

Univerzita Karlova v Praze  
Fyziologický ústav AV ČR

Ovlivnění metabotropních glutamátových receptorů jako  
možná antiepileptická léčba. Vývojová studie.

Disertační práce

Praha 2007

PharmDr. Denisa Lojková  
Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.  
Školitel

Děkuji svému školiteli panu prof. MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za zajímavý námět, metodické vedení a podnětné rady v průběhu jeho řešení i celého studia.

Dále bych chtěla poděkovat paní doc. PharmDr. Haně Kubové, DrSc. za umožnění vypracování disertační práce na oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu AV ČR. Ráda bych poděkovala za podporu i odbornou pomoc všem kolegům z našeho oddělení.

---

## Obsah

<b>1. Epilepsie</b>	<b>8</b>
1.1. Definice	8
1.2. Epidemiologie a etiologie	8
1.3. Klasifikace epileptických záchvatů	9
1.3.1. Generalizované záchvaty	9
1.3.2. Parciální záchvaty	9
1.3.3. Neklasifikované záchvaty	10
1.3.4. Status epilepticus	10
1.4. Elektrofyziologické projevy	10
1.5. Patofyziologie epilepsie	10
1.6. Ontogeneze epilepsie	12
1.7. Modely epileptických záchvatů	13
1.7.1. In vivo modely epileptických záchvatů	14
1.7.2. In vitro modely epileptiformní aktivity	15
1.7.3. Preklinické modely záchvatů k testování účinnosti antiepileptik	15
1.8. Farmakoterapie epilepsie	16
<b>2. Glutamátové receptory (GluR)</b>	<b>18</b>
2.1. Glutamát	18
2.2. Ionotropní glutamátové receptory (iGluR)	20
2.2.1. Charakteristika iGluR	20
2.2.2. AMPA receptory	21
2.2.3. Kainátové receptory	22
2.2.4. NMDA receptory	23
2.3. Metabotropní glutamátové receptory (mGluR)	24
2.3.1. Charakteristika mGluR	24
2.3.2. Dělení mGluR	27
2.3.3. Lokalizace mGluR	27

2.3.4. Funkce mGluR	27
2.3.5. Selektivita mGluR agonistů a antagonistů mGluR	29
2.3.5.1. Kompetitivní agonisté a antagonisté	29
2.3.5.2. Nekompetitivní antagonisté	29
2.3.6. Role mGluR v epilepsii	30
2.3.7. Zástupci jednotlivých skupin mGluR	31
2.3.7.1. Skupina I mGluR	31
2.3.7.2. Skupina II mGluR	32
2.3.7.3. Skupina III mGluR	33
2.3.8. Změny mGluR u epilepsie	34
2.3.8.1. Změny mGluR u vybraných zvířecích modelů epilepsie	34
2.3.8.2. Změny mGluR sledované u epileptických pacientů	34
2.3.9. Možnosti mGluR pro využití v léčbě	34
2.3.10. Význam ligandů mGlu receptorů	35
<b>2.4. Použité ligandy GluR v experimentu</b>	<b>36</b>
2.4.1. MPEP	36
2.4.2. MTEP	38
2.4.3. Memantin	39
2.4.4. LY379268	40
2.4.5. MK 801	41
<b>4. Cíl práce</b>	<b>43</b>
<b>5. Metodika</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Experiment 1 - Korové následné výboje</b>	<b>44</b>
5.1.1. Korové následné výboje	44
5.1.2. Použitá zvířata	45
5.1.3. Operace	45
5.1.4. Registrace EEG	47
5.1.4.1. Registrace následných výbojů	47
5.1.4.2. Stanovení prahové intenzity stimulace	47

---

5.1.5. Aplikace ligandů _____	48
5.1.5.1. Aplikace ligandů – MPEP, MTEP _____	48
5.1.5.2. Aplikace ligandů – memantin _____	48
5.1.6. Statistické vyhodnocení _____	49
<b>5.2. Experiment 2 – Evokované potenciály _____</b>	<b>50</b>
5.2.1. Korové evokované potenciály _____	50
5.2.2. Použitá zvířata _____	51
5.2.3. Operace _____	51
5.2.4. Registrace EEG _____	51
5.2.4.1. Vztah mezi intenzitou podnětu a amplitudou odpovědi _____	51
5.2.4.2. Párové potenciace _____	51
5.2.5. Aplikace ligandů - memantin _____	52
5.2.6. Statistické vyhodnocení _____	53
<b>5.3. Experiment 3 – Model absencí _____</b>	<b>54</b>
5.3.1. Model generalizovaných záchvatů typu absencí _____	54
5.3.2. Použitá zvířata _____	55
5.3.3. Operace _____	55
5.3.4. Registrace EEG _____	56
5.3.5. Aplikace ligandů - MPEP, pentetrazol _____	56
5.3.6. Statistické vyhodnocení _____	57
<b>5.4. Experiment 4 – Monitoring EEG _____</b>	<b>58</b>
5.4.1. Monitoring EEG _____	58
5.4.2. Použitá zvířata _____	58
5.4.3. Operace _____	58
5.4.4. Registrace EEG _____	58
5.4.4.1. Registrace EEG – 2 hod záznam _____	58
5.4.4.2. Registrace EEG – 24 hod záznam _____	59
5.4.5. Aplikace ligandů - MPEP _____	59
5.4.6. Statistické vyhodnocení _____	60
<b>5.5. Experiment 5 – Morfologická studie _____</b>	<b>61</b>
5.5.1. Morfologická studie _____	61

---

5.5.2. Použitá zvířata _____	61
5.5.3. Histologická procedura _____	61
5.5.4. Hodnocení _____	62
5.5.5. Aplikace ligandů - MPEP, MK 801 _____	63
<b>5.6. Experiment 6 – Model generalizovaných záchvatů _____</b>	<b>64</b>
5.6.1. Model generalizovaných tonicko-klonických záchvatů _____	64
5.6.2. Použitá zvířata _____	64
5.6.3. Pozorování _____	64
5.6.4. Aplikace ligandů - LY379268 _____	65
5.6.5. Statistické vyhodnocení _____	65
<b>6. Výsledky _____</b>	<b>67</b>
<b>6.1. Experiment 1 - Korové následné výboje _____</b>	<b>67</b>
6.1.1. Registrace následných výbojů _____	67
6.1.1.1. MPEP _____	73
6.1.1.2. MTEP _____	60
6.1.2. Stanovení prahové intenzity stimulace“ _____	76
6.1.2.1. Memantin _____	76
<b>6.2. Experiment 2 – Evokované potenciály _____</b>	<b>80</b>
6.2.1. Vztah mezi intenzitou podnětu a amplitudou odpovědi - memnatin _____	80
6.2.2. Párová potenciace - memnatin _____	82
<b>6.3. Experiment 3 – Model absencí _____</b>	<b>83</b>
6.3.1. Registrace EEG u penterazolového modelu - MPEP _____	83
<b>6.4. Experiment 4 – Monitoring EEG _____</b>	<b>86</b>
6.4.1. Registrace EEG – 2 hod záznam - MPEP _____	86
6.4.2. Registrace EEG – 24 hod záznam - MPEP _____	88
<b>6.5. Experiment 5 – Morfologická studie _____</b>	<b>91</b>
6.5.1. Vyhodnocení morfologických změn _____	91
6.5.1.1. MPEP _____	91
6.5.1.2. MK 801 _____	91
<b>6.6. Experiment 6 – Model generalizovaných záchvatů _____</b>	<b>93</b>

6.6.1. Vyhodnocení generalizovaných tonicko-klonických záchvatů \_\_ 93

**7. Diskuse** \_\_\_\_\_ **98**

7.1. Antikonvulzivní účinek MPEP \_\_\_\_\_ 98

7.2. Antikonvulzivní účinek MTEP \_\_\_\_\_ 103

7.3. Antikonvulzivní účinek Memantinu \_\_\_\_\_ 105

7.4. Antikonvulzivní účinek LY376268 \_\_\_\_\_ 108

**8. Shrnutí** \_\_\_\_\_ **111**

**9. Závěr** \_\_\_\_\_ **113**

**10. Literatura** \_\_\_\_\_ **114**

# 1. Epilepsie

## 1.1. Definice

Epilepsie je chronické onemocnění charakterizované opakovanými, obvykle spontánními, paroxysmálními epizodami v mozku, které se manifestují změnami chování (Engel et al., 1998; Shneker a Fountain, 2003). Epileptický záchvat, jakožto klinická manifestace epilepsie, pochází z nadměrné a synchronní činnosti skupiny neuronů v mozku. Tato abnormální paroxysmální aktivita je většinou přechodná a sama odezní (Engel et al., 1998), často však zahrnuje změny vědomí, sensomotorických a autonomních funkcí (ILAE Commission, 1997). Termín epilepsie zahrnuje skupinu specifických epileptických syndromů, které byly klasifikovány dle charakteru a opakování záchvatů, věku výskytu, přidružených klinických znaků, elektroencefalografického (EEG) obrazu, rodinné anamnézy a prognózy (Engel et al., 1998; Shneker a Fountain, 2003).

## 1.2. Epidemiologie a etiologie

Epilepsie se může projevit v jakémkoliv věku, avšak incidence i prevalence onemocnění je nejvyšší v dětství a ve staří. Prevalence epilepsie v populaci tvoří pouze 1 až 3 % u dospělých jedinců, ale až 10 % populace může mít zkušenost s jedním epileptickým záchvatem, především v dětském věku nebo období dospívání (Hauser, 1994; ILAE Commission, 1997; Shneker a Fountain, 2003). Epileptické syndromy představují jeden z nejčastěji se vyskytujících neurologických problémů u dětí. Incidence věkově závislé epilepsie je nejvyšší mezi prvním a druhým rokem života, po tomto období výrazně klesá, druhý vzestup přichází po šedesátém roce života. V dětském věku začíná téměř 50% všech případů epilepsie. Epilepsie manifestující se generalizovanými záchvaty je nejčastěji diagnostikovaným typem epilepsie do pěti let života, fokální typy záchvatů se vyskytují více v pozdějším období (Hauser, 1994; Eriksson a Koivikko, 1997).

Základní rozdělení epilepsií a epileptických syndromů je na idiopatické a



symptomatické. Idiopatické epilepsie nejsou spojené se známou etiologií. Významnou roli hrají genetické faktory, pro výskyt je typická návaznost na věk a obvykle dobře reagují na farmakoterapii. U symptomatických epilepsií jsou záchvaty způsobené následkem konkrétního poškození mozku (poranění mozku, infekce apod.) nebo jiné specifické etiologie. (Engel et al., 1998; ILAE Commission, 1997).

### **1.3. Klasifikace epileptických záchvatů**

Mezinárodní klasifikace epileptických záchvatů (ILAE z r. 1981) rozlišuje dvě základní kategorie založené na původu abnormálních elektrických výbojů. Tyto dvě obecné kategorie jsou tvořeny generalizovanými a parciálními záchvaty (ILAE Commission, 1997; Luders et al., 1998; Badawy et al., 2007).

#### **1.3.1. Generalizované záchvaty**

Generalizované záchvaty jsou takové, u kterých klinické projevy od počátku záchvatu souvisí s účastí obou hemisfér mozku. Vědomí bývá změněno, motorické projevy a složky EEG během záchvatu jsou bilaterální. (Engel et al., 1998; ILAE Commission, 1997). Mezi hlavní tři podtypy generalizovaných záchvatů patří: generalizované konvulzivní záchvaty (atonické, tonické, klonické nebo tonicko-klonické), dále generalizované nekonvulzivní záchvaty zastoupené absencemi (typickými a atypickými) a v neposlední řadě myoklonické záchvaty (ILAE Commission, 1997; Dolanský, 2000).

#### **1.3.2. Parciální záchvaty**

Parciální záchvaty jsou takové, u kterých první klinické a encefalografické příznaky vycházejí z aktivace neuronů části jedné hemisféry, a to bez ohledu na sekundární generalizaci záchvatu (De Curtis a Avanzini, 2001; ILAE Commission, 1997). Parciální záchvaty se dělí do tří základních kategorií, tzn. na jednoduché (simplexní) parciální záchvaty, u kterých není porušeno vědomí během záchvatu, na komplexní parciální záchvaty, kde je přítomna porucha vědomí, a dále na sekundárně generalizované (simplexní i komplexní) parciální záchvaty (ILAE

---

Commission, 1997).

### **1.3.3. Neklasifikované epileptické záchvaty**

Do této skupiny se řadí záchvaty, které nemohou být jednoznačně klasifikované kvůli nedostatku jednoznačných informací nebo se vymykají dosud popsaným kategoriím, př. neonatální záchvaty (Engel et al., 1998; ILAE Commission, 1997).

### **1.3.4. Status epilepticus**

Status epilepticus je definován jako kontinuální záchvat nebo takové nakupení záchvatů kde se činnost mozku mezi záchvaty nevrací do normálu, trvající déle než 30 min a vedoucí k poškození neuronů. V podstatě jakýkoliv typ záchvatu může přejít ve status epilepticus. Za přechod epileptického záchvatu do statusu pravděpodobně zodpovídá selhání autoregulačních mechanismů, které jsou za normálních okolností schopny v určitém časovém momentu záchvat ukončit (Luders et al., 1998; Dolanský, 2000).

## **1.4. Elektrofyziologické projevy epileptických záchvatů**

Elektroencefalogram (EEG) zůstává nejužitečnější diagnostickou metodou u epilepsie. EEG hraje důležitou roli v klasifikaci typu záchvatu nebo epileptického syndromu a rozlišování epileptických a neepileptických fenoménů. EEG pomáhá určit odkud záchvat vychází, frekvenci jejich výskytu a efektivnost terapie (Mareš, 1973; Mosché a Pedley, 1998). Elektrickou aktivitu mozku během záchvatu lze snímat pomocí skalpových nebo intracerebrálních elektrod, tzn. záznam z mozkové kůry nebo např. z talamu, hipokampální formace. Iktální aktivita korového EEG se jeví jako synchronizované rytmické ostré vlny nebo komplexy hrot-vlna s vysokou amplitudou (Buszaki a Traub, 1998; Dinner et al., 2002).

## **1.5. Patofyziologie epilepsie**

Většina epileptických záchvatů vychází z korových a hipokampálních struktur, klinické projevy záchvatu závisí na místě vzniku a jeho šíření.

---

Epileptické záchvaty jsou výsledkem synchronních nepřiměřených výbojů v populaci hyperexcitabilních neuronů (Avanzini a Franceschetti, 2003; Nair et al., 2004). Poruchy v excitabilitě neuronů tvoří základ procesu epileptogeneze. Epileptogenní vlastnosti neuronální tkáně mohou být dány dvěmi základními skupinami změn tkáně. První je abnormální excitabilita neuronů, která je výsledkem porušených depolarizačních a repolarizačních mechanismů u jednotlivých buněk (neuronální deregulace). Druhou je poškozená konektivita neuronální sítě vycházející např. z mechanismů chybné neuronální integrace, abnormální synchronizace populace hyperexcitabilních neuronů apod., která může vést k šíření epileptických výbojů na další neurony (Engel, 1998; Olsen a Avoli, 1997; White, 2002; Avanzini a Franceschetti, 2003; Matsumoto et al., 2007).

Takzvané epileptické neurony se nacházející v neuronálním seskupení tvořícím epileptický agregát, ze kterého současně vycházejí salvy synchronních výbojů akčních potenciálů. Spolehlivým ukazatelem epileptogenních ohnisek jsou paroxysmální depolarizační posuny (paroxysmal depolarisation shift; PDS), protrahované depolarizace na nichž vznikají salvy akčních potenciálů. Ty byly studovány na modelech fokálních epilepsií (De Curtis a Avanzini, 2001; Franceschetti et al., 1995; Avanzini a Franceschetti, 2003).

Při příchodu impulzu na synaptické zakončení dochází k uvolnění neurotransmiteru, které vede k aktivaci iontových kanálů na postsynaptické membráně. Přenosem iontů přes membránu se změní postsynaptický potenciál. Při přenosu signálu přes excitační synapsi se vytváří excitační postsynaptický potenciál (EPSP), inhibiční synapse umožňují vzniknout inhibičnímu postsynaptickému potenciálu (IPSP) (Holmes, 1997; Buszaki a Traub, 1998). U PDS je depolarizace membrány masivnější než při EPSP. Typická je série rychlých akčních potenciálů ( $\text{Na}^+$  kanály), dochází k prolongované depolarizaci membrány neuronu, za jejichž trvání zodpovídají  $\text{Ca}^{2+}$  a následuje prolongovaná hyperpolarizace ( $\text{K}^+$  kanály). V experimentu je možné blokováním inhibiční nebo potenciací excitační transmise indukovat aktivitu podobnou PDS u buněk v kortexu (Engel et al., 1998; De Curtis a Avanzini, 2001; Avanzini a

Franceschetti, 2003).

