvířata potřebovala delší čas pro seskok. U skupiny s CGP 35348 byla tato hodnota signifikantní. V hodnocení zastoupení zvířat, která se rozhodla pro kotec se zvířaty, nebyly zjištěny významné odchylky. Hodnocení koordinace, přesnosti pohybu a svalové síly tedy vykazalo významné změny ve schopnostech ovlivněných zvířat, a to především u skupiny s CGP 35348, u které byl naměřen větší počet signifikantních hodnot.

Závěrem tedy lze říci, že tato studie prokázala signifikantní změny ve vývoji motoriky laboratorního potkana v důsledku ovlivnění GABA_B receptorů. Významné změny byly vyhodnoceny jak u skupiny, které byl podán agonista těchto receptorů, tak u zvířat a aplikovaným antagonistou. Zároveň ovšem nebyly evidované změny stejné u obou skupin. Zatímco zvířata s baclofenem prokázala největší změny v motorické aktivitě, potkani s CGP 35348 vykazaly největší změny u testů zaměřených na koordinaci a svalovou sílu. Druhou částí výsledků je závěr, že ani u jedné skupiny změny ve vývoji motoriky nepřetrvávají do období rané dospělosti.

SOUHRN

Cílem této práce bylo prokázat, zda má ovlivnění GABA_B receptorů vliv na motorický vývoj laboratorního potkana a pokud ano, zda tyto změny přetrvávají do dospělého věku. Testovány byly tři skupiny zvířat. První z nich obdržela dávky baclofenu, tedy selektivního agonisty GABA_B receptorů, který je jako jediný agonista používán v klinické praxi. Druhé skupině byl podán CGP 35348, což je antagonist těchto GABA_B receptorů. Třetí kontrolní skupina pak dostala dávky fyziologického roztoku a to z toho důvodu, že baclofen i CGP 35348 byly pro aplikaci rozpuštěny právě ve fyziologickém roztoku. Obě látky i fyziologický roztok byly zvířatům aplikovány od 7. do 11. dne po narození intraperitoneálně mikroposunem, který zajišťuje přesné podání požadovaného objemu. Tento věk byl vybrán z důvodu, že při srovnání zralosti centrální nervové soustavy člověka a potkana, odpovídá toto prenatálnímu a časně postnatálnímu období lidského novorozence narozeného v termínu.

Důvodem, proč se tato studie zaměřila na prenatální a částečně i postnatální ovlivnění GABA_B receptorů je fakt, že ač je baclofen klinicky účinnou a prověřenou metodou volby při léčbě spasticity a to jak v dětském tak dospělém věku, existuje jen velmi malý počet prací dokumentujících účinky této látky na lidský plod a novorozeného jedince a jeho postnatální vývoj. Ozřejmění či vyvrácení jeho možných účinků a tedy rizik na nezralého jedince by tak pomohlo při jeho klinickém užití u těhotných matek s projevy spasticity, dále u novorozenců s výraznými projevy hypertonie a v neposlední řadě u novorozenců vykazující abstinční příznaky v důsledku intrauterinního působení baclofenu.

Testování probíhalo ve stejnou denní dobu v předem stanovené dny, které znamenají důležité mezníky ve vývoji motoriky potkana. Začínalo se ve stáří 12 dnů a dále se pokračovalo 15., 18., 21., 25., 31. a 60. den. Dohromady bylo použito osm testů, hodnotící reflexní vzpřimovací mechanismy, motorickou aktivitu, svalovou sílu a koordinaci. Výsledky byly statisticky zpracovány a vyznačením významných hodnot.

Získané hodnoty této studie vykazují významné změny v motorickém vývoji u obou ovlivněných skupin ve srovnání s kontrolní skupinou a to ve smyslu zpomalení tohoto vývoje. U zvířat s baclofenem bylo naměřeno nejvíce významných hodnot v testu Open field, což se projevovalo sníženou motorickou aktivitou. U potkanů

s CGP35348 se vyskytlo největší množství signifikancí v testu Nepravidelný horizontální žebřík, což se projevilo jako zhoršení schopnosti koordinace a přesnosti prováděného pohybu. Zároveň je zajímavé, že i přes tyto změny mezi ovlivněnými skupinami byl naměřen jak u zvířat s baclofenem, tak s CGP 35348 stejný počet signifikantních hodnot. Dalším výsledkem, který tato studie poskytla, je fakt, že testy, které byly prováděny 60. den, tedy v dospělosti zvířat, byly u všech zvířat a všech testů totožné. Z toho vyplývá, že změny projevující se během motorického vývoje v důsledku prenatálního a časně postnatálního ovlivnění GABA_B receptorů nepřetrvávají do dospělosti.

REFERENČNÍ SEZNAM

- ADAMS, N. a R. BOICE. A longitudinal study of dominance in an outdoor colony of domestic rats. *Journal of Comparative Psychology*. 1983, 97(1), 24-33. DOI: 10.1037/0735-7036.97.1.24.
- ALTMAN, J. a K. SUDARSHAN. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal behavior*. 1975, 23(4), 896-920. ISSN 0003-3472.
- BAKER, H. J., J. R. LINDSEY a S. H. WEISBROTH. Appendix 1: selected normative data. In: BAKER, H. J., J. R. LINDSEY, S. H. WEISBROTH. The laboratory rat: volume I. *Biology and diseases*. New York: Academic Press; 1979, 411.
- BENES, F. a S. BERETTA. GABAergic Interneurons Implications for Understanding Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology*. 2001, 25(1), 1-27. DOI: 10.1016/s0893-133x(01)00225-1.
- BETTLER, B., K. KAUPMANN, J. MOSBACHER a M. GASSMANN. Molecular Structure and Physiological Functions of GABAB Receptors. In: *Physiological Reviews*. 2004-07-01, 835-867. ISSN 0031-9333. DOI: 10.1152/physrev.00036.2003.
- BIRKMAYER, Walther. *Spasticity: a topical survey*. Bern: H. Huber, 1972, 218. ISBN 34-560-0297-1.
- BLACKBURN, Thomas P. *GABAB Receptor Pharmacology: A Tribute to Norman Bowery: Advances in pharmacology - Svazek 58*. USA: Academic Press, 2010. ISBN 978-0-12-378647-0.
- BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clinical science* (London). 2000, 98(2), 217-240.
- BOWERY, N. G. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006, 6(1), 37-43. DOI: 10.1016/j.coph.2005.10.002.

- BOWERY, N. G. Historical Perspective and Emergence of the GABAB Receptor. *Advances in Pharmacology*. 2010, 58, 1-18 DOI: 10.1016/S1054-3589(10)58001-3.
- BOWERY, N. G., D. R. HILL, A. L. HUDSON, A. DOBLE, J. SHAW a M. TURNBULL. Baclofen: a selective agonist for a novel type of GABA receptor. *Proceedings of the B.P.S. 1979-7-17-20*, 67(3), 444.
- BOWERY, N. G., D. R. HILL, A. L. HUDSON, A. DOBLE, D. N. MIDDLEMISS, J. SHAW a M. TURNBULL. (–)Baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*. 1980-1-3, 283(5742), 92-94. DOI: 10.1038/283092a0.
- BOWERY, N. G., C. L. PADGETT, P. A. SLESINGER a D. BENKE. GABAB Receptor Pharmacology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1993, 33(1), 93-111. DOI: 10.1016/s1054-3589(10)58004-9.
- BOWERY, N. G., B. BETTLER, W. FROESTL, J. P. GALLAGHER, F. MARSHALL, M. RAITERI, T. I. BONNER a S. J. ENNA. International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma -Aminobutyric AcidB Receptors: Structure and Function. *Pharmacological Reviews*. 2002, 54(2), 247-264. DOI: 10.1124/pr.54.2.247.
- BOWERY, N. G. a T. G. SMART. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *British Journal of Pharmacology*. 2006, 147(S1), 109-S119. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706443.
- BRENNAN, P. M. a I. R. WHITTLE. Intrathecal baclofen therapy for neurological disorders: a sound knowledge base but many challenges remain. *British Journal of Neurosurgery*. 2008, 22(4), 508-519. DOI: 10.1080/02688690802233364.
- BROOKS, S. a S. DUNNET. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009, 10(7), 519-529. ISSN 1471-0048.