Zjednodušeně řečeno, epileptické záchvaty vznikají na základě nadměrné excitace nebo nedostatečné inhibice při neadekvátní regulaci těchto dějů (Olsen a Avoli, 1997; Engel., 1998; Badawy et al., 2007). Pro modulování neuronální excitability je v první řadě důležitá extracelulární koncentrace iontů (především  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Na^+$ ) a funkce i funkčnost příslušných iontových kanálů. Membránové vlastnosti neuronů jsou determinovány selektivní permeabilitou pro uvedené ionty. Mechanismus účinku většiny antiepileptik je zprostředkován ovlivněním aktivity těchto kanálů (Avanzini, 1995; Avanzini a Franceschetti, 2003). Další podstatnou roli pro excitabilitu neuronů hrají inhibiční i excitační neurotransmitery a neuromodulátory. Hlavním excitačními neurotransmitery v mozku jsou glutamát a aspartát, inhibičními jsou GABA ( $\gamma$ -amino máselná kyselina) a glycin. Funkci neuromodulátorů u epileptických fenoménů mají např. adenosin, opioidy, neurosteroidy apod. (Rogawski a Löscher, 2004). Neurotransmitery i neuromodulátory se vážou na příslušné receptory, jako jsou např. ionotropní  $GABA_A$  ( $Cl^-$  kanály), metabotropní  $GABA_B$  a později objevené ionotropní  $GABA_C$  receptory. Řada ligandů těchto receptorů se používá v léčbě epilepsie (Olsen a Avoli, 1997). Další skupinu tvoří pak glutamátové ionotropní (NMDA, AMPA, kainátové) a metabotropní receptory, jejichž agonisté a antagonisté mají potenciál v antikonvulzivní terapii (De Curtis a Avanzini, 2001; Avanzini a Franceschetti, 2003).

Mezi mechanismy, které pravděpodobně zodpovídají za ukončení záchvatové aktivity, patří aktivace inhibičních systémů, desynchronizace aktivity, vyčerpání mediátorů apod. (Engel, 1998).

## 1.6. Ontogeneze epilepsie

Klinická i experimentální data ukazují, že nezralý mozek je snadněji generuje epileptickou aktivitu a incidence záchvatů je nejvyšší v dětském věku (Mareš et al., 1992; Jensen, 1999).

Nezralý mozek se značně liší od zralého v etiologii, epileptogenezi, frekvenci, trvání a šíření záchvatů, dále v behaviorálních parametrech, EEG fenoménech,

následcích záchvatů a v odpovědi na užívaná antiepileptika (Franceschetti et al., 1995; Holmes, 1997; Kubová, 1999). Jednotlivá věková stádia se během vývoje mozkových struktur mohou lišit od mozku dospělého jedince v řadě parametrů např. ve vyšší sensitivitě nezralých neuronů k excitačním aminokyselinám, vyšší expresi glutamátových receptorů, nedostatečné zralosti inhibičních mechanismů, rozdílu v expresi iontových kanálů, změnách v podjednotkovém složení receptorů atd. (Spreafico et al., 1994; Holmes, 1997; Jablonska et al., 1998; Kubová, 1999; Mareš, 1999a, 2001). Rovněž v epileptogenezi nezralého mozku hraje roli stupeň vyzrálости synapsí, postupné myelinizace, vývoje glie a hematoencefalické bariéry atd. (Mareš, 1973; Wasterlain, 1997; Holmes et al., 1999; Jensen, 1999; Kubová, 1999; Ilnatovych et al., 2002; White, 2002). Větší náchylnost nezralého mozku k záchvatům může být způsobena nerovnováhou mezi dozráváním excitačních a inhibičních synaptických mechanismů (Holmes, 1997; Mareš, 1999b).

Vývoj centrálního nervového systému značně ovlivňuje citlivost na jednotlivá léčiva. Na základě zjištění, že nezralý mozek reaguje jinak na řadu antiepileptik než mozek zralý, je třeba testovat účinnost a bezpečnost nových antikonvulzivních látek také na mláďatech (Holmes, 1997; Jensen, 1999; Kubová, 1999).

### **1.7. Modely epileptických záchvatů**

Studie na zvířatech výrazně přispěly k pochopení epileptogeneze a mechanismu účinku antiepileptik. Adekvátnost animálních modelů vzhledem k humánním epilepsiím závisí na tom, jak věrně se podobají klinickým projevům a EEG fenoménům humánní formy. Definice animálního modelu epilepsie se vztahuje ke zvířatům, která mají opakované persistující záchvaty, spontánní (geneticky podmíněné) nebo vyvolané iniciálním insultem. U akutních in vivo experimentů a in vitro experimentů studujeme modely záchvatů případně epileptogenních mechanismů. Adekvátnost modelu použitého ke studiu mechanismů epileptogeneze a účinku léčiv závisí i na informaci, kterou chceme získat (Avanzini, 1995).

### 1.7.1. In vivo modely epileptických záchvatů

Modely epileptických záchvatů u zvířat se dělí na indukované, „reaktivní“ (u intaktních zvířat), které lze vyvolat farmakologicky nebo elektrickou stimulací; na spontánní, geneticky podmíněné a získané působením počátečního insultu.

Konvulzivní agens, produkující akutní záchvaty (tj. dočasná epileptiformní aktivita) při různém způsobu aplikace (systémovém či lokálním), nejčastějším mechanismem účinku je blokáda inhibiční nebo zesílení excitační neurotransmise. Záchvaty, dle použitého agens a způsobu aplikace, mohou být fokální i primárně nebo sekundárně generalizované a jejich behaviorální, EEG, metabolické, neuropatologické charakteristiky jsou věkově závislé. Takové záchvaty reprezentují modely jednoduchých i komplexních parciálních záchvatů, generalizovaných tonicko-klonických, myoklonických záchvatů, absencí (Velíšek, 2006). Akutní záchvaty (vyvolané elektrickou stimulací) je možné dělit na základě intenzity a lokalizace stimulu, a to na stimulace celého mozku (tzv. maximální elektrošok, MES) nebo na lokální stimulace určité struktury. Záchvaty vyvolané u potkanů modelují různé typy humánních záchvatů, např. MES je obecně akceptovaným modelem generalizovaných tonicko-klonických záchvatů. Stimulace limbických struktur modeluje humánní komplexní parciální záchvaty, stimulace sensomotorické kůry reprezentuje model fokálních motorických nebo myoklonických záchvatů atd. (Mareš a Kubová, 2006).

Geneticky podmíněné modely epileptických záchvatů u myši a potkanů (inbrední kmeny hlodavců, transgenní zvířata, knock-out modely) reprezentují svými EEG a behaviorálními koreláty i farmakologickým profilem různé typy lidských epilepsií, např. absence (Cortez a Snead, 2006).

Modely získané následkem léze, hypoxického poškození, epileptického statu, prodělané infekce CNS, elektrického nebo chemického kindlingu apod. Pochopení molekulárních a genetických podkladů u získaných epilepsií povede k nalezení takové terapie, která by mohla zabránit rozvoji epilepsie u náchylných jedinců (White, 2002; Morimoto et al., 2004). Typickým příkladem může být model humánní meziální temporální epilepsie vyvolané kindlingem (opakovaná subkonvulzivní stimulace limbických struktur), model statu epilepticu, poranění

---

mozku, hypoxickém poškození u mláďat apod. (White, 2002; Morimoto et al., 2004).

Oba tyto typy patří do skupiny chronických modelů, které umožňují studovat epileptogenezi a antikonvulzivní potenciál nových terapeutik (White, 2002; Engel a Schwartzkroin, 2006).

### **1.7.2. In vitro modely epileptiformní aktivity**

Trendem v moderních neurovědách je vyvinout zjednodušený model, který představuje vlastnosti neuronální sítě, a který povede k porozumění rozvoje epileptiformní aktivity. Studie in vitro se zaměřují na vlastnosti jednotlivých buněk a interakce mezi nimi. Použití in vitro modelu je dostatečně komplexní k vyjádření důležitých epileptiformních fenoménů populace buněk a jsou dostatečně jednoduché k pochopení buněčných a synaptických elektrofyziologických dat. Samozřejmě data z in vitro modelu se specificky liší od podmínek in vivo, především ve ztrátě propojení s dalšími oblastmi mozku. Do epileptického záchvatu je totiž začleněn velký počet neuronů a přímo nebo nepřímo celý mozek (Traub a Jefferys, 1998).

Vznik záchvatu v intaktním mozku závisí na synchronizovaných výbojích populace neuronů. V in vitro modelech mohou být synchronizované výboje vyvolány řadou způsobů např. ovlivněním koncentrace iontů prostředí, ovlivněním receptorů (př. glutamátových, GABAergních) specifickými ligandy atd. In vitro modely zahrnují mozkové řezy (např. hipokampové), buněčné kultury, organotypické řezy, disociované nervové buňky apod. (Traub a Jefferys, 1998; Dichter a Pollard, 2006; Thompson et al., 2006).

In vitro modely mají význam i při hledání nových antiepileptik, kde je důležité pochopení celulárních mechanismů (Traub a Jefferys, 1998).

### **1.7.3. Preklinické modely záchvatů k testování účinnosti antiepileptik**

Klasickými testy, které jsou předepsány při hledání nových antikonvulziv, jsou maximální elektrošok (MES) a pentetrazolový (PTZ) test. Tyto dva přístupy, každý však jiným mechanismem, vytvořily základní systém zkoušek účinku

---

potenciálních antikonvulziv (používány farmaceutickými firmami) (White, 2002; Mareš a Kubová, 2006). MES testuje antikonvulziva ovlivňující transport  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, např. fenytoin, karbamazepin, lamotrigin, atd. PTZ identifikuje zejména účinek antikonvulziv založený na posílení GABAergní inhibice, např. benzodiazepiny, tiababin, gabapentin apod. (Meldrum, 2002; White, et al., 2006).

## 1.8. Farmakoterapie epilepsie

Antiepileptika (AE) jsou léčiva, která mají široké spektrum použití u rozličných patologických stavů, nejen u symptomatické léčby různých forem epilepsie, ale i behaviorálních a psychiatrických onemocnění, neuropatické bolesti apod. (Meldrum a Chapman, 1999; Zárubová, 1999; Kohl a Dannhardt, 2001).

Spektrum účinnosti antiepileptik je omezeno na jeden nebo více typů záchvatu, z čehož plyne opodstatněnost zkoumání mechanismů vzniku záchvatu i mechanismu účinku antiepileptik. Dalším důvodem pro hledání nových antiepileptik je fakt, že většina konvenčních antiepileptik vykazuje nepříznivé vedlejší účinky a rozvoj tolerance, některé formy epilepsie jsou resistantní k běžně užívaným antiepileptikům (až 30%), (Zárubová, 1999; Kohl a Dannhardt, 2001; French et al., 2004; Pitkänen a Kubová, 2004; Löscher a Schmidt, 2006).

Antiepileptika brání vzniku a omezují šíření epileptického výboje v CNS. V současnosti používaná léčiva působí čtyřmi základními mechanismy, kombinovaný mechanismus účinku je výhodou. Přímé působení antiepileptik na neuronální membránu vede ke snížení permeability napětově řízených  $\text{Na}^+$  kanálů (např. fenytoin, karbamazepin, valproát, lamotrigine atd.) nebo  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů – př. L, N i T typu (např. fenytoin, valproát, ethosuximid). Antiepileptika mohou rovněž zesílit působení inhibičních aminokyselin jako jsou GABA (př. benzodiazepiny, fenobarbital, valproát, felbamát, tiagabin) a glycin; nebo oslabit působení excitačních aminokyselin glutamátu a aspartátu (např. felbamát, lamotrigin, topiramát) (Meldrum a Chapman, 1999; Zárubová, 1999; Deckers et al., 2000; Meldrum, 2002; Landmark, 2007). Antiepileptický efekt se může rovněž uplatnit u ligandů ovlivňujících i jiné transmitterové systémy, a to monoaminy,



katecholaminy, serotonin, histamin, neuropeptidy, opioidy, adenosin a další, i u látek působících na draslíkové kanály (Rogawski a Löscher, 2004).

Používaná antiepileptika jsou strukturálně různorodé látky a působí odlišnými mechanismy. Volba antiepileptika je určena správně stanoveným typem epilepsie. Obecně pro parciální záchvaty je lékem první volby karbamazepin, pro generalizované záchvaty valproát. Pro absence se většinou užívá ethosuximid nebo valproát. Pro myoklonické záchvaty se používá klonazepam, ethosuximid a valproát. Při neúspěšné monoterapii se používá kombinovaná léčba. Léčba epileptického statu vyžaduje okamžitý zásah, podává se nejčastěji diazepam nebo fenytoin (Zárubová, 1999).

Antiepileptika začala psát svou historii v 19. století, přes veškeré snahy zatím nebylo objeveno antikonvulzivum s ideálními vlastnostmi. Hlavním cílem ve výzkumu antiepileptik je vyvinout léčivo s vyšším antikonvulzivní účinkem a menší toxicitou (Zárubová, 1999; Löscher, 2002).

Od doby, co je zřejmé, že glutamátové receptory hrají klíčovou roli ve vzniku a šíření epileptických záchvatů, jsou ligandy těchto receptorů středem zájmu pro možné terapeutické využití. Dnes již existují látky ovlivňující GluR, které se používají v klinické praxi pro léčbu epilepsie (př. iGluR: felbamát, remacemid), další látky jsou v klinických zkouškách, V současnosti jsou předmětem hledání subtypově selektivní ligandy GluR pro další využití těchto v klinice s ohledem na kombinovanou terapii s klasickými antiepileptiky (Kleinrok et al., 1995; Deckers et al., 2000; Kohl a Dannhardt, 2001; Tzschentke, 2002).

## 2. Glutamátové receptory (mGluR)

Glutamát a aspartát, jsou hlavními excitačními aminokyselinami v nervovém systému (Wang et al., 2006), ovlivňují membránové receptory a otvírají iontové kanály, tím depolarizují klidovou membránu a iniciují vznik akčního potenciálu (Meldrum, 1991a). Anomálie v neurotransmisi zprostředkované excitačními aminokyselinami se podílejí na vzniku abnormálních neuronálních výbojů, což může vést k záchvatovým projevům (Meldrum, 1991a). Většina epileptických záchvatů je způsobena nerovnováhou mezi excitačními a inhibičními ději v CNS ve smyslu převahy excitace (Doherty a Dingledine, 2002). Inhibiční procesy v mozku jsou především zprostředkovány kyselinou  $\gamma$ -aminomáselnou (GABA) (Meldrum, 1991a), která je tak hlavní protiváhou excitačních aminokyselin.

Způsoby, jakými lze dosáhnout obnovení rovnováhy mezi excitací a inhibicí, jsou potlačení excitačních dějů např. inhibicí uvolňování glutamátu nebo blokováním jeho vazebného místa na receptoru antagonisty nebo posílení inhibičních systémů nejčastěji GABAergní transmise (Meldrum, 1991a; Mareš et al., 2004; Rajendra et al., 2004).

Glutamát reguluje činnost v nervového systému vazbou na specifické receptory, které se dělí do dvou základních typů - na ionotropní a metabotropní a každý z receptorů těchto skupin je dáván do souvislosti s epileptickou aktivitou (Hollmann a Heinemann, 1994; Alagille et al., 2005a). Ionotropní receptory aktivované glutamátem přímo otvírají iontové kanály, zatím co metabotropní receptory jsou spřažené s G-proteinem a s následnou aktivací druhých posílů (Gasparini et al., 2002a).

### 2.1. Glutamát

Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem v CNS, uvolňuje se z presynaptického zakončení a váže se jak na ionotropní receptory, tak na metabotropní receptory (Hollmann a Heinemann, 1994). Ionotropní glutamátové receptory (iGluR) aktivují nebo inaktivují iontové kanály, zatím co metabotropní

---

glutamátové receptory (mGluR) jsou spřažené s G-proteinem, čili do transdukčních mechanismů je začleněna reakce, která vede k fosfoinositolové hydrolýze nebo snížení aktivity adenylát cyklazy (Gasparini et al., 2002b).

Glutamát se nachází v celém savčím mozku ve vysoké koncentraci (10 mM) a účastní se řady metabolických procesů (Meldrum et al., 1999a).

Je syntetizován v presynaptických zakončeních především z glutaminu fosforylovanou glutaminázou, rovněž z 2-oxoglutarátu glutamátdehydrogenázou nebo 2-oxoglutarát aminotransferázou (Kvamme, 1998; Burbaeva et al., 2003). Glutamát je skladován v synaptických vezikulech, do kterých je přenášen specifickým transportérem závislým na  $Mg^{2+}$ -ATPáze a protonovém gradientu. Po uvolnění do synaptické štěrbině se váže na postsynaptické i presynaptické receptory a na neuronální i gliální transportéry. V glii je glutamát konvertován glutaminsyntetázou na glutamin, který difunduje zpět přes extracelulární prostředí do neuronu (Meldrum et al., 1999a; Burbaeva et al., 2003).

Extracelulární koncentrace glutamátu je běžně velmi nízká (1  $\mu$ M), v synaptické štěrbině jeho koncentrace vzrůstá na hodnoty kolem 1 mM, které jsou dostatečné pro aktivaci AMPA receptorů (Meldrum et al., 1999a).

Glutamát je zodpovědný za rychlý excitační postsynaptický potenciál na většině synapsí v CNS (Meldrum et al., 1999a) a hraje klíčovou roli v epileptogenezi, nadměrná stimulace ionotropních glutamátových receptorů vede ke konvulzivním projevům (Trist, 2000).

Předpokládá se, že abnormality v transportu glutamátu, v expresi glutamátových receptorů, funkci nebo uvolňování glutamátu ze synapse přispívají k epileptickým fenoménům (Meldrum et al., 1999a). Navíc změny v glutamatergní transmissi jsou spojeny s řadou dalších patologických procesů v CNS, jako je např. ischemie mozku, chronická neurodegenerace, chronická bolest, deprese, léková závislost, Parkinsonova choroba, schizofrenie (Trist, 2000; Rajendra et al., 2004).

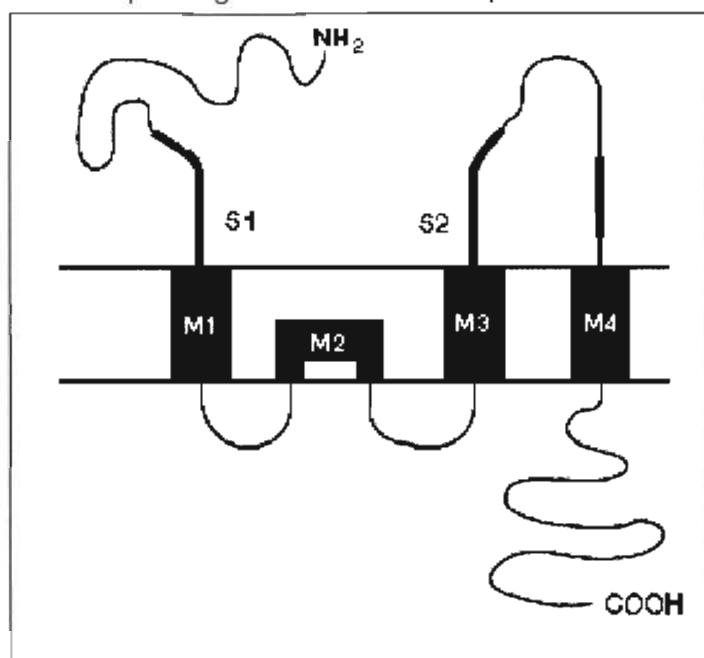
## 2.2. Ionotropní glutamátové receptory

### 2.2.1. Charakteristika iGlu receptorů

Ionotropní glutamátové receptory (iGluR) se dělí na tři hlavní podskupiny dle své strukturální heterogenity a dle schopnosti vázat specifické agonisty a antagonisty (Trist, 2000). Tyto tři hlavní podskupiny tvoří AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazol propionát), kainátové a NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptory. První dvě skupiny se na základě podobných vlastností označují také jako non-NMDA receptory (Dingledine, 1999).

IGluR obsahují 3 transmembránové domény (M1, M3 a M4) a intracelulární („re-entrant“) membránovou smyčku (M2), která jednoznačně definuje iontovou selektivitu daného kanálu. Velký extracelulární N-konec domény zahrnuje nezbytný komponent, glutamátové vazebné místo (S1), smyčka na M3 a M4 transmembránové domény obsahuje druhé glutamátové vazebné místo (S2) (obr. 1). C-terminus je zapojen do signální transdukce a moduluje receptorovou aktivitu (Bigge, 1999).

**Obr. 1:** Schéma ionotropního glutamátového receptoru



Bigge, 1999

### 2.2.2. AMPA receptory

AMPA receptory zprostředkovávají rychlý excitační přenos v CNS prudkou depolarizací postsynaptické membrány. To je způsobeno otevřením kanálů dostupných pro monovalentní ionty  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$ , u některých podtypů i pro bivalentní ionty  $\text{Ca}^{2+}$  (Pellegrini-Giampietro et al., 1997; Bigge, 1999; Rajendra et al., 2004). Dostatečná míra depolarizace aktivuje NMDA receptory uvolněním  $\text{Mg}^{2+}$  (Stromgaard et al., 2004). Desenzitizace AMPA nastává rychle za přítomnosti glutamátu (Bigge, 1999).

AMPA receptory jsou složeny z čtyř nebo pěti podjednotek (GluR1-4), které jsou různě kombinované, nejčastěji však z GluR2 a GluR1 nebo GluR3, mohou mít i homomerní složení z GluR1. Receptory, jejichž součástí nejsou GluR2 podjednotky, jsou propustné i pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Pellegrini-Giampietro et al., 1997). Během ontogeneze se v mozkových strukturách mění exprese jednotlivých podjednotek AMPA receptorů. Zastoupení kanálů propustných pro  $\text{Ca}^{2+}$  klesá s věkem (Lujan et al., 2005).

AMPA receptory jsou nejvíce zastoupeny v mozkové kůře, hipokampu a mozečku (Pellegrini-Giampietro et al., 1997).

V případě AMPA receptorů doposud nebyl identifikován agonista, který by vykazoval výraznou selektivitu. V současné době se k agonistům řadí AMPA (kyselina  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionová), glutamát a (S)-5-fluorowillardiin (Wong et al., 1994). Důležitá skupina nekompetitivních antagonistů AMPA receptorů je zastoupena 2,3-benzodiazepiny které, na rozdíl od 1,4-benzodiazepínů, nemají afinitu ke GABA receptorům, nejúčinnějším antagonistou je GYKI 53655 (Dingledine et al., 1999). Ph TX-56 (philathotoxin-56, derivát nativního polyaminového vosího toxinu) je selektivním nekompetitivním antagonistou AMPA receptorů propustných pro  $\text{Ca}^{2+}$  (Andersen et al., 2005). Mezi kompetitivní antagonisty se řadí analog AMPA, ATPO který je kompetitivním inhibitorem. Dalšími kompetitivními antagonisty AMPA receptorů jsou quinoxalindiony CNQX a DNQX, které se ale vážou i na glycinové místo NMDA receptoru, NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamolybenzoquinoxalin) (Dingledine et al., 1999) a YM872 ([2,3-dioxo-7-(1H-imodazol-1-yl)-6-nitro-

1,2,3,4-tetrahydro-1-quinolinylnyl]-acetic acid monohydrate). Výhodou YM872 oproti jiným antagonistům AMPA je dobrá rozpustnost ve vodě (Hara et al., 2006).

### 2.2.3. Kainátové receptory

Kainátové receptory zprostředkovávají glutamatergní rychlý excitační přenos, u „dospělého“ receptoru jsou primárně permeabilní pouze pro  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  ionty. Rovněž koexistují s NMDA receptory, a tak zesilují glutamatergní signál (Löscher, 1998; Rajendra et al., 2004).

Exprese všech podjednotek kainátových receptorů vrcholí v pozdním embryonálním a ranném postnatálním období (Lujan et al., 2005).

Kainátové receptory jsou tetramerní nebo pentamerní kombinace jednotlivých podjednotek receptoru, a to GluR5-7 a KA 1-2. KA podjednotky tvoří pouze heteromerní kanály (Isaac et al., 2004).

Heteromerní kombinace GluR6/KA2 mají i slabou AMPA senzitivitu, GluR5-7 koresponduje s nízkoafinitním KA místem, zatímco KA 1-2 koresponduje s vysokoafinitním KA místem (Trist, 2000; Isaac et al., 2004).

Kainát vážící podjednotky jsou velmi rozšířeny v mozkové kůře, hipokampu a talamu (Lujan et al., 2005). Kainátové receptory jsou lokalizovány presynapticky i postsynapticky, dokonce se mohou zapojit do G-proteinem zprostředkované kaskády (Isaac et al., 2004).

Farmakologie kainátových receptorů není plně prozkoumána, ví se však, že hrají roli při bolestí, ve vzniku epilepsie a pravděpodobně i v dalších patologických stavech (Löscher, 1998; Isaac et al., 2004).

Mezi selektivní agonisty patří kyselina kainová, glutamát, (S)-5-iodowillardiine, SYM 2081 (S,R-4-methylglutamát). LY 294486 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-butyl-4-izoxazolpropionát) je selektivním GluR5 kompetitivním antagonistou. Další z mála dostupných ligandů je NS-102 (5-nitro-6,7,8,9-tetrahydrobenzoindol-2,3-dion-3-oxim), který byl prokázán jako kompetitivní antagonist nízkoafinitního KA vazebného místa (Löscher, 1998; Heuttner, 2004). KA receptory obsahující GluR5 podjednotku regulují synaptickou inhibici v hipokampu, čímž se mohou

---

stát potenciálními cíly pro nová antiepileptika (Bigge, 1999).

#### 2.2.4. NMDA receptory

NMDA receptory jsou kódovány třemi rodinami genů které dovolují vzniknout šesti druhům podjednotek označovaných NR1 (a-h izoformy), NR2A-D a NR3A. Každá z nich má tři transmembránové domény (Dingledine et al., 1999). Samotný receptor je pravděpodobně tetramer složený ze dvou NR1 a dvou NR2 podjednotek nebo různých kombinací ostatních typů podjednotek (Colquhoun a Sivilotti, 2004; Petrovic et al., 2005).

Specifické vazebné místo pro glutamát se nachází na NR2 podjednotce. NMDA receptory mají však i další vazebná místa, která mohou pozitivně nebo negativně ovlivnit efekt agonisty (Trist, 2000). Například glycin zde funguje jako koagonista glutamátu na NR1 podjednotce a uplatňuje se při potenciaci aktivace NMDA receptorů. Navíc je NMDA receptor modulovaný řadou iontů a polyaminy (Trist, 2000; Huggins a Grant, 2004).

Na rozdíl od non-NMDA receptorů, jsou při klidových hodnotách membránového potenciálu NMDA receptory blokovány iontem hořčíku. Blok iontového kanálu je přerušen v okamžiku depolarizace,  $Mg^{2+}$  opustí své místo a umožní vstup jiných iontů, tzn.  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$  a  $K^{+}$ . NMDA receptory se aktivují později než AMPA receptory, teprve když AMPA receptorem navozená depolarizace způsobí uvolnění  $Mg^{2+}$  z vazby v NMDA kanálu (Tureček et al., 1997; Löscher, 1998; Rajendra et al., 2004).

NR1 podjednotky receptorů jsou všudypřítomné v pre- i postnatálním období, zatímco NR2 a NR3 jsou během vývoje různě exprimovány (Lujan, 2005). Ve vyvíjejícím se mozku je většina glutamátergní transmise zprostředkována NMDA receptory, bez významnější účasti funkčních AMPA receptorů, které přibývají s věkem (Ben-Ari et al., 1997; Tureček a Vyklícký, 1997; Petralia, 2005).

NMDA receptory jsou umístěny postsynapticky a nejvíce jsou zastoupeny v mozkové kůře a hipokampu (Dingledine et al., 1999).

K agonistům NMDA receptorů řadíme glutamát, NMDA, ibotenát. Mezi selektivní kompetitivní antagonisty patří např. AP7 (kyselina D,L-2-amino-7-

fosfonoheptanová). Nekompetitivními antagonisty (obsazení místa v iontovém kanále pro  $Mg^{2+}$ ) jsou MK 801 (dizocilpin), ketamin, PCP. Dále pak memantin (3,5-dimethyl-1-adamantanamin), který má pravděpodobně dvě vazebná místa na NMDA receptoru (Parsons et al., 1999; Johnson a Kotermanski, 2006). Memantin je klinicky používán v léčbě Alzheimerovy choroby. Dalším antagonistou je ifenprodil, jenž selektivně antagonizuje polyaminové místo receptoru a je tedy specifický pro receptory obsahující podjednotku NR2B (Wang a Bausch, 2004). Kompetitivní obsazení vazebného místa pro glycin je zprostředkováno ACAE 1021 (5-nitro-6,7-dichloro-1,4-dihydro-2,3-quinolindion).

Antagonisté NMDA navozují závažné vedlejší účinky, nejčastěji je to porucha paměti, učení, ataxie a sedace.

Agonistický a antagonistický efekt, tak jako u předešlých dvou typů receptorů, závisí na kombinaci podjednotek receptoru (Löscher, 1998; Dingledine et al., 1999; Trist, 2000).

## 2.3. Metabotropní glutamátové receptory

### 2.3.1. Charakteristika mGlu receptorů

Metabotropní glutamátové receptory patří mezi GPCR (G-protein coupled receptors), nemají však ani sekvenční ani strukturální homologii se skupinou I (rodopsin,  $\beta_2$ -adrenergní receptory) a skupinou II (sekretinové receptory) GPCR. Společnou mají pouze sedmitransmembránovou doménou, která je obecně charakteristická pro GPCR (Dale et al., 2002). Na základě sekvenční homologie patří mGluR společně s  $GABA_B$  receptory,  $Ca^{2+}$ -sensing receptory, feromonovými a chuťovými receptory do skupiny III GPCR. U skupiny III GPCR po navázání agonisty se prostřednictvím heterotrimerních G-proteinů aktivují různé typy intracelulárních druhých posílů a je ovlivněna vodivost iontů (De Blasi a Conn, 2001; Dale et al., 2002; Gasparini, 2002).

Aktivací heterotrimerního G-proteinu disociuje  $\alpha$  podjednotka, která pozitivně nebo negativně reguluje různé efektorové systémy, které mohou modulovat odlišné buněčné funkce na intracelulární úrovni (př. cAMP). Na neuronálních



synapsích se vyskytuje velké množství druhů GPCR s různými izoformami  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$  podjednotek G-proteinů. Efekt aktivace neuromodulačních systémů je závislé na tom, přes který G-protein jednotlivé GPCR působí (Stevens, 2004).

Receptory v této skupině byly rozděleny do různých kategorií závisících na podtypu G-proteinu s kterými přednostně receptory interagují, například ty které jsou spřaženy s  $G_S$ -proteinem stimulují adenylát cyklázu (AC),  $G_I$ -proteiny inhibují AC,  $G_q$ -proteinem mobilizují intracelulární kalcium aktivací fosfolipázy C (Selbie a Staphen, 1998).

mGluR lokalizované presynapticky inhibují uvolňování glutamátu, ale i dalších transmiterů včetně GABA, postsynaptické působí excitačně. Z toho vyplývá rozmanitost role mGluR v neurodegeneraci, neuroprotekcí, epileptiformní aktivitě a dalších dějích (De Blasi a Conn, 2001; Rajendra et al., 2004).

Na rozdíl od prototypních členů GPCR rodiny, mGluR jsou spřaženy s heterotrimerním G-proteinem přes druhou intracelulární smyčku transmembránové domény (Havlíčková et al., 2003). U skupiny I a II GPCR je toto spojení zprostředkováno přes třetí intercelulární smyčku (Dale et al., 2002).