- BROUGHTON, Jack M., D. RAMPTON a K. HOLANDA. A test of an osteologically based age determination technique in the Double-crested Cormorant *Phalacrocorax auritus*. *Ibis*. 2002, 144(1), 143-146. DOI: 10.1046/j.0019-1019.2001.00004.x.
- BUREAU, I., S. BISCHOFF, S. F. HEINEMANN a C. MULLE. Kainate receptor-mediated responses in the CA1 field of wild-type and GluR6-deficient mice. *The Journal of neuroscience*. 1999-01-15, 19(2), 653-663.
- DARIO, Alessandro, R. PISANI, S. SANGIORGI, F. PESSINA a G. TOMEI. Relationship between intrathecal baclofen and the central nervous system. *Operative Neuromodulation*. Vienna: Springer Vienna, 2006, 461. DOI: 10.1007/978-3-211-33079-1_60.
- DAVIDOFF, Robert A. Antispasticity drugs: Mechanisms of action. *Annals of Neurology*. 1985, 17(2), 107-116. DOI: 10.1002/ana.410170202.
- DELHAAS, E M a J. VERHAGEN. Pregnancy in a quadriplegic patient treated with continuous intrathecal baclofen infusion to manage her severe spasticity. Case report. *Paraplegia*. 1992, 30(7), 527-528. DOI: 10.1038/sc.1992.110.
- DIMITRIJEVIĆ, Lidija, H. ČOLOVIĆ, M. SPALEVIĆ, A. STANKOVIĆ, D. ZLATANOVIĆ a B. CVETKOVIĆ. Assessment and Treatment of Spasticity in Children with Cerebral Palsy. *Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš*. 2014-01-1, 31(3), 163-169 DOI: 10.2478/afmnai-2014-0020.
- DOLPHIN, A. C. a R. H. SCOTT. Inhibition of calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones by (-)-baclofen. *British Journal of Pharmacology*. 1986, 88(1), 213-220. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1986.tb09489.x.
- DUNCAN, S. D. a L. A. DEVLIN. Use of baclofen for withdrawal in a preterm infant. *Journal of Perinatology*. 2013, 33(4), 327-328. DOI: 10.1038/jp.2012.107.

- DUNLAP, K. a G. D. FISCHBACH. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *The Journal of Physiology*. 1981-08-01, 317(1), 519-535. DOI: 10.1113/jphysiol.1981.sp013841.
- DURBIN, P. W., M. H. WILLIAMS, N. JEUNG a J. S. ARNOLD. Development of spontaneous Mad'ary tumors over the life-span of the fiale Charles River (Sprague-Dawley) rat: the influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer research*. 1966, 26(3), 400-411.
- ENGRAND, N., P. VAN DE PERRE, G. VILAIN a D. BENHAMOU. Intrathecal baclofen for severe tetanus in a pregnant woman. *European Journal of Anaesthesiology*. 2001, 18(4), 261-263. DOI: 10.1046/j.0265-0215.2000.00834.x.
- EKAYEF BANGLADESH: History. © 2014 Eskayef Bangladesh Llimited. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: www.skfbd.com/history.php
- FORD, B., P. GREENE, E. D. LOUIS, G. PETZINGER, S. B. BRESSMAN, R. GOODMAN, M. F. BRIN, S. SADIQ a S. FAHN. Use of Intrathecal Baclofen in the Treatment of Patients With Dystonia. *Archives of Neurology*. 1996-12-01, 53(12), 1241-1246. DOI: 10.1001/archneur.1996.00550120049016.
- GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. 20. vyd. Praha: Galén, 2005, 890. ISBN 80-726-2311-7.
- GANGULY, Karunesh, A. F. SCHINDER, S. T. WONG a M. POO. GABA Itself Promotes the Developmental Switch of Neuronal GABAergic Responses from Excitation to Inhibition. *Cell*. 2001, 105(4), 521-532. DOI: 10.1016/s0092-8674(01)00341-5.
- GEISLER, H. C., J. WESTERGA a A. GRAMSBERGEN. Development of posture in the rat. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 1993, 53, 517-523.

- GOLDKAMP, J., R. BLASKIEWITZ a T. MYLES. Stiff person Syndrome and pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*. 2011, 118(2): 454–457.
- GRAMSBERGEN, Albert. Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development?. *Neuroscience*. 1998, 22(4), 547-553. DOI: 10.1016/s0149-7634(97)00043-2.
- HARDY, A. R., R. J. QUY a L. W. HUSON. Estimation of Age in the Norway Rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout) from the Weight of the Eyelens. *Journal of Applied Ecology*. 1983, 20(1), 97. DOI: 10.2307/2403378.
- HARLAN. 2005 In SENGUPTA, Pallav. A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age?. *Biomedicine International*. 2011, 2, 81-89.
- HILL, D. R. a N. G. BOWERY. 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABAB sites in rat brain. *Nature*. 1981, 290(5802), 149-152. DOI: 10.1038/290149a0.
- HSIEH, Joseph C. a R. D. PENN. Intrathecal baclofen in the treatment of adult spasticity. *Neurosurgical FOCUS*. 2006, 21(2), 1-6. DOI: 10.3171/foc.2006.21.2.6.
- JACOB, Howard J., D. M. BROWN, R. K. BUNKER, M. J. DALY, V. J. DZAU, A. GOODMAN, G. KOIKE, V. KREN, T. KURTZ, Å. LERNMARK, G. LEVAN, Yi-pei MAO, A. PETTERSSON, M. PRAVENEK, J. S. SIMON, C. SZPIRER, J. SZPIRER, M. R. TROLLIET, E. S. WINER a E. S. LANDER. A genetic linkage map of the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. *Nature Genetics*. 1995, 9(1), 63-69. DOI: 10.1038/ng0195-63.
- KAHANA, T., W. H. BIRKBY, L. GOLDIN a J. HISS. Estimation of age in adolescents – the basilar synchondrosis. *Journal of forensic science*. 2003, 48(3), 504-508.

- KEBERLE, H., J. W. FAIGLE a M. WILHELM, *Baclofen*. 499.046. Swiss Patent In: *Chemical Abstracts*. 1968.
- KERR, D. I. a J. ONG. GABAB receptors. *Pharmacology&Theapeutics*. 1995, 67(2), 187-246.
- KOLÁŘ, Pavel. *Rehabilitace v klinické praxi*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, 713. ISBN 978-807-2626-571.
- KRACH, Linda E., R. L. KRIEL, R. C. GILMARTIN, D. M. SWIFT, B. B. STORRS, R. ABBOTT, J. D. WARD, K. K. BLOOM, W. H. BROOKS, J. R. MADSEN, J. F. MCLAUGHLIN a J. M. NADELL. GMFM 1 year after continuous intrathecal baclofen infusion. *Developmental Neurorehabilitation*. 2005, 8(3), 207-213. DOI: 10.1080/13638490400021479.
- KRINKE, Georg J. *The handbook of experimental animals: The laboratory rat*. San Diego, Calif: Academic Press, 2000, 756. ISBN 00-805-3346-9.
- MADTES, P. Jr. Ontogeny of the GABA receptor komplex. 1987. In VELÍŠKOVÁ, Jana, L. VELÍŠEK a S. L. MOSHÉ. Age-Specific Effects of Baclofen on Pentylentetrazol-Induced Seizures in Developing Rats. *Epilepsia*. 1996, 37, (8), 718-722. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1996.tb00641.x.
- MARTINELLI, G.P., G.R. HOLSTEIN, P. PASIK a B. COHEN. Monoclonal antibodies for ultrastructural visualization of l-baclofen-sensitive GABAB receptor sites. *Neuroscience*. 1992, 46(1), 23-33. DOI: 10.1016/0306-4522(92)90005-M.
- MCCUTCHEON, James Edgar a M. MARINELLI. Age matters. *European Journal of Neuroscience*. 2009, 29(5), 997-1014. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2009.06648.x.
- MELCANGIC, Marzia a N. G. BOWERY. GABA and its receptors in the spinal cord. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1996, 17(12), 457-462. DOI: 10.1016/S0165-6147(96)01013-9.