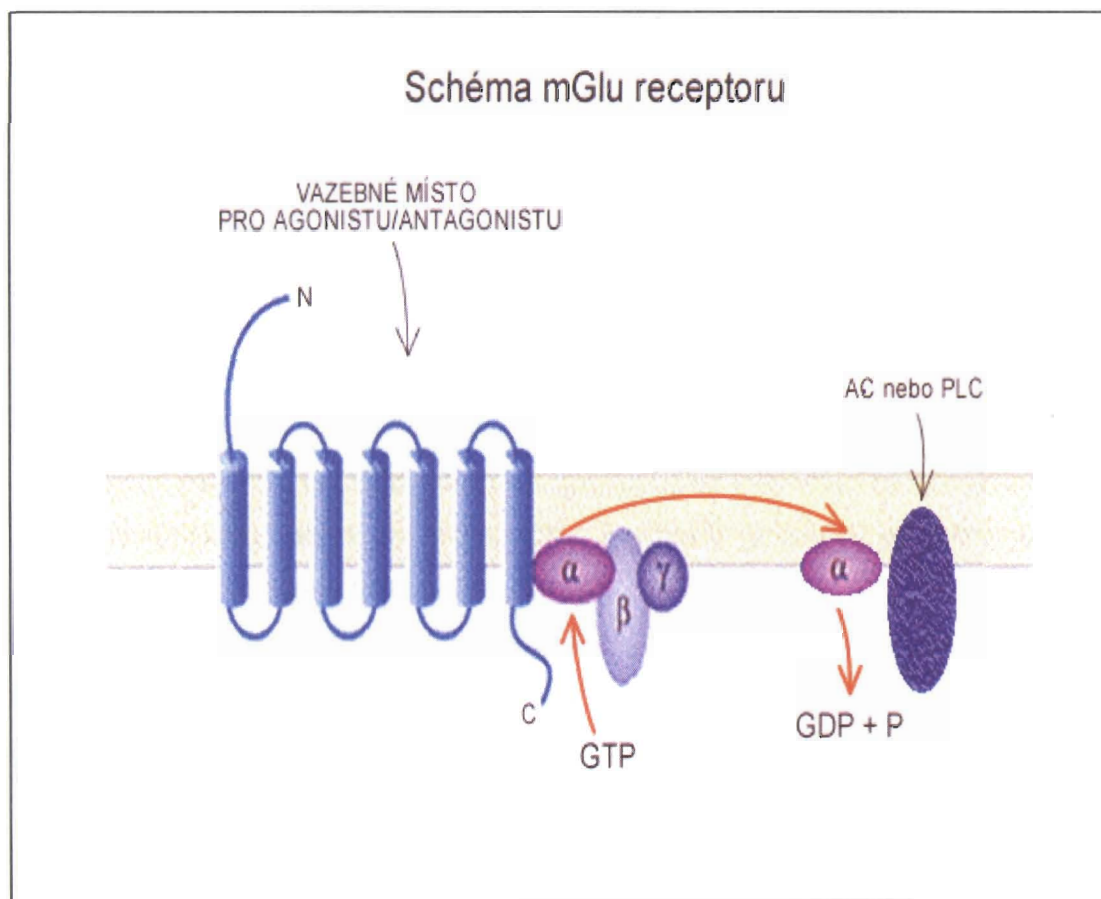
Metabotropní receptory se skládají ze dvou hlavních domén, tzn. N- a C-konce a ze sedmi transmembránových segmentů (TM). Jejich funkční jednotka je tvořena homomerním dimerem s velkým N-extracelulárním koncem, na který se váže glutamát a kompetitivní agonisti nebo antagonisti. Na intracelulární C-konec receptoru se vážou nekompetitivní antagonisti (Pagano et al., 2000; Moldrich et al., 2003) (obr. 2). U skupiny III GPCR se předpokládá, že C-terminál G-proteinu  $\alpha$  podjednotky interaguje s „kapsou“ tvořenou druhou a třetí intracelulární smyčkou (De Blasi a Conn, 2001).

Všechny mGluR se vyskytují jako homomerní dimery, jež jsou stabilizované disulfidovou vazbou tvořenou cysteinovými zbytky („Cys-rich“). Po vazbě agonisty změna konformace extracelulární domény (ECD) indukuje změny konformace segmentu 7TM, který je navázán na C-konec každé ECD prostřednictvím oblasti „Cys-rich“. Tyto konformační změny vedou v přítomnosti agonisty k přiblížení C-terminálů obou monomerů. To vede ke stabilizaci aktivovaného stavu receptoru, z čehož vyplývá, že dimerizace má důležitou roli

při GPCR aktivaci (De Blasi a Conn, 2001).

V poslední době se výzkum zaměřuje na identifikaci receptorových podtypů a jejich specifických přímých účinků ve snaze nalézt agonisty a antagonisty těchto receptorů s menšími nežádoucími účinky (Selbie a Staphen, 1998). Vzrůstající počet GPCR identifikovaných genovým klonováním a větší dostupnost specifitějších farmakologických agens vede k zkoumání dalších modulačních rolí GPCR, např. ovlivnění signální dráhy jiných GPCR, stejně tak jako i jiných receptorových skupin. Prokázaná modulační role GPCR je důležitá pro výzkum nových léčiv i pro fyziologické hledisko receptorového „cross-talku“ (Selbie a Stephen, 1998).

**Obr. 2:** Jednoduché schéma metabotropního glutamátového receptoru



### 2.3.2. Dělení mGlu receptorů

Metabotropní receptory se rozdělují do 3 základních skupin (I, II a III) a dále na 8 podtypů (mGluR<sub>1-8</sub>) - produktů osmi genů. Toto rozdělení vychází ze sekvenční homologie aminokyselin receptoru, uplatňujících se transdukčních mechanismů a farmakologického účinku ligandů těchto receptorů (agonistů nebo antagonistů) (Gasparini et al., 2002b; Moldrich et al., 2003).

Metabotropní glutamátové receptory sdílí 70% sekvenční homologie aminokyselin v dané skupině a ze 45% jsou identické mezi jednotlivými skupinami. Většina mGluR genů generuje varianty, které se liší jejich C-koncovou doménou, nejdelší C-terminál oproti ostatním je u podtypu mGluR1a, mGluR 5a a mGluR 5b (Fagni et al., 2004).

### 2.3.3. Lokalizace mGlu receptorů

Metabotropní receptory jsou lokalizovány v synaptické štěrbině, jejich rozložení se liší podle skupinové příslušnosti a typu receptoru (Messenger et al., 2002).

Receptory skupiny I (mGluR<sub>1</sub> a mGluR<sub>5</sub>) jsou převážně umístěny postsynapticky, podtyp 5 (mGluR<sub>5</sub>) se také vyskytuje na gliových buňkách. Receptory podtypu 1 (mGluR<sub>1</sub>) se vyskytují v hipokampu a mozečku (Moldrich et al., 2003; Yu et al., 2005), exprese mGluR<sub>5</sub> převažuje v limbické kůře a bazálních gangliích (Wittmann et al., 2001).

Receptory skupiny II se nacházejí zejména presynapticky (př. v hipokamu, neokortexu, talamu), přičemž podtyp 2 (mGluR<sub>2</sub>) se vyskytuje na presynaptickém i postsynaptickém zakončení v mozečku. Podtyp 3 (mGluR<sub>3</sub>) je distribuován na glii (Petralia et al., 1996; Lujan et al., 1997).

Receptory skupiny III jsou lokalizovány presynapticky; podtyp mGluR<sub>4</sub>, mGluR<sub>7</sub>, mGluR<sub>8</sub> najdeme např. v basálních gangliích; receptory podtypu mGluR<sub>6</sub> jsou exprimovány v retině (Messenger et al., 2002).

### 2.3.4. Funkce mGlu receptorů

Metabotropní glutamátové receptory regulují mnoho fyziologických i patologických procesů v CNS, jako je synaptická plasticita, učení a paměť,

---

motorická koordinace, přenos bolestivých podnětů a neurodegenerace (De Blasi a Conn, 2001). Mají širokou škálu účinků na neurony a glii jako např. proces desenzitizace spojený s fosforylací a internalizace molekul receptorů (Schoepp, 2001; Dale et al., 2002).

Receptory skupiny I jsou spřážené s  $G_q$ -proteinem a aktivují fosfoinositolovou hydrolýzu. Aktivací fosfolipázy C vazbou ligandu na receptor, se štěpí fosfatidylinozitol-4,5-bisfosfát ( $PIP_2$ ) na inositoltrisfosfát a diacylglycerol. Následně inositoltrisfosfát aktivuje proteinkinazu C, což vede k otevírání  $Ca^{2+}$  kanálů a uvolnění uskladněného  $Ca^{2+}$  (inositoltrisfosfát sensitivní receptory), rovněž aktivuje napěťově závislé  $Ca^{2+}$  kanály (VOCC) v plazmatické membráně a indukuje odtok  $K^+$  prostřednictvím  $Ca^{2+}$ -sensitivních  $K^+$  kanálů. Rovněž prostřednictvím  $G_s$  proteinu vede k aktivaci adenylátcyklázy a tvorbě cAMP z ATP.

Receptory skupiny II a III inhibují aktivitu adenylátcyklázy prostřednictvím inhibičního  $G_i$  -proteinu a snižují tvorbu cAMP, což vede k inhibici VOCC a podporuje vtok  $K^+$  do buňky (Moldrich et al., 2003; Fagni et al., 2004).

Nové poznatky ukazují, že signální kaskáda mGluR se zdá být více komplexní než výše zmíněné mechanismy. Například mGluR<sub>7</sub> navíc stimuluje fosfolipázu C přes aktivaci  $G_i$  proteinu. Jiné mGluR mohou aktivovat cGMP fosfodiesterazu, fosfolipázu D, fosfolipázu A2 apod. Navíc mGluR mohou rovněž kontrolovat různé iontové kanály (Fagni et al., 2004).

mGluR skupiny I regulují synaptickou plasticitu a neurodegenerativní procesy, jejich antagonisté se testují jako potenciální neuroprotektiva. mGluR<sub>1</sub> mají vliv na motorickou koordinaci a mGluR<sub>5</sub> indukují LTP (long-term potentiation). mGluR skupiny II negativně regulují uvolňování glutamátu. Receptory skupiny III, podtyp mGluR<sub>4</sub>, mGluR<sub>7</sub>, mGluR<sub>8</sub>, inhibují uvolnění glutamátu a GABA (De Blasi a Conn, 2001).

Agonisté mGluR skupiny I modulují in vitro uvolnění glutamátu v neokortexu, striatu a hippocampu, zatímco agonisté skupiny II a III v těchto preparátech inhibují uvolnění glutamátu (Meldrum et al., 1999a; Moldrich et al., 2003).

### 2.3.5. Selektivita mGluR agonistů a antagonistů

#### 2.3.5.1. Kompetitivní agonisté a antagonisté

U kompetitivních ligandů je zřejmá skupinová selektivita, ale jen částečná selektivita k jednotlivým podtypům mGluR, která je způsobena sekvenční homologií aminokyselin vazebného místa receptoru.

Jak už bylo řečeno (N)-konec extracelulární domény je vazebným místem pro glutamát. Analoga glutamátu a phenylglycinu špatně prostupují hemoencefalickou bariérou (Pin et al., 1999; Schoepp et al., 1999; Pagano et al., 2000; Moldrich et al., 2003) (tab. 1).

#### 2.3.5.2. Nekompetitivní antagonisté

Nekompetitivní antagonisté mají naopak vysokou subtypovou selektivitu, za kterou zodpovídá sekvenční heterologie aminokyselinové transmembránové domény (Pagano et al., 2000). Nekompetitivní antagonisté se váží na (C)-konec intracelulární domény. Výhodou nekompetitivních antagonistů, kteří nemusí mít charakter aminokyselin, je jejich účinnost i po systémovém podání (Moldrich et al., 2003).

Allosterické modulátory mohou být antagonisty s inverzně agonistickým účinkem (př. mGluR skupiny I), tj. váží se na specifické místo na heptahelixu a vyvolají efekt, který je však opačný než by byl účinek agonisty. Příkladem je MPEP (2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridin hydrochlorid), mGluR5 specifický antagonist, který se váže na TM segment C-terminálu domény receptoru (Gasparini et al., 2002b; Kew, 2004).

Tab. 1: Rozdělení mGlu receptorů a příklady jejich agonistů a antagonistů

Typy mGlu receptorů a zástupci agonistů a antagonistů				
	Subtyp	Mechanismus	Agonista	Antagonista
Skupina I	mGlu1a-c, e mGlu5 a,b	Fosfoinositolová hydrolýza (Fosfolipáza C)	<b>Konvulzivní účinek</b>	<b>Antikonvulzivní účinek</b>
			Neselektivní: quisqualát S-glutamát trans-ACPD t-ADA t-CAA  Selektivní: F37 3,5-DHPG mGlu5: CBOA	Selektivní: mGlu5a: 4-CPG mGlu5a: (S)-4C3HPG  Nekompetitivní: mGlu5: <b>MPEP</b> mGlu5: SIB 1893 mGlu5: SIB 1757 mGlu1: CPCCOEt
Skupina II	mGlu2 mGlu3	Inhibice adenylát cyklazy	<b>Antikonvulzivní účinek</b>	<b>Konvulzivní účinek</b>
			Neselektivní: trans-ACPD 4-MG 4-MeGlu mGlu3: NAAG  Selektivní: cis/trans-MCG-I APDC LY354740 LY379268	Selektivní: MCPG MTPG
Skupina III	mGlu4 a,b mGlu6 mGlu7 a,b mGlu8 a,b	Inhibice adenylát cyklazy	<b>Antikonvulzivní účinek</b>	<b>Konvulzivní účinek</b>
			Selektivní: mGlu4: glutamát; S-AP4; S-SOP; ACP T mGlu6: S-homo-AMPA mGlu7: mGlu8: S-glutamát; (R,S)-PPG	Selektivní: ACTP II MPPG mGlu8: LY341495

Schoepp et al., 1999; Moldrich et al., 2003

### 2.3.6. Role mGluR v epilepsii

Zvýšená glutamátergní neurotransmise je chápána jako základní patologický mechanismus, který se může podílet na vzniku různých typů epileptických záchvatů. Studie ukázaly, že glutamát a kainát jsou schopny vyvolat u zvířat epileptické záchvaty, které modelují lidské epileptické záchvaty (Doherty a Dingledine, 2002; Moldrich et al., 2003). Excitační aminokyseliny vyvolávají zvýšení vstupu  $Ca^{2+}$  do buňky, zvýšené uvolňování glutamátu a aspartátu (Meldrum et al., 1999a).

Je známo, že mGlu receptory jsou exprimovány v potenciálně epileptogenních oblastech mozku (kůra, talamus, amygdala, hipokampus) (Bordi a Ugolini, 1999; Wittmann et al., 2001; Doherty a Dingledine, 2002; Moldrich et al., 2003). In vitro studie ukázaly, že agonisté mGluR skupiny I vykazují prokonvulzivní aktivitu, zatímco agonisté skupiny II a III jsou uvažovány jako potenciální antikonvulziva.

mGluR skupiny I hrají důležitou roli v iniciaci záchvatu, v přeměně interiktální aktivity v iktální a v modulaci délky a amplitudy epileptického záchvatu (Bordi a Ugolini, 1999; Thuault et al., 2002).

Z dosavadních výzkumů plyne, že mGlu receptory jsou možným cílem pro nová antiepileptika. Jelikož ligandy mGluR jsou relativně nové ve srovnání např. s benzodiazepiny, jejich antikonvulzivní potenciál nebyl ještě plně prozkoumán a žádný z nich se ještě klinicky nepoužívá (Doherty a Dingledine, 2002). V současné době jako je jako první v klinických zkouškách agonista mGluR II od firmy Eli Lilly. Dosud nebyly popsány vedlejší účinky látek ovlivňujících mGluR, které by byly tak závažné jako u kompetitivních a nekompetitivních antagonistů NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptorů (na př. MK-801) a nekompetitivních antagonistů AMPA receptorů (na př. GYKI 52466). Všichni tyto antagonisté ionotropních glutamátových receptorů vykazují sice výbornou účinnost u zvířecích modelů epileptických záchvatů, ale výrazné nežádoucí účinky znemožňují využití v klinické praxi (Chapman et al., 1991; Meldrum et al., 1992, Moldrich et al., 2003). Nadále se však používají v základním výzkumu, kde mají svůj význam pro pochopení role glutamátu v etiologii a zvláště patogeneze epilepsie (Löscher, 1998; Trist, 2000; Moldrich et al., 2003).

### **2.3.7. Zástupci agonistů a antagonistů jednotlivých skupin mGlu receptorů**

#### **2.3.7.1. Skupina I mGlu receptorů**

Konvulzivní účinek u skupiny I mGluR se připisuje ligandům s agonistickými vlastnostmi a vychází z přímého excitačního působení nebo nepřímé aktivace NMDA a AMPA receptorů (Movsesyan et al., 2001; Doherty a Dingledine, 2002; Choe et al., 2006). Antagonisté této skupiny se řadí mezi látky s antikonvulzivním účinkem.

#### **Agonisté s prokonvulzivním účinkem**

Mezi neselektivní agonisty, účinkující rovněž na mGluR I, patří quisqualát (pravděpodobná neselektivní AMPA aktivace) (Schoepp et al., 1999). K selektivním agonistům se řadí DHPG (dihydroxyfenylglycin), který vykazuje

skupinovou selektivitu, nikoliv však podtypovou (Bordi a Ugolini, 1999; Moldrich et al., 2003).

#### Antagonisté s antikonvulzivním účinkem

Selektivní kompetitivní antagonisté se vyznačují vyšší specificitou k  $mGluR_1$ , jako například LY367385 (aminokarboxymethylbenzooctová kyselina). Antikonvulzivní účinek byl prokázán nejen u modelů generalizovaných motorických záchvatů, ale i u modelu absencí (Chapman et al., 1999; Pin et al., 1999, Nagaraja et al., 2004).