- MENG, Jin, A. R. WYSS, M. R. DAWSON a R. ZHAI. Primitive fossil rodent from Inner Mongolia and its implications for mammalian phylogeny. *Nature*. 1994, 370(6485), 134-136. DOI: 10.1038/370134a0.
- MESS, Sarah A., S. KIM, S. DAVISON a F. HECKLER. Implantable Baclofen Pump as an Adjuvant in Treatment of Pressure Sores. *Annals of Plastic Surgery*. 2003, 51(5), 465-467. DOI: 10.1097/01.SAP.0000070645.30682.93.
- MORAN, L. R., P. G. ALMEIDA, S. WORDEN a K. M. HUTTNER. Intrauterine Baclofen Exposure: A Multidisciplinary Approach. *PEDIATRICS*. 2004-07-30, 114(2), e267-e269. DOI: 10.1542/peds.114.2.e267.
- MORAN, Lisa R, T. CINCOTTA, K. KRISHNAMOORTHY a R. M. INSOFT. The Use of Baclofen in Full-Term Neonates with Hypertonia. *Journal of Perinatology*. 2005, 25(1), 66-68. DOI: 10.1038/sj.jp.7211194.
- MOTTA, Francesco, C. E ANTONELLO a C. STIGNANI. Intrathecal baclofen and motor function in cerebral palsy. *Developmental Medicine*. 2010, 53(5), 443-448. DOI: 10.1111/j.1469-8749.2010.03904.x.
- NATIONAL CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database: Baclofen. [online]. [cit. 2015-04-20]. CID=2284.
- NOMURA, Sadahiro, Y. KAGAWA, H. KIDA, Y. MARUTA, H. IMOTO, M. FUJII a M. SUZUKI. Effects of intrathecal baclofen therapy on motor and cognitive functions in a rat model of cerebral palsy. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*. 2012, 9(2), 209-215. DOI: 10.3171/2011.10.PEDS11209.
- NOVARTIS, Pharmaceuticals Australia Pty Limited. LIORESAL® Baclofen. In: [online]. 2013-02-22 [cit. 2015-04-20]. Dostupné z: http://www.novartis.com.au/PI_PDF/lrst.pdf
- OGATA, N. a H. ABE. Substance P decreasees membráně conductance in neuron sof the guinea pig hypothalamus in vitro. *Neuropharmacology*. 1982, 21(2), 187-189.

- OVERGARD, T. M., L. K.-HANSEN, M. SOE a N. O. ILLUM. Positive experience with intrathecal baclofen treatment in Hildin with severe cerebral palsy. *Danish Medical Journal*. 1/2015, 62(1), 1-6.
- PANKAKOSKI, Erkki. An improved method for age determinativ in the mokrat, Ondatra zibethice (L.). *Ann. Zool. Fennici*. 1980, 17, 113-121
- PENN, R. D. a J. S. KROIN. Intrathecal baclofen alleviates spinal cord spasticity. *The Lancet*. 1984, 323(8385), 1078. DOI: 10.1016/S0140-6736(84)91487-9.
- HSIEH, J. C. a R. D. PENN. Intrathecal baclofen in the treatment of adult spasticity. *Neurosurgical Focus*. 2006, 21(2), 1-6.
- QUINN, Robert. *Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?*. Nutrition. 2005, 21(6), 775-777.
- RATNAYAKA, B .D. M., H. DHALIWAL a S. WATKIN. Drug points: Neonatal convulsions after withdrawal of baclofen. *BMJ*. 2001-07-14, 323(7304), 85-85. DOI: 10.1136/bmj.323.7304.85.
- RICHTER, C. P. The effects of domestication and selection on teh behavior of the norway rat. *Journal of the National Cancer Institute (Oxford)*. 1954, 15, 727-738.
- RICE, Deborah a S. BARONE. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives*. 2000-06-01, 108(3), 511-533. DOI: 10.1289/ehp.00108s3511.
- ROBBINS, M. J., A. R. CALVER, A. K. FILIPPOV, W. D. HIRST, R. B. RUSSEL, M. D. WOOD, S. NASIR, A. COUVE, D. A. BROWN S. J. MOSS a M. N. PANGALOS. GABA(B2) is essential for g-protein coupling of the GABA(B) receptor heterodimer. *The journal of neuroscience*. 2001-10-15, 21(20), 8043-8052.