Skupina nekompetitivních antagonistů fenyglycinového typu prokazuje antikonvulzivní efekt u klonických záchvatů a genetického modelu absencí, příkladem je antagonist  $mGluR_1$  LY393053 (Kingston et al., 2002). Jinými účinnými nekompetitivními antagonisty selektivními k  $mGluR_5$  jsou SIB 1893 (2-methyl-6-(2-phenylethenyl)pyridin) a MPEP, kteří jsou schopni potlačit klonické záchvaty vyvolané  $mGluR_5$  agonistou a u genetického modelu absencí výskyt úseků hrot-vlna (Gasparini et al., 1999 a 2002a; Moldrich et al., 2003). Ukazuje se, že oba tyto antagonisté ve výrazně vyšších dávkách, než jsou antikonvulzivní dávky antagonizující  $mGluR_5$ , působí rovněž jako antagonisté NMDA receptorů (Movsesyan et al., 2001), dále modulují GABA neurotransmisi, ovlivňují  $mGluR_4$  atd. (Bordi a Ugolini, 1999).

Možné rozdíly mezi antikonvulzivními účinky selektivních antagonistů pro  $mGluR_1$  a  $mGluR_5$  nejsou dostatečně prozkoumány, zástupci obou podtypů receptorů skupiny I se zdají být stejně efektivní.

#### 2.3.7.2. Skupina II $mGlu$ receptorů

##### Agonisté s antikonvulzivním účinkem

Neselektivní agonista APDC (aminopyrolidindekarboxylát) je účinný proti generalizovaným motorickým záchvatům a vykazuje neuroprotektivní efekt (Moldrich et al., 2001c; Folbergrová et al., 2005). Zajímavé je, že již dvojnásobek antikonvulzivní dávky APDC může mít prokonvulzivní efekt, což je



pravděpodobně způsobeno aktivací mGlu receptorů skupiny I (Moldrich et al., 2003).

Mezi skupinově selektivní agonisty mGluR<sub>2</sub> je zahrnut LY379268, který je po intracerebroventrikulárním (i.c.v.) podání účinný proti záchvatům s komplexy hrot-vlna v EEG. Mnohonásobně vyšší dávka těchto agonistů může vyvolat klonické křeče (Pin et al., 1999; Moldrich et al., 2001a).

#### Antagonisté s konvulzivním účinkem

Zástupcem neselektivních antagonistů skupiny II je např. MCPG ((R,S)- $\alpha$ -methyl-4-karboxyfenylglycin) jako nejdříve objevený antagonist této skupiny, který vyvolává klonicko-tonické záchvaty (Folbergrová et al., 2001).

K selektivnějším antagonistům této skupiny se řadí APICA (aminofosfoindankarboxylová kyselina). Přestože je APICA selektivním antagonistou, nevyvolává záchvaty. Z tohoto poznatku vyplývá, že může být předčasné tvrzení, že antagonisté skupiny II mGlu receptorů nutně indukují záchvaty (Moldrich et al., 2003).

#### 2.3.7.3. Skupina III mGlu receptorů

##### Agonisté s antikonvulzivním účinkem

Do skupiny selektivních agonistů patří (R,S)-3,4-DCPG (dikarboxyfenylglycin); racemát je mnohem účinnější než kterýkoliv z izomerů (S) a (R). Potenciace účinku je dána kombinací aktivace mGluR<sub>8</sub> a antagonistickým působením na AMPA receptory (za to je odpovědný (R) izomer) (Moldrich et al., 2003).

(R,S)-PPG (fosfofenylglycin) je účinný proti audiogenním křečím (mGluR<sub>8</sub>) a pentetrazolem vyvolaným záchvatům, u kterých hrají významnou roli mGluR<sub>7</sub> (Schoepp et al., 1999; Folbergrová et al., 2003).

##### Antagonisté s antikonvulzivním účinkem

Selektivní antagonist MCPA (karboxyfenylalanin) má antikonvulzivní účinky u řady modelů záchvatů a je aktivní jen na mGluR<sub>8</sub> (Schoepp et al., 1999; Moldrich et al., 2003).

### 2.3.8. Změny mGlu receptorů u epilepsie

#### 2.3.8.1. Změny mGluR sledované u vybraných zvířecích modelů epilepsie

Změny v expresi a funkci mGluR byly popsány u amygdalového kindlingu (Doherty a Dingledine, 2002). Zvýšená exprese mRNA během několika dní vyvolala upregulaci mGluR<sub>1</sub> a mGluR<sub>5</sub> u výše zmíněného modelu epilepsie (Akbar et al., 1996). Dalším příkladem je status epilepticus, který vyvolá upregulaci mGluR<sub>2/3</sub> a mGluR<sub>5</sub> v astrocytech (Aronica et al., 2000). Dále status u mláďat i dospělých potkanů snižuje expresi mGluR<sub>2</sub> a zvyšuje mGluR<sub>4</sub> (pouze u mláďat) v neuronech (Aronica et al., 1997; Morimoto et al., 2004).

#### 2.3.8.2. Změny mGluR sledované u epileptických pacientů

Rozdíly v expresi jednotlivých mGlu receptorů byly popsány u různých humánních epileptických syndromů. Tyto změny v expresi jednotlivých podtypů mGlu receptorů jsou nejlépe prostudovány u mesiální temporální epilepsie, na př. byl zjištěn vzrůst počtu mGluR<sub>4</sub> a mGluR<sub>1</sub> v gyrus dentatus (Doherty a Dingledine, 2002).

### 2.3.9. Možnosti mGluR pro využití v léčbě

Ligandy vážící se na mGluR vykazují stejný nebo dokonce větší antikonvulzivní efekt než některá antiepileptika používaná v klinické praxi, což bylo také prokázáno např. u zvířecích modelů generalizovaných záchvatů, a to u klonických, tonicko-klonických a modelu absencí, u modelů mesiální temporální epilepsie a genetických modelů primárně generalizovaných záchvatů (Moldrich et al., 2003).

Pro léčebný potenciál těchto ligandů je podstatné stanovit terapeutický index, trvání antikonvulzivního efektu, odhalit lékové interakce, farmakokinetické vlastnosti apod.

Preklinická data ukazují vhodný terapeutický potenciál u některých podtypově specifických ligandů mGluR u různých modelů záchvatů i epilepsii (Moldrich et al., 2003).

Několik studií se zabývalo korelací antiepileptického efektu mGluR ligandů a

jejich případného neuroprotektivního účinku. Tyto studie vycházely z poznatků, že po podání mGluR ligandů s konvulzivním účinkem dochází k neurodegeneraci (De Blasi a Conn, 2001). Například mGluR<sub>1</sub> antagonisté – LY367385 a MPEP (viz výše) - prokázaly zlepšení schopnosti učení u potkanů po pentylentetrazolovém kindlingu (Nagaraja et al., 2004). Také další studie ukazují na možný neuroprotektivní účinek in vivo i in vitro u antagonistů ze skupiny mGluR I a agonistů II a III (Gasparini et al., 1999; Bruno et al., 2000; Battaglia et al., 2001; Movsesyan et al., 2001; Blaabjerg et al., 2003; Baskys et al., 2005; Risterucci et al., 2005). Ze současných poznatků vyplývá, že neuroprotektivní efekt je spojen již s antikonvulzivní dávkou ligandů mGluR a může být významnou součástí terapeutického potenciálu těchto látek (Moldrich et al., 2003).

#### **2.3.10. Význam ligandů mGlu receptorů**

Metabotropní glutamátové receptory mohou být cílem pro vývoj nových léčiv v neurofarmakologii (a to např. v terapii epilepsie, chronické bolesti, Parkinsonovy choroby a dalších) (Spooren et al., 2001).

Rovněž jsou vhodné pro hledání antikonvulzivního účinku u zvířecích modelů a studium mechanismů uplatňujících se v epileptogenezi. Selektivní aktivace nebo inaktivace mGluR nás informuje o terapeutickém potenciálu jednotlivých podtypů receptorů. U animálních modelů se ukazuje jako efektivnější kombinace ligandů různých skupin I, II a III mGluR, a tím uplatnění několika mechanismů účinku, než užití jediné látky (na př. kombinace presynaptické redukce glutamatergní transmise s postsynaptickým blokem účinku) (Moldrich et al., 2003).

## 2.4. Použité ligandy v experimentu

### 2.4.1. MPEP

**MPEP** (2-metyl-6-(fenylethynyl)-pyridin) byl popsán jako účinný, selektivní nekompetitivní antagonistu typu I metabotropních glutamátových receptorů podtypu 5 (obr. 3) (Gasparini et al., 1999 a 2002). Vykazuje antikonvulzivní účinnost po systémovém podání u dospělých jedinců (Chapman et al., 2000; Barton et al., 2003; Nagaraja et al., 2004) i u mláďat (motorické záchvaty indukované podáním pentetrazolu u mláďat potkana - Mareš a Mikulecká, 2004). Tento antagonistu neaminokyselinového původu nevykazuje efekt na příbuzných mGluR<sub>1</sub> (Gasparini et al., 1999).

Při pátrání po mechanismu účinku bylo zjištěno, že MPEP plně nesdílí  $\alpha$ -amino kyselinové vazebné místo receptoru a ani karboxylové místo, která jsou vazebnými místy pro agonisty nebo antagonisty mGluR. Začalo se spekulovat o jeho možném působení na jiném místě receptoru (Gasparini et al., 1999; Spooren et al., 2001).

V experimentech na rekombinantním mGluR I podtypu 5 bylo zjištěno, že MPEP uplatňuje inhibiční aktivitu na místě receptoru lokalizovaném na jeho transmembránové části (TM), kde se váže na vyčnívající „kapsu“ TM segmentu. Uvedené allosterické vazebné místo je tvořeno horní částí TM helixů, a to III, IV a VII (Gasparini et al., 2001 a 2002). Allosterické modulátory (včetně MPEP) mohou být inverzními agonisty, tj. vyvolají efekt, který je opačný, než by byl účinek agonisty (Pagano et al., 2000; Carroll et al., 2001; Mathiesen et al., 2003; Kew, 2004).

V poslední době se rovněž hledají nová chemická analoga MPEP s vyšší mGluR<sub>5</sub> antagonistickou aktivitou (Alagille et al., 2005a, b).

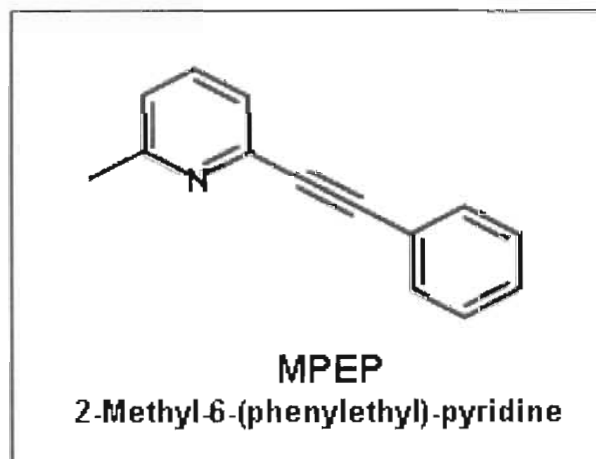
Metabolický osud MPEP v těle potkana není plně objasněn. Pravděpodobně je metabolizován jaterními enzymy P450 (CYP) podobným způsobem, jako je uvedeno v pokusech s lidskými mikrosomálními enzymy a dále v experimentech s chemicky příbuzným selektivnějším mGluR<sub>5</sub> antagonistou MTEP (3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-pyridine) u potkanů. Výsledky těchto studií ovšem naznačují značnou interindividuální i mezidruhovou variabilitu (Green et al.,

2004, 2006).

Nežádoucí účinky se předpokládají u motorických funkcí, protože MPEP pravděpodobně ovlivňuje lokomoční funkce ve striatu (Sacaan et al., 1992; David a Abrani, 2001), navíc jak mGluR<sub>1</sub> tak mGluR<sub>5</sub> hrají roli v kortikostriální dlouhodobé potenciaci (long term potentiation, LTP) (Gubellini et al., 2003; Nagaraja et al., 2004). V provedených experimentech nebyly prokázány vážné systémové změny motorických funkcí (Spooren et al., 2000; Kinney et al., 2003; Mareš a Mikulecká, 2004; Zhu et al., 2004).

Obecně se dá říct, že MPEP je vhodným farmakologickým agens pro zkoumání funkcí mGluR<sub>5</sub> receptoru v nervovém systému za fyziologických i patologických podmínek (př. antihyperalgezický účinek, u ischemického poškození, u neurodegenerativních poruch, apod. (Gasparini et al., 1999).

**Obr. 3:** Strukturní vzorec MPEP



Gasparini et al., 1999

#### 2.4.2. MTEP

**MTEP** (2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridin) patří mezi vysoce selektivní nekompetitivní antagonisty typu I metabotropních glutamátových receptorů podtypu 5 (obr. 4) (Cosford, 2003). V porovnání s MPEP je MTEP specifitějším a rozpustnějším ligandem, neinteraguje s dalšími podtypy mGluR receptorů, a minimálně ovlivňuje NMDA receptory, navíc snadněji prochází do CNS (Lea a Faden, 2006).

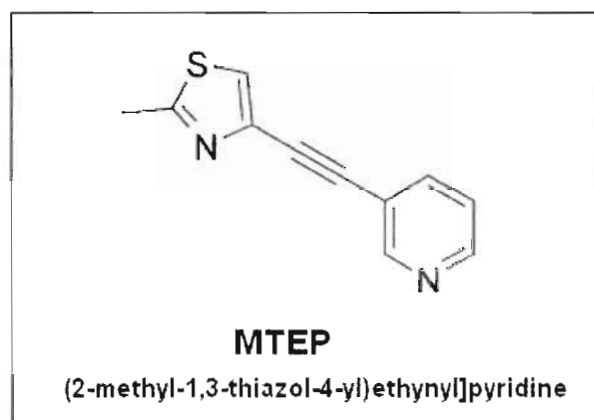
Na základě svého účinku je řazen mezi tzv. negativní allosterické modulátory, což znamená, že daný ligand nekompetitivním způsobem inhibuje efekt kompetitivního agonisty navázaného na receptoru (Kew, 2004; Ritzen et al., 2005). Váže se na TM jednotku receptoru a podobně jako MPEP ovlivňuje aktivitu fosfolipázy C (Anderson et al., 2002).

Současné studie ukazují, že za metabolismus MTEP jsou primárně zodpovědné různé izoformy cytochromu P450 (CYP). Dále bylo zjištěno, že MTEP je reverzibilní inhibitor CYP a může být zodpovědný za případné lékové interakce (Green et al., 2004 a 2006; Lea a Faden, 2006).

Nízké dávky MTEP neovlivňují spontánní lokomoční aktivitu u potkanů, avšak dávky vyšší než 100 mg/kg vyvolávají vedlejší účinky, ovlivňují motoriku a explorační aktivitu (Busse et al., 2004; Klodzinska et al., 2004; Zhu et al., 2004; Pietraszek et al., 2005).

Potenciální antikonvulzivní účinek MTEP musí být nadále studován. Z výsledků studií Löschera z roku 2006 vyplývá, že MTEP není účinný u modelů parciálních fokálních záchvatů (epilepsie temporálního laloku) tj. u amygdalového kindlingu u potkanů a 6Hz-elektrošoku u myší. MTEP vykazuje rovněž signifikantní neuroprotektivní efekt (Domin et al., 2006; Szydłowska et al., 2007).

MTEP může být prospěšný v léčbě závislosti, úzkostných stavů, bolesti a neurodegenerativních onemocnění (Busse et al., 2004; Klodzinska et al., 2004; Lea a Faden, 2006). Vzhledem k absenci vážných nežádoucích účinků a vysoké specifitě např. V porovnání s MPEP není vyloučeno jeho budoucí terapeutické použití, především léčbě úzkostných stavů (Busse et al., 2004).

**Obr. 4:** Strukturální vzorec MTEP

Cosford, 2003

### 2.4.3. Memantin

**Memantin** (3,5-dimethyl-1-adamantanamin) je nekompetitivním antagonistou NMDA receptorů (obr. 5). Memantin je klinicky užívané léčivo u Alzheimerovy choroby. Jeho výhodou je absence vážných vedlejších účinků (při terapeutické dávce) typických pro NMDA antagonisty (Barnes et al., 1996; Parsons et al., 1999; Jirák a Souček, 2006; Johnson a Kotermanski, 2006).

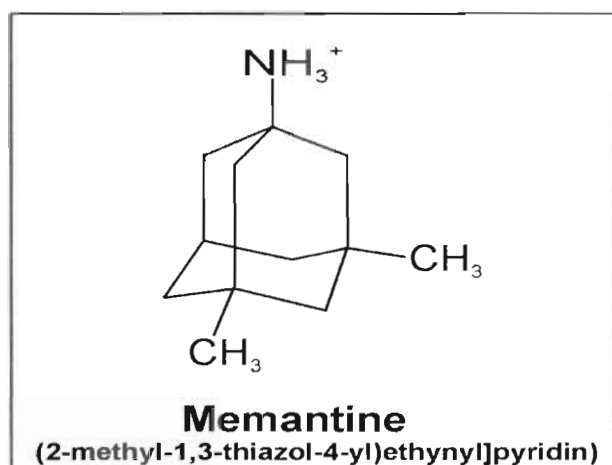
Memantin vykazuje neuroprotektivní a antikonvulzivní potenciál u řady modelů epileptických záchvatů u mláďat, dospělých potkanů i u myší. (Bisaga et al., 1993; Löscher a Hönack, 1994; Parsons et al., 1999; Wang a Bausch, 2004; Johnson a Kotermanski, 2006). Příkladem mohou být animální modely generalizovaných záchvatů (včetně modelů absencí), avšak je neúčinný u klonických záchvatů a amygdalového kindlingu (Parsons et al., 1999).

Pro memantin existují dvě vazebná místa na NMDA receptoru. Za jeden z předpokládaných mechanismů účinku se považuje blokáda iontového kanálu NMDA receptoru (totožné např. pro MK801, ketamin). Druhé vazebné místo je na NR2C podjednotce NMDA receptoru (Bresink et al., 1995; Parsons et al., 1999; Johnson a Kotermanski, 2006). Navíc ovlivňuje i dopaminergní, serotonergní, cholinergní a noradrenergní systém. Za možnost využití memantinu v humánní

medicíně pravděpodobně zodpovídají kombinace obou mechanismů i odlišná farmakokinetika v porovnání s např. ketaminem (McLean et al., 1992; Parsons et al., 1999; Johnson a Kotermanski, 2006).

Memantin poskytuje důkaz o tom, že je možné vyvinout další klinicky tolerovatelné antagonisty NMDA receptorů.

**Obr. 5:** Strukturní vzorec memantinu



Parsons et al., 1999

#### 2.4.4. LY379268

**LY379268**, (-)-2-oxa-4-aminobicyclo[3,1,0]hexan-4,6-dicarboxylát, patří do skupiny selektivních agonistů skupiny II podskupiny 2/3 mGlu receptorů. Možnost modulování glutamatergní neurotransmise, prostřednictvím aktivace skupiny II mGluR u zvířecích modelů epilepsie, byla již dříve testována na nespecifických a následně i specifických agonistech těchto receptorů (Monn et al., 1999; Moldrich et al., 2001).

Antikonvulzivní aktivita LY379268 byla prokázána nejen u genetických modelů epileptických záchvatů, ale i u záchvatů indukovaných chemicky či elektricky např. u modelu amygdalového kindlingu u potkanů, u genetického modelu absencí u myší (Moldrich et al., 2001; Barton et al., 2003). LY379268 prokázal dlouhotrvající neuroprotektivní efekt po i.p. podání (Bond et al., 2000).

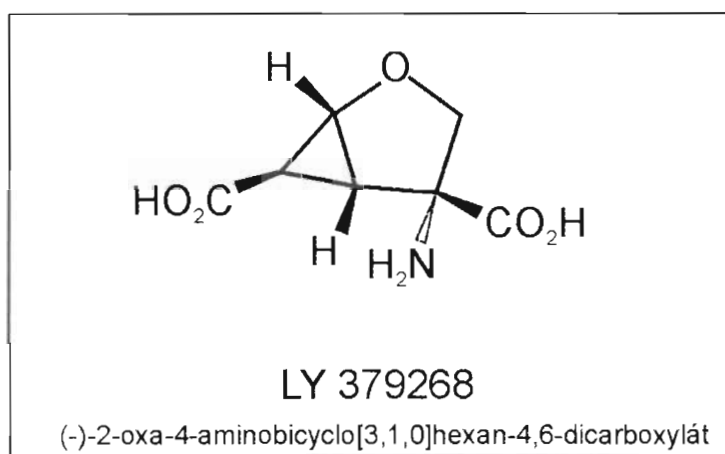


Základním mechanismem účinku agonistů skupiny II mGluR je negativní ovlivnění aktivity adenylátcyklázy, snížení produkce cAMP a influxu  $\text{Ca}^{2+}$  (Moldrich et al., 2001). Farmakokinetické studie prokázaly dlouhodobé přetrvávání dostatečné koncentrace LY379268 pro aktivaci receptorů v mozku (Bond et al., 2000).

Z nežádoucích účinků se uvádí ovlivnění motorických funkcí, sedace, u některých modelů byl prokázán prokonvulzivní efekt (Moldrich et al., 2001).

Mnohé studie prokazují efektivnost LY379268 u záchvatů u zvířecích modelů a potencionální užití ligandů dané skupiny jako antiepileptik (Moldrich et al., 2001).

**Obr. 6:** Strukturní vzorec LY379268



Monn et al., 1999

#### 2.4.5. MK 801

**MK 801**, (dizocilpin malát; (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo (a,d)-cyklohepten-5,10-imin malát), je vysokoafinitní nekompetitivní antagonist NMDA receptorů s výrazným antikonvulzivním účinkem u celé řady modelů epileptických záchvatů u dospělých potkanů i mláďat a u myši (status epilepticus. NMDA model, PTZ model, audiogenní záchvaty u DBA/2 myši - Bisaga et al., 1993; De Sarro et al., 1993 a 1995; Williamson et al., 2004). Jeho nevýhodou jsou však vážné nežádoucí účinky typické pro antagonisty NMDA, jako jsou

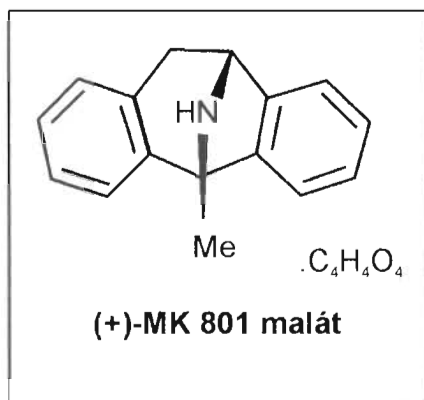
změny chování, ovlivnění spontánní EEG aktivity apod., které brání jeho klinickému použití (Tortella a Hill, 1996; Guscott et al., 2003).

MK 801 účinkuje na vazebném místě lokalizovaném v iontovém kanálu NMDA receptoru, a tím brání vtoku  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Parsons et al., 1995).

Antagonisté iGluR, jako je např. MK 801, PCP nebo agonisté př. kainát mají navíc neurotoxický efekt v různých mozkových strukturách v rozdílných vývojových stádiích. Mezi apoptogenní agens patří rovněž některá klinicky používaná antikonvulziva př. benzodiazepiny, barbituráty apod. (Schmued et al., 1997; Ikonomidou et al., 1999 a 2001; Folbergrová et al., 2000).

Z výše zmíněných důvodů je MK801 často používáno jako srovnávací agens pro nové ligandy GluR u různých modelů epileptických záchvatů, různých neurodegenerativních onemocnění, morfologických studiích apod.

**Obr. 7:** Strukturní vzorec MK 801



Schmued et al., 1997

## 4. Cíl práce

Cílem naší studie bylo stanovit profil antikonvulzivního účinku vybraných ligandů metabotropních glutamátových receptorů u různých modelů epileptických záchvatů u tří věkových skupin mláďat potkana. Dále jej srovnat s účinností antagonistů ionotropních glutamátových receptorů. Navíc jsme sledovali vliv vybraného ligandu metabotropních glutamátových receptorů na spontánní elektrokortikogram a rovněž jeho možný neurodegenerativní efekt.

Záměrem bylo studovat roli glutamátových receptorů při opětovném nastolení rovnováhy excitačních a inhibičních dějů v mozku, i když je tento mechanismus účinku nespecifický ve vztahu k podnětům vyvolávajícím záchvat.

Předpokládali jsme, že látky ovlivňující glutamátové receptory mohou být vhodnými antikonvulzivními agens i pro časná vývojová stádia, která se liší v citlivosti na různé ligandy v porovnání s mozkem dospělým i mezi sebou.

## 5. Metodika

### 5.1. Experiment 1 – Korové následné výboje

#### 5.1.1. Korové následné výboje

Epileptické korové následné výboje vyvolané stimulací sensorimotorické kůry představují model myoklonických záchvatů (Kubová et al., 1996; Mareš a Kubová, 2006).

Lokální elektrická stimulace sensorimotorické oblasti kůry nabízí možnost sledovat různé fenomény. Rytmičká stimulace vyvolá klonické pohyby hlavy a předních končetin, které jsou synchronní s jednotlivými impulsy (tzn. přímá aktivace motorického systému). Pokud je intenzita stimulace dostatečná, objeví se na konci stimulace korový následný výboj (NV) generovaný talmokortikálním systémem. Tyto NV tvořené rytmem hrot-vlna jsou doprovázeny podobnými pohyby, které doprovázejí stimulaci, rovněž tyto pohyby jsou synchronní s jednotlivými ostrými elementy patrnými v EEG záznamu (tj. indikují šíření epileptické aktivity do motorického systému). Použitím vyšších intenzit při stimulaci může dojít k přeměně komplexů hrot-vlna NV v jiný typ záchvatu charakterizovaný velkými delta vlnami a doprovázený automatizmy (šíření epileptické aktivity do limbických struktur) (Mareš et al., 2002; Mareš a Mikulecká, 2004; Mareš a Kubová, 2006). Korové následné výboje mohou být jednoduše vyvolány od ranných vývojových stádií u mlád'at potkana (Mareš et al., 2002; Mareš a Mikulecká, 2004; Mareš a Kubová, 2006). Záchvaty vyvolané elektrickou stimulací trvají pouze po dobu aplikace elektrického proudu, avšak ovlivněna je celá oblast stimulované tkáně (Mareš a Kubová, 2006).

V experimentu mohou být sledovány dva základní fenomény, a to farmakologické ovlivnění prahu pro vyvolání následného výboje při zvyšující se intenzitě elektrického proudu nebo farmakologické ovlivnění délky trvání NV a sledování doby trvání účinku agens při opakované stimulaci o stejné intenzitě elektrického proudu.

Jednotlivé systémy, jako je GABAergní, adenosinový, systémy excitačních

aminokyselin (kainát, glutamát atd.), hrají důležitou roli v generování rytmu hrotvlna, přechodu NV do limbického typu záchvatu a ukončení korových NV (Koryntová et al., 2002; Šlamberová a Mareš, 2005).

Ve studiích provedených na potkanech se uvádí, že některá klinicky užívaná antiepileptika a neurosteroidy potlačují NV např. fenobarbital, valproát, clonazepam, midazolam; pregnanolon. Jiná léčiva mohou naopak prodloužit délku NV př. fenytoin, karbamazepin, primadon, ethosuxinide (Kubová et al., 1996; Polášek et al., 1996; Koryntová et al., 2002; Mareš, 2005).

V literatuře bylo opakovaně popsáno široké spektrum antikonvulzivních účinků ligandů iGluR (Löscher, 1998). Vzhledem k rozmístění a obecným vlastnostem mGluR, se mohou ligandy těchto receptorů rovněž uplatnit při potlačování nadměrné synaptické aktivace v řadě modelů epileptických záchvatů (Löscher, 1998; Moldrich et al., 2003).

Korové epileptické následné výboje tedy reprezentují vhodný model pro testování účinku antikonvulzivních preparátů (Polášek et al., 1996; Kubová et al., 1996).

### 5.1.2. Použitá zvířata

Antikonvulzivní účinek jednotlivých ligandů, tzn. **MPEP**, **MTEP** a **memantinu** byl studován na samcích potkana kmene Wistar u tří věkových skupin, a to 12 (P12), 18 (P18) a 25 (P25) denních mláďat. Den narození byl definován jako P0. Zvířata byla chována v prostředí s regulovaným světelným (12:12 - den/noc; rozsvícení v 6 hod ráno) a tepelným režimem ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ), matky dostávaly standardní dietu ad libitum. Všechna mláďata byla ponechána u svých matek do momentu operace, zahájení experimentu. Veškeré experimenty byly vedeny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat ČR č. 246/1992 Sb., který je plně kompatibilní s „European Community Council Directives 86/609/EEC“.

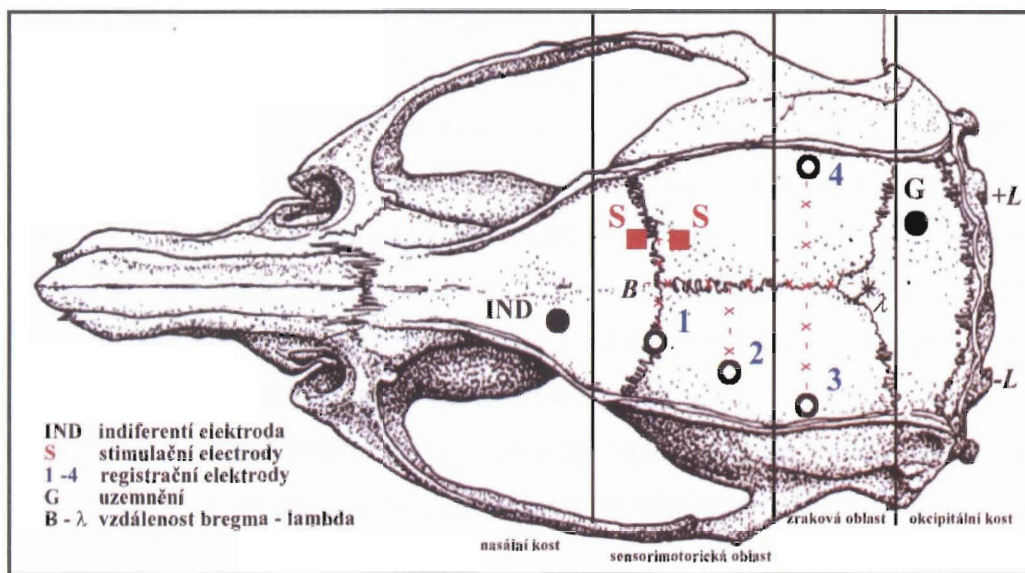
### 5.1.3. Operace

Implantace plochých stříbrných korových epidurálních elektrod byla provedena v etherové anestézii. Jednotlivé elektrody jsme připravili ze 2 cm dlouhého stříbrného drátu rozklepáním jednoho jeho konce na plochu o velikosti 1x1mm,

---

piny napojili na příslušné kabely a zvířata připojili k EEG systému. Koordináty pro mozek mláďat byly přepočítány z koordinát platných pro dospělé mozek potkana, jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v závorkách. Jako základ přepočtu byla stanovena hodnota vzdálenosti bregmy od lambdy - u dospělého potkana 8 mm. Obě stimulační elektrody byly umístěny nad pravou sensorimotorickou oblastí (AP = - 1 a + 1 mm; L = 2 mm), snímací elektrody byly nad levou sensorimotorickou oblastí (AP = 0; L = 2 mm), levou parietální oblastí (AP = 3 mm; L = 3 mm) a okcipitální oblastí kůry nad oběma hemisférami (AP = 6 mm, L = 4 mm). Referenční elektroda byla implantována do nazální kosti a zemní elektroda do týlní kosti (obr. 8). Elektrody byly fixovány nedráždivým zubním cementem. Operace jednoho zvířete trvala maximálně 15 min. Po operaci byla zvířata umístěna do vyhříváných klecí z plexiskla (teplota v hníždě - 34°C). Po probuzení z anestézie měla zvířata ještě 1 hod na zotavení z operace.

**Obr. 8:** Následné výboje - Schéma rozmístění korových elektrod



Paxinos, 1998

#### 5.1.4. Registrace EEG

U epileptických následných výbojů byla sensorimotorická kůra opakovaně stimulována (1-ms bifázické pravouhlé pulzy o frekvenci 8 Hz po dobu 15s) ve dvou různých režimech. Elektrokortikogram byl zesílen, digitalizovaný s frekvencí 500 Hz a ukládán na harddisk počítače. Elektrická aktivita byla zaznamenávána 20 s před stimulací, během stimulace, během následného výboje a minimálně 1 min poté. Chování zvířat bylo přímo zaznamenáváno do počítače během celého záznamu. Typ a trvání následného výboje byl vyhodnoceno off-line. Pro kvantifikaci motorických fenoménů, které se přímo vztahují ke stimulaci a rovněž k následným výbojům, byla použita modifikovaná Racinova stupnice: 0 – žádná aktivita; 1 – motorické aktivity, nesynchronní se stimuly nebo ostrými elementy EEG; 2 – záškuby hlavy; 3 – klonické pohyby předních končetin; 4 – klonické pohyby předních končetin+vztyčování; 5 - klonické pohyby předních končetin+vztyčování+pád (Racine, 1972; Mareš et al., 2002).