- RODBELL, M., H. M. J. KRANS, S. L. POHL a L. BIRNBAUMER. The Glucagon-sensitive Adenyl Cyclase System in Plasma Membranes of Rat Liver. *The Journal of Biological Chemistry*. 1971, 246(6), 1861-1871.
- RODBELL, Martin, J. BAVERSTOCK, J. FYLES, H. SAIBIL, F. BOEGE, E. NEUMANN a E. J. M. HELMREICH. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*. 1980, 284(5751), 69-83. DOI: 10.1007/978-3-642-77200-9_6.
- ROMIJN, Herms J., M. A. HOFMAN a A. GRAMSBERGEN. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby?. *Early Human Development*. 1991, 26(1), 61-67. DOI: 10.1016/0378-3782(91)90044-4.
- SEABROOK, G.R., W. HOWSON a M.G. LACEY. Electrophysiological characterization of potent agonists and antagonists at pre- and postsynaptic GABAB receptors on neurones in rat brain slices. *British Journal of Pharmacology*. 1990, 101(4), 949-957. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb14186.x.
- SENGUPTA, Pallav. A Scientific Review of Age Determination for a Laboratory Rat: How Old is it in Comparison with Human Age?. *Biomedicine International*. 2011, 2, 81-89.
- SENGUPTA, Pallav. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International journal of preventive medicine*. 2013, 4(6), 624-630.
- SHAMSODINI, A., S. AMIRSALARI, M.-T. HOLLISAZ, A. RAHIMNIA a A. KHATIBI-AGHDA. Management of Spasticity in Children with Cerebral Palsy. *Iranian Journal of Pediatrics*. 2014, 24(4), 345-351.
- SHEEAN, G. The pathophysiology of spasticity. *European Journal of Neurology*. 2002, 9(1), 3-9. DOI: 10.1046/j.1468-1331.2002.0090s1003.x.

- SIEGHART, W. Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Pharmacological Reviews*. 07/1995, 47(2), 181-234
- ŠTĚKÁŘOVÁ, I. Léčba spasticity u dospělých. *Medicína pro praxi*. 2012, 9(3), 124-126.
- TOCRIS: Pharmacological Glossary. © Copyright 2015 Tocris Bioscience. [online]. [cit. 2015-04-15].
Dostupné z: <http://www.tocris.com/pharmacologicalglossary.php#.VTc-nCHtmkp>
- TURGEON, S. M. a R. L. ALBIN. *Postnatal ontogeny of GABAB binding in rat brain: Neuroscience*. 1994, 62(2), 601-613. Elsevier Science Ltd. ISBN 10.1016/0306-4522(94)90392-1.
- URWYLER, S., J. MOSBACHER, K. LINGENHOEHL, J. HEID, K. HOFSTETTER, W. FROESTL, B. BETTLER a K. KAUPMANN. Positive allosteric modulation of native and recombinant gamma-aminobutyric acid(B) receptors by 2,6-Di-tert-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. *Molecular Pharmacology*. 2001, 60(5), 963-71.
- URWYLER, S., T. GJONI, J. KOLJATIC a D. DUPUIS. Mechanisms of allosteric modulation at GABA receptors by CGP7930 and GS39783: effects on affinities and efficacies of orthosteric ligands with distinct intrinsic properties. *Neuropharmacology*. 2005, 48(3), 343-353. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2004.10.013.
- VELÍŠKOVÁ, Jana, L. VELÍŠEK a S. L. MOSHÉ. Age-Specific Effects of Baclofen on Pentylentetrazol-Induced Seizures in Developing Rats. *Epilepsia*. 1996, 37, (8), 718-722. DOI: 10.1111/j.1528-1157.1996.tb00641.x.
- VERNEAU, O., F. CATZEFLIS a A. V. FURANO. Determining and dating recent rodent speciation events by using L1 (LINE-1) retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998, 95(19), 11284-11289. DOI: 10.1073/pnas.95.19.11284.

VINAY, Laurent, F. BEN-MABROUK, F. BROCARD, F. CLARAC, C. JEAN-XAVIER, E. PEARLSTEIN a J.-F. PFLIEGER. Perinatal Development of the Motor Systems Involved in Postural Control. *Neural Plasticity*. 2005, 12(2-3), 131-139. DOI: 10.1155/NP.2005.131.

WATANABE, Masahito, K. MAEMURA, K. KANBARA, T. TAMAYAMA a H. HAYASAKI. GABA and GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. *Internationa review of cytology*. 2002, 213, 1-47. DOI: 10.1016/S0074-7696(02)13011-7.

WETHERBY, S. J. M., P. WOOLNER a C. E. CLARKE, Pregnancy in stiff-limb syndrome. *Movement disorders*. 2004, 19(7): 852–854.

WOODWORTH, K., J. PALMATEER, J. SWIDE a M. GRAFE. Short- and long-term behavioral effects of exposure to 21%, 40% and 100% oxygen after perinatal hypoxia–ischemia in the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2011, 29(6), 629-638. DOI 10.1016/j.ijdevneu.2011.05.001.

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Potencionální terapeutické užití ligandů GABA_B receptorů

Příloha č. 2: Následky ovlivnění GABA_B receptorů baclofenem

Příloha č. 3: Open field P18 – skupina A

Příloha č. 4: Open field P18 – skupina B

Příloha č. 5: Open field P18 – skupina C

Příloha č. 6: Hrazda P60 – skupina B

Příloha č. 7: Hrazda P25 – skupina C

Příloha č. 8: Lano P18 – skupina C

Příloha č. 9: Lano P18 – skupina C

PŘÍLOHY

<i>Agonist/positive allosteric effects</i>	<i>Locus of action?</i>	<i>Therapeutic potential</i>
Smooth muscle relaxation	Lung (bladder, intestine)	Antiasthma
Antinociception	Spinal cord, thalamus	Analgesia
Food intake modification	Higher centers	Enhanced feeding
Fat intake reduction	Higher centers	Binge eating
Drug addiction suppression	CNS–mesolimbic system	Drug abuse
Muscle relaxation	Spinal cord	Spasticity
Antitussive action	Cough center in medulla	Cough suppressant
Insulin/glucagon release	Pancreas	Diabetes
Suppression of panic behavior	Dorsal periaqueductal gray	Antianxiety/panic disorder
Neutrophil chemotaxis enhanced	Leucocytes	Inflammation
Oesophageal sphincter relaxation	Intestine	Gastroesophageal reflux disease
Adenylyl cyclase inhibition	Pancreas	Antiadenocarcinoma
<i>Antagonist effects</i>		
Cognitive enhancement	Higher centers	Cognitive deficits
Antiabsence seizures	Thalamocortical region	Absence epilepsy
Antidepressant	Higher centers	Affective disorders

Příloha č. 1: Potencionální terapeutické užití ligandů GABA_B receptorů (převzato z Bowery, 2010)

In vivo and in vitro actions	Clinical adverse effects on systemic administration
Decrease in cognitive function	Drowsiness
Antinociception	Dizziness
Muscle relaxation	Nausea
Panicolytic action	Hypotension
Drug-seeking behaviour suppression	Seizures
Food intake increased	Muscle weakness
Epileptogenesis	Hallucinations
Bronchiolar relaxation	Mental confusion
Hiccup suppression	
Absence seizures exacerbated	
Intestinal peristalsis reduced	
Oviduct and uterine contraction	
Brown fat thermogenesis	
Decrease in hormone and neurotransmitter release	