##### 5.1.4.1. Registrace následných výbojů

Elektrická stimulace sensomotorické kůry, o stejné intenzitě proudu, byla opakována celkem šestkrát, mezi jednotlivými stimulacemi byl dodržován interval 20 min. Intenzita proudu byla stanovena na začátku každého experimentu pro jednotlivá zvířata tak, aby vyvolala následný výboj typu hrot-vlna. První následný výboj (tj. první stimulace) sloužil jako kontrolní, po něm následovalo podání **MPEP** nebo **MTEP**. Absolutní hodnoty intenzit elektrického proudu pro všechna zvířata v pokuse se pohybovala v rozmezí 2,8 - 5 mA.

Mezi hodnocené parametry patřily pohyby vyvolané stimulací, délka trvání následného výboje, motorické fenomény během následného výboje.

##### 5.1.4.2. Stanovení prahových intenzit stimulace

Sensorimotorická kůra u mláďat potkana byla opakovaně stimulována (18 krát), po podání **memantinu**, se vzrůstající intenzitou elektrického proudu v rozmezí 0,2 -15 mA, časový odstup mezi stimulacemi byl 10 min.

U opakované stimulace, s vzrůstající intenzitou elektrického proudu, je možné

měřit prahovou hodnotu intenzity elektrického proudu pro čtyři základní fenomény, čili pro motorické koreláty během stimulace a pro klonické záškuby doprovázející NV, dále pro vyvolání NV typu hrot-vlna a pro přechod NV do limbického typu (značeného MIX). Rovněž jsme hodnotili délku NV.

### 5.1.5. Aplikace ligandů

#### 5.1.5.1. Aplikace ligandů - MPEP, MTEP

**MPEP** (2-methyl-6-(fenylethynyl)-pyridin), (Tocris Cookson Limited, Bristol, UK), byl čerstvě rozpuštěn ve fyziologickém roztoku o koncentraci 5 mg/1 ml a podán intraperitoneálně (i.p.) 15 min po skončení prvního NV, tj. po první stimulaci v dávkách 10; 20 a 40 mg/kg u všech tří věkových skupin, navíc v dávce 80 mg/kg u dvacetipětidenních potkanů. Kontrolní zvířata dostala fyziologický roztok odpovídajícího objemu dávce 40 mg/kg MPEP. Pro dvacetipětidenní zvířata s dávkou 80 mg/kg byla vytvořena samostatná kontrolní skupina s odpovídajícím objemem. Počty jednotlivých zvířat ve skupině jsou uvedeny v tabulce (tab. 2).

**MTEP** (2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl)pyridin, (Ascent Scientific, Weston-Super-Mare, UK), aplikace (i.p.) proběhla vždy 15 min od skončení prvního následného výboje. MTEP byl před podáním čerstvě rozpuštěn ve fyziologickém roztoku v koncentraci 5 mg/2 ml pro dávky 2,5; 5; 10 mg/kg a 5 mg/1 ml pro dávky 20 mg/kg a 40 mg/kg. Kontrolním zvířatům byl podán fyziologický roztok odpovídajícího objemu, jako byl objem dávky 10 mg/kg MTEP. Jednotlivé věkové i experimentální skupiny byly tvořeny osmi až čtrnácti potkany (tab. 2).

#### 5.1.5.2. Aplikace ligandu - Memantin

Memantin (3,5-dimethyl-1-adamantanamin), (Sigma-Aldrich, UK) byl rovněž rozpuštěn ve fyziologickém roztoku v koncentraci 10 mg/1 ml a podán (i.p.) v dávkách 10 nebo 20 mg/kg, a to 20 min před zahájením první stimulace. Adekvátní objem dávce 10 mg/kg fyziologického roztoku byl aplikován kontrolám. Počet zvířat ve skupině uvádí tabulka (tab. 2).



Tab. 2: Dávky MPEP, MTEP a memantinu a počet zvířat ve skupině

	Model následných výbojů					
	Režim "U"				Režim "I"	
	MPEP		MTEP		Memantine	
Věk [dny]	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat
P12	10	9	2.5	10	10	9
	20	8	5	9	20	8
	40	8	10	8	KO	9
	KO	8	20	10	–	–
	–	–	40	14	–	–
	–	–	KO	11	–	–
P18	10	7	2.5	9	10	8
	20	8	5	8	20	8
	40	8	10	9	KO	9
	KO	8	20	9	–	–
	–	–	40	9	–	–
	–	–	KO	11	–	–
P25	10	7	2.5	9	10	8
	20	8	5	10	20	8
	40	8	10	8	KO	8
	80	8	20	8	–	–
	KO	8	40	9	–	–
	KO/80	8	KO	10	–	–

### 5.1.6. Statistické vyhodnocení

Statistická analýza dat byla vyjádřena průměrnými hodnotami za použití analýzy rozptylu, kde jako faktor analýzy byla stanovena dávka a délka nebo práh následných výbojů v každé věkové skupině, s následným mnohočetným párovým srovnávacím testem (Student-Newman-Keuls test) (SigmaStat® SPSS). Hladina statistické signifikance byla stanovena na 5%.

## 5.2. Experiment 2 – Evokované potenciály

### 5.2.1. Korové evokované potenciály

Evokované potenciály (EP) umožňují získat detailnější informace o vyvolané odpovědi než je tomu obecně u EEG, u kterého nelze přesně stanovit podíl jednotlivých mozkových struktur v odpovědi. Lokalizace evokovaného potenciálu je specifická, je vhodná k mapování sensorických oblastí, zároveň se klinicky využívá k diagnostice poruch sensorických systémů (Tsenov a Mareš, 2003).

V našem experimentu slouží jako model evokovaných potenciálů korové interhemisferické (transkalosální) odpovědi, kde po jednotlivých elektrických podnětech aplikovaných na sensorimotorickou oblast snímáme z povrchu protilehlé kůry komplex pozitivní (P1) a negativní (N1) vlny, které mají monosynaptický původ (Mareš et al., 1993a).

Evokované potenciály podávají v experimentu informaci o účinku látek. Především nás zajímá vliv farmak na intenzitu prahového podnětu. Látky s antiepileptickým účinkem mohou zvyšovat prahovou intenzitu, u prokonvulzivních látek je tomu naopak. Intenzitu prahového podnětu, nutnou pro vyvolání odpovědi, určujeme tak, že opakujeme stimulaci se vzrůstající intenzitou proudu. Z velikosti vyvolaných odpovědí stanovíme prahovou intenzitu (Tsenov a Mareš, 2003). Evokované potenciály dále ovlivňují druhou odpověď při stimulaci párovými podněty s různě dlouhým interstimulačním intervalem. Dle délky interstimulačního intervalu je druhá odpověď zesílena (potenciace) nebo snížena (deprese) (Mareš et al., 1993a; Tsenov a Mareš, 2003).

V dřívějších pracích se uvádí odlišný vliv jednotlivých antiepileptik např. fenytoinu, karbamazepinu, klonazepamu či valproátu na korové transkalosální interhemisferické odpovědi (Mareš et al., 1993a,b).

Role transmitterových systémů v generování komponent korových transkalosálních interhemisferických odpovědí a párových pulsů není stále dobře prostudována (Mareš et al., 1993a). K získání nových informací o množném vlivu glutamatergního systému na kortikální aktivitu, byl studován efekt prostřednictvím ligandu NMDA typu receptorů - **mementinu** na interhemisferické (transkalosální) evokované potenciály.

### 5.2.2. Použitá zvířata

Experiment s antagonistou NMDA receptorů, **memantinem**, byl proveden na samcích mláďat potkana kmene Wistar ve věku 12 (P12), 18 (P18) a 25 (P25) dnů. Podrobné informace, týkající se zacházení se zvířaty v pokuse, se shodují s předešlým experimentem č. 1 a jsou uvedeny v příslušné metodice.

### 5.2.3. Operace

Veškeré detaily týkající se průběhu a provedení operace na mláďatech potkana jsou shodné s experimentem č. 1.

### 5.2.4. Registrace EEG

K vyvolání korových interhemisferických odpovědí byly použity individuální 1 ms trvající bifázické impulsy. Experiment byl proveden na stejném nahrávacím systému jako experiment č. 1, pouze digitalizační frekvence byla odlišná - 1kHz.

#### 5.2.4.1. Vztah mezi intenzitou podnětu a amplitudou odpovědi

Evokované potenciály byly u mláďat potkana vyvolány celkem ve dvou sériích měření. První kontrolní série měření byla provedena před aplikací **memantinu**, druhá následovala 20 min po aplikaci látky. Vznůstající intenzita elektrického proudu při opakovaných stimulacích (13 krát) se pohybovala v rozmezí 0,2 až 4 mA. Osm jednotlivých odpovědí, získaných ze sensomotorické korové oblasti při každé intenzitě stimulace, bylo zprůměrnováno.

Cílem hodnocení bylo korelovat použitou intenzitu podnětu (input) s velikostí odpovědi (output) (amplituda odpovědi byla měřená jako rozdíl vrcholů první negativní a druhé pozitivní vlny), a dále vzájemně srovnat individuální experimentální skupiny.

#### 5.2.4.2. Párové stimulace

Stimulace somatosensorické kůry párovými podněty byla rozdělena do tří sérií měření. Na začátku experimentu byl stanovena prahová hodnota intenzity elektrického proudu pro vyvolání evokovaných potenciálů pro každého potkana

samostatně. Tato série měření proběhla dle stejného postupu jako v předešlém experimentu, přičemž vzrůstající intenzita stimulace začínala od hodnoty 0,2 mA až po dosažení prahu. V druhé sérii byla pro stimulaci párovými podněty použita dvojnásobná hodnota prahu, čili intenzita elektrického proudu je v průběhu experimentu konstantní. V tomto experimentu byly užity párové stimuly s odlišně dlouhými interstimulačními intervaly (rozmezí 20 - 1000 ms), interval se měnil při každé stimulaci (celkem 11). Osm jednotlivých odpovědí, při stejném intervalu mezi stimuly bylo zprůměrnováno. Tato série měření sloužila jako kontrolní, čili předcházela aplikaci **memantinu**. Poslední série pokusu byla zopakována ve stejném režimu avšak 20 min po aplikaci ligandu.

Sledovali jsme vliv délky interstimulačního intervalu mezi prvním a druhým podnětem na vztah druhé k první odpovědi. Měřili jsme amplitudu pozitivní a negativní vlny odpovědi.

#### **5.2.5. Aplikace ligandu - Memantin**

**Memantin** (3,5-dimethyl-1-adamantanamin), (Sigma-Aldrich, UK), byl podán i.p. po ukončení druhé série pokusu, třetí závěrečná série proběhla 20 min po aplikaci. Memantin byl rozpuštěn v koncentraci 10 mg/1 ml pro dávky 10 mg/kg a 20 mg/kg, jako vehikulum sloužil fyziologický roztok. Kontrolním zvířatům byl podán fyziologický roztok odpovídajícího objemu dávce 10 mg/kg. Experimentální skupiny byly tvořeny osmi až deseti potkany (tab. 3).

**Tab. 3:** Dávky memantinu a počet zvířat ve skupině

Model evokovaných potenciálů			
Memantine		Režim "I"	Režim "T"
Věk [dny]	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat	Počet zvířat
P12	10	8	8
	20	8	8
	KO	8	10
P18	10	8	8
	20	8	9
	KO	8	9
P25	10	8	8
	20	8	8
	KO	9	9

### 5.2.6. Statistické vyhodnocení

Pro statistické zhodnocení byla použita analýzy rozptylu průměrných hodnot s následným párovým srovnáním Tukeyho testem (SigmaStat® SPSS). Opět rozdíly byly brány jako signifikantní na  $p < 0.05$ .

## 5.3. Experiment 3 - Model absencí

### 5.3.1. Model generalizovaných záchvatů typu absencí

Typické absence jsou definovány jako generalizované nekonvulzivní epileptické záchvaty s náhlým začátkem i ukončením, trvající většinou 3-30 s. Mají dvě základní komponenty, a to ztrátu vědomí (absence) spojenou s bilaterálně synchronním výbojem o frekvenci přibližně 3-4 Hz v EEG charakterizovaný rytmem typu hrot-vlna. Uvedený typ záchvatů se vyskytuje u dětí nejčastěji od čtyř let věku až do období dospívání (Snead, 1996a; Hu et al., 2000; Panayiotopoulos, 2000; Wang et al., 2005; Mareš a Kubová, 2006).

Farmakologické modely absencí jsou definovány elektro-behaviorální charakteristikou, nejčastěji u potkanů nebo myši (Snead a Liu, 1993). Pro farmakologicky vyvolané modely jsou charakteristické úseky rytmu hrot-vlna o frekvenci 4-5 Hz. Typické geneticky podmíněné modely absencí u laboratorního potkana představují úseky rytmických hrotů o frekvenci 7-9 Hz pocházející z talamických a korových struktur, bez účasti hipokampu (Chan et al., 2006).

Absence jsou způsobeny odchylkou v talamokortikální rytmicitě. Významnou roli v patofyziologii absencí hraje GABAergní i glutamátergní systém (Snead a Liu, 1993 a 1996a,b; Hu et al., 2000; Wang et al., 2005; Alexander a Godwin, 2006a). Za plnohodnotný model humánních absencí je u potkanů považováno intraperitoneální podání pentetrazolu (PTZ), antagonisty GABA<sub>A</sub> receptorů, v dávce 20-35 mg/kg, které vede k záchvatům charakterizovaným v EEG rytmem hrot-vlna a zástavou chování s malými rytmickými záškuby vibris. Zvyšování dávky PTZ (40-60 mg/kg) vede nejprve ke klonickým projevům, poté až ke generalizovaným tonicko-klonickým záchvatům (100 mg/kg) (Snead, 1996a; McLean et al., 2004; Velíšek, 2006). Absence vyvolané podáním PTZ dosahují vrcholu po 20 min po injekci a odeznívají po 80-100 minutách (McLean et al., 2004). PTZ produkuje bilaterálně synchronní výboje typu hrot vlna poprvé u 18ti denních potkanů (Schickerová et al., 1984).

Generalizované absence jsou farmakologicky specifické, reagují pouze na některá antiepileptika, tzn. ethosuximid, valproát, benzodiazepiny, lamotrigin, topiramát, experimentálně na antagonisty GABA<sub>B</sub> receptorů (Snead, 1996a,b;

Russo et al., 2004; Posner et al., 2005; Chan et al., 2006). Jiná léčiva mohou naopak záchvaty zhoršit, př. fenytoin, karbamazepin, vigabatrin, tiagabin atd. (Danober et al., 1998; Knake et al., 1999; McLean et al., 2004).

Ligandy iGluR jsou u modelů absencí účinné. Jejich nevýhodou je však ovlivnění dalších mozkových struktur, a s tím související výrazné nežádoucí účinky. Naproti tomu ligandy mGluR, které se aktivují pouze za specifických podmínek, by mohly selektivně snížit aktivitu glutamatergních synapsí, které jsou právě zapojeny do komunikace kůry s talamem (Snead et al., 2000; Alexander a Godwin, 2006b).

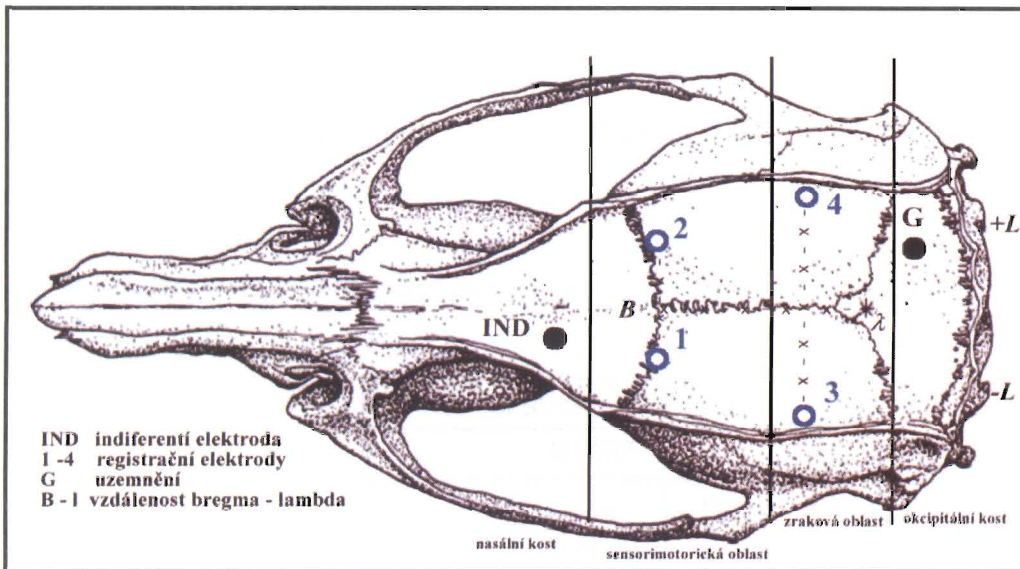
Testovali jsme možnost ovlivnění pentetrazolového modelu absencí prostřednictvím ligandu mGluR5. Uvedené dva modely v experimentu č. 1 a 3 s podobnými vzorci EEG záznamu, ale různými projevy chování mohou přinést nové informace o spektru antikonvulzivních účinků MPEP.

### **5.3.2. Použitá zvířata**

Pro tento experiment byly použity pouze dvě věkové skupiny samců potkana kmene Wistar, a to osmnácti a dvacetipětidenní. Věková skupina dvanáctidenních zvířat nemohla být použita, protože tato zvířata nejsou ještě schopna generovat epizody komplexů hrot-vlna, tzn. rytmickou metrazolovou aktivitu (Schickerová et al., 1984). Podmínky péče o zvířata jsou uvedeny v experimentu č. 1.

### **5.3.3. Operace**

Snímací elektrody byly implantovány epidurálně nad sensorimotorickou (AP = 0 mm, L = 2 mm) a okcipitální (AP = 6 mm, L = 4 mm) oblastí kůry mozkové symetricky nad obě hemisféry (obr. 9). Další podrobnosti týkající se operace byly již popsány v experimentu č. 1.

**Obr. 9:** Model absencí - Schéma rozmístění korových elektrod

Paxinos, 1995

#### 5.3.4. Registrace EEG

EEG byla registrováno na monitorovacím systému, jehož frekvence digitalizace byla 200 Hz. Chování zvířat bylo zaznamenáno digitální kamerou. Všem zvířatům byla před zahájením registrace nechána doba 15 min, aby si přivykla na nové prostředí. Plastové klece, ve kterých zvířata přebývala během experimentu, byly pro osmnáctidenní mláďata vyhřívány na teplotu 34°C. Elektrická aktivita byla zaznamenávána 10 min před aplikací **MPEP**, po dalších 15 min bylo podáno **PTZ**. Záznam EEG byl ukončen 30 min po PTZ injekci.

Hodnotili jsme následující parametry: latenci nástupu prvního komplexu hrotvlna, počet a trvání těchto epizod, které byly počítány ve dvou pětiminutových periodách, 10 - 5 min a 20-25 min po podání pentetrazolu. Dalším parametrem pro analýzu byla celková a průměrná doba trvání počítaných epizod.

#### 5.3.5. Aplikace ligandů - MPEP, pentetrazol

**MPEP**, rozpuštěný ve fyziologickém roztoku o koncentraci 5 mg/1 ml, byl i.p. aplikován v dávce 40 mg/kg u 18ti denních a 40 a 80 mg/kg 25ti denních mláďat potkana. Kontroly dostaly objem fyziologického roztoku odpovídající objemu pro



dávku 40 mg/kg MPEP.

**Pentetrazol** (PTZ, Sigma, St. Louis, MO) v koncentraci 35 mg/1 ml, rozpuštěný v destilované vodě, byl podán i.p. v dávce 35 mg/kg s odstupem 15 min od aplikace MPEP. Záznam EEG byl ukončen 30 min po PTZ injekci. Počet zvířat ve skupinách byl osm (tab. 4).

**Tab. 4:** Dávky MPEP a počty zvířat ve skupině

Model absencí - PTZ35		
MPEP		
Věk [dny]	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat
P18	40	8
	KO-PTZ35	8
P25	40	8
	80	8
	KO-PTZ35	8

### 5.3.6. Statistické vyhodnocení

Analýza rozptylu s dodatečným párovým porovnáním (Student-Newman-Keuls test) byla použita pro statistické vyhodnocení získaných výsledků. Rozdíly byly brány jako signifikantní při  $p < 0.05$ .

## 5.4. Experiment 4 - Monitoring EEG

### 5.4.1. Monitoring EEG

V daném experimentu jsme se zabývali otázkou vlivu MPEP na spontánní EEG aktivitu. Je známo, že antikonvulzivní dávky některých ligandů iGluR i mGluR mají tendenci ovlivňovat spontánní korovou EEG aktivitu i chování zvířat, např. MK801, (+)-HA966, AIDA atd. (Tortella a Hill, 1996; Petersen et al., 2002). Naproti tomu, v případě antagonisty mGluR5 - **MPEP**, nejsou motorické schopnosti ani chování potkanů významně ovlivněny (Petersen et al., 2002; Mareš a Mikulecká, 2004).

### 5.4.2. Použitá zvířata

EEG monitoring jsme provedli u všech tří věkových skupin mláďat potkana, tzn. P12, P18 a P25. Osmnácti a dvacetipětidenní zvířata byla během experimentu převedena na umělou výživu. Dvanáctidenní zvířata byla během dne v určitých časových intervalech vracena k matce.

### 5.4.3. Operace

Operce korových stříbrných elektrod proběhla podle stejného postupu jako u experimentu č. 3.

### 5.4.4. Registrace

Potkani byli chováni za standardních podmínek během celého monitorování, podrobnosti uvedeny v experimentu 3. Video EEG bylo registrováno na monitorovacím systému (digitalizační frekvence EEG aktivity byla 200 Hz). Byla provedena frekvenční analýza v rozsahu 0,5-15 Hz se šíří třídy 0,5 Hz. Výsledky byly zobrazeny buď kontinuálně nebo byly automaticky klasifikovány do čtyř frekvenčních pásem (delta, théta, alfa a beta). Dále bylo EEG vizuálně vyhodnoceno.

### Registrace EEG – 2 hod záznam

V návaznosti na pozorování vycházející z experimentu č. 3 jsme nejprve provedli

pilotní experiment s krátkým časovým intervalem záznamu, a to u všech tří věkových skupin. Schéma pokusu se shodovalo s experimentem č. 3, čímž byl předešlý pokus doplněn o další experimentální skupinu. Na 15 min monitoring spontánního EEG navázala aplikace **MPEP**, za dalších 15 min byl místo PTZ podán fyziologický roztok a záznam EEG pokračoval další 2 hod.

Hodnotili jsme výskyt rytmických pomalých vln, které se ukázaly jako typické pro efekt MPEP, zejména latenci jejich výskytu.

#### 5.4.4.2. Registrace EEG - 24 hod záznam

Na základě výsledků získaných z registrace EEG po aplikaci MPEP s krátkým časovým intervalem záznamu, jsme navíc provedli u všech tří věkových skupin 24 hod monitorování EEG aktivity. Kontrolní EEG jsme registrovali 15 min, poté následovala aplikace **MPEP** a záznam trval minimálně po dobu dalších 24 hod od aplikace. Záznam na kameru jsme nahrávali po dobu 1 hod po aplikaci.

U dvanáctidenních zvířat se schéma pokusu drobně lišilo. Během dne byla mláďata, po dvou hodinách monitoringu a dvouhodinovém záznamu na kameru, vrácena k matce na 2 hod. Následoval tříhodinový monitoring, přes noc byla zvířata opět u matky. Další den jsme zopakovali tříhodinovou registraci, která skončila 24 hod od aplikace MPEP.

Mezi hodnocené parametry jsme zahrnuli latenci výskytu prvních epizod, jejich délku a počet epizod a délku trvání efektu MPEP.

#### 5.4.5. Aplikace ligandů - MPEP

Dávka agonisty byla vybrána na základě výsledků dřívějších výsledků o jeho antikonvulzivní účinnosti (Mareš et al., 2004). **MPEP**, v dávce 40 mg/kg o koncentraci 5 mg/1 ml čerstvě rozpuštěný ve fyziologickém roztoku, byl podán i.p. Kontrolní potkani opět dostali odpovídající objem čistého rozpouštědla. Kontrolní a experimentální skupinu tvořilo 3-8 potkanů (tab. 5).

**Tab. 5:** Dávky MPEP, časové intervaly a počty zvířat ve skupině

EEG monitoring			
MPEP			
Věk [dny]	Interval	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat
P12	24hod	40	8
		KO	8
	2hod	40	6
P18	24hod	40	8
		KO	8
	2hod	40	3
P25	24hod	40	8
		KO	8
	2hod	40	4

#### 5.4.6. Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení průměrných hodnot jednotlivých parametrů byla použita analýza rozptylů (SigmaStat® SPSS), hladina statistické signifikace byla stanovena na 5%.

## 5.5. Experiment 5 – Morfologická studie

### 5.5.1. Morfologická studie

Fluoro-Jade B (FJB) je fluorescenčním márkrem, který se využívá pro histologická barvení neuronů k detekci neuronální degenerace. FJB umožňuje spolehlivou, rychlou a specifickou detekci degenerujících neuronů (buněčné tělo, dendrity, axony a axonální zakončení). FJB pozitivní neurony se jeví jako zelené v modrém excitačním světle (450-490 nm) (Schmued a Hopkins, 2000).

Použití FJB má své opodstatnění při studiu patologických jevů v mozku, demence, neuroprotektce, také v toxikologii a ve vývojových studiích (Schmued a Hopkins, 2000).

Pro identifikaci cytoarchitectonických rozhraní mezi jednotlivými mozgovými strukturami bylo použito Nisslovo barvení (kresylviolet).

V naší práci nás zajímal vzájemný vztah mezi antikonvulzivním účinkem, změnami vyvolanými ve spontánním EEG po podání **MPEP** a dále, zda endogenní aktivace mGluR5 tímto ligandem přispívá k neuronální degeneraci. Sledovali jsme morfologické změny po aplikaci **MPEP** ve vybraných mozkových strukturách, tzn. v mozkové kůře, talamu, hipokampální formaci (uvedené struktury byly vybrány na základě jejich účasti v epileptické aktivitě použitých modelů a lokalizaci mGluR5 receptorů). **MK801** sloužilo v našem experimentu jako pozitivní kontrola.

### 5.5.2. Použitá zvířata

Možnou neuronální degeneraci jsme studovali na mláďatech potkana kmene Wistar, ve věku P12, P18 a P25. Zvířata byla chována za standardních podmínek uvedených v experimentem č. 1.

### 5.5.3. Histologická procedura

V naší práci jsme celkem použili tři časové intervaly. Dvacet čtyři, dvanáct a čtyřicet osm hodin po aplikaci **MPEP** nebo **MK 801** byla zvířata perfundována. Po skončení daného časového intervalu, po podání láky nebo fyziologického roztoku, byla při předávkování urethanové anestézie (20%; 2 g/kg i.p., Sigma)

---

zahájena perfuze 0,01M fosfátovým pufrům (PBS; 80% váhy zvířete) o pokojové teplotě. Perfuze pokračovala se 4% roztokem paraformaldehydu v 0,2M PBS (300% váhy zvířete).

Mozky perfundovaných potkanů byly následně postfixované ve 4% roztoku paraformaldehydu při 4°C po 3 hod. Dále byly postupně dány do jednotlivých roztoků sacharózy v 0,1M draselném pufru (KPBS) se vzrůstající koncentrací: 10% na 24 hod; 20% na 24 hod a 30 % na 3 dny. Následně byly mozky zamrazeny v suchém ledu a uloženy do -70°C. Koronární řezy byly nakrájeny na 50 µm silné řezy (1 v sérii pěti řezů) cryocutem Leica CM 1900. Jednotlivé řezy byly do dalšího zpracování uchovávány -20°C v kryoprotektivním roztoku (30% ethylenglykol, 25% glycerol v 0,05M sodnofosfátovém pufru). Každý pátý koronární řez byl použit pro Nisslovo barvení (kresylviolet), každý čtvrtý na barvení na Fluoro Jade B.

Fluoro-Jade B (FJB) je selektivní barvení pro degenerující neurony a jejich výběžky bez ohledu na typ buněčné smrti. Řezy byly obarveny na FJB dle protokolu popsaného Schmuedem a Hopkinsem (2000). Řezy byly analyzovány na fluorescenčním mikroskopu Olympus AX70 (nastavení filtru: excitační „band“ 450 - 490 nm a excitační band“ nad 515 nm). Obrázky jsou vyfoceny digitální kamerou Olympus DP-70.

Nisslovo barvení (kresylviolet) bylo použito pro identifikaci rozhraní mezi mozkovými strukturami.

#### 5.5.4. Hodnocení

Histologické hodnocení bylo zaměřeno na mozkovou kůru, talamus a hipokampální formaci, tzn. oblasti, kde jsou přítomny glutamátové receptory, a které souvisejí s epileptickou aktivitou.

Prohlédli jsme všechny řezy z hipokampu (AP: -1.5 do -7 mm) a talamu (AP: -1 do -5 mm) dle atlasu Paxinose a Watsona (1998), tzn. na jednu strukturu a potkana připadalo přibližně 5-7 řezů. Distribuce a počet degenerujících (FJB pozitivních) neuronů ve vybraných oblastech byly hodnoceny za použití objektivu s 20ti a 40ti násobným zvětšením.

### 5.5.5. Aplikace ligandů - MPEP, MK 801

**MPEP** v dávce 40 mg/kg v koncentraci 5 mg/1 ml a **MK 801** v dávce 1 mg/kg a koncentraci 1 mg/1 ml, byly čerstvě rozpuštěny ve fyziologickém roztoku. Kontrolním potkanům byl podán odpovídající objem fyziologického roztoku. MPEP, MK 801 i fyziologický roztok byly podány intraperitoneálně.

Dávky obou antagonistů byly vybrány na základě našich dřívějších výsledků z pokusů o jejich antikonvulzivní aktivitě (Mareš et al., 2004). Jednotlivé věkové skupiny zvířat jsou tvořeny 1-10 zvířaty (tab.: 6).

**Tab. 6:** Dávky **MPEP**, časové intervaly a počty zvířat ve skupině

Morfologická studie - barvení na FluoroJade-B a Nissl					
Věk [dny]	Interval	MPEP		MK801	
		Dávka [mg/kg]	Počet zvířat	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat
P12	24hod	40	10	1	4
		KO	10	KO	1
	12hod	40	4	–	–
		KO	1	–	–
	48hod	40	4	–	–
		KO	1	–	–
P18	24hod	40	8	1	7
		KO	8	KO	3
	12hod	40	4	–	–
		KO	1	–	–
P25	24hod	40	8	1	4
		KO	8	KO	1
	12hod	40	4	–	–
		KO	1	–	–

---

## 5.6. Experiment 6 – Model generalizovaných tonicko-klonických záchvatů

### 5.6.1. Model generalizovaných tonicko-klonických záchvatů

Generalizované tonicko-klonické záchvaty (GTKZ) představují model humánních generalizovaných konvulzivních záchvatů. V experimentu je možné je vyvolat chemicky látkami s konvulzivními účinky nebo elektrošoky. Mají tři základní motorické složky, a to krátkou fází divokého běhu, tonickou (tonická flexe a extenze) a klonickou fází (Mareš, 1991). V EEG se na začátku záchvatu objevují rytmické hroty, následují komplexy hrot-vlna (Mareš et al., 1980).

Jako model chemických GTKZ jsme použili antagonistu GABA receptorů - pentetrazol (PTZ). Dle použité dávky lze vyvolat různé modely záchvatů př. model absencí, klonické záchvaty a zmíněné GTKZ. Vysoké dávky pentetrazolu vyvolávají tonicko-klonické záchvaty a reprezentuje rutinní test pro screenig antikonzulziv (Velíšek, 2006). V testu se hodnotí ovlivnění latence nástupu záchvatu a jeho stupně závažnosti (Haugvicová et al., 2000).

Porušená rovnováha v glutamatergní i GABAergní neurotransmisi patří mezi primární patologické mechanismy v etiologii GTKZ (Moldrich et al., 2001). Klasická antikonzulziva jako např. karbamazepin, fenytoin a antagonisté NMDA receptorů potlačují tonicko-klonické záchvaty (Velíšek, 2006).

V současné době je trendem ovlivnit glutamatergní transmissi prostřednictvím aktivace mGlu II receptorů u různých zvířecích modelů epilepsie (Moldrich et al., 2001).

### 5.6.2. Použitá zvířata

Experiment jsme provedli na mláďatech potkana kmene Wistar, tj. samcích ve věku P12, P18 a P25. Zacházení se zvířaty je popsáno v experimentem č. 1.

### 5.6.3. Pozorování

Potkani byli sledováni jednotlivě v klecích z plexiskla po celou dobu experimentu, tzn. od momentu podání **LY379268** po dobu 30 min, dalších 30 min po podání PTZ