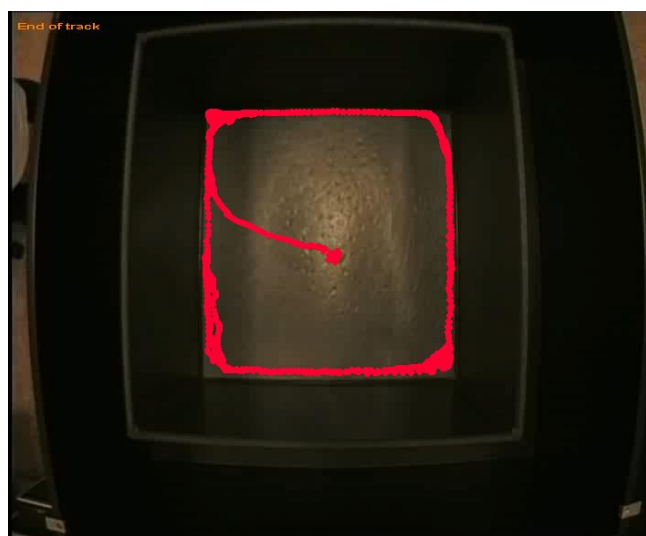
Příloha č. 2: Následky ovlivnění GABA_B receptorů baclofenem (převzato z Bowery, 2006)



Příloha č. 3: Open field - Skupina A
Na snímku zobrazena trajektorie, kterou ušlo osmnáct dnů staré zvíře ze skupiny A



Příloha č. 4: Open field - Skupina B
Snímek zobrazuje trajektorii, kterou vykonalo osmnáct dnů staré zvíře ze skupiny B



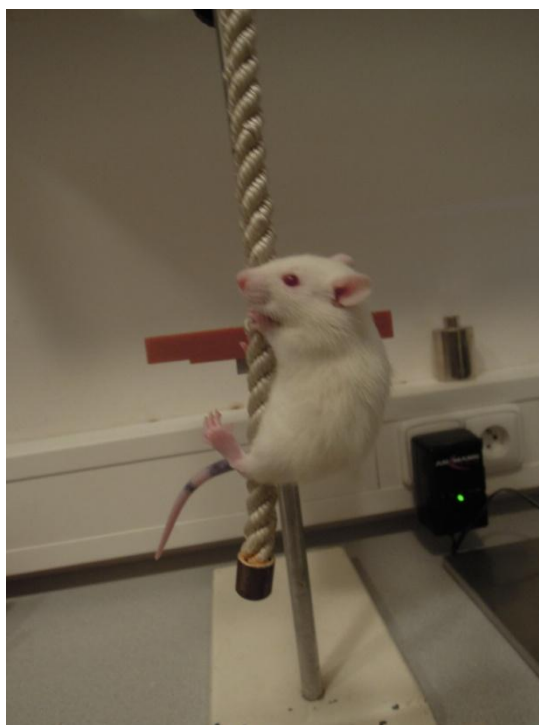
Příloha č. 5: Open field - Skupina C
Snímek zachycuje trajektorii osmnáct dnů starého zvíře ze skupiny C



Příloha č. 6: Hrazda P60 – skupina B Snímek zachycuje dva měsíce staré zvíře ze skupiny B při testování na hrazdě. Je patrné, že zvíře v tomto věku již dosáhne ocasem na zem, čím se snižuje faktor strachu a tedy i čas, po kterou se zvířata na hrazdě udrží.



Příloha č. 7: Hrazda P25 – skupina C Fotografie zachycuje dvacet pět dnů staré zvíře ze skupiny C při testování na hrazdě a s přitaženými zadními končetinami.



Příloha č. 8 a 9: Lano P18 – skupina C Fotografie zachycují osmnáct dnů starého mládě ze skupiny C při testování na laně. Na první fotografii je mládě chvíli po začátku testu. Na druhém snímku se mládě otáčí hlavou dolů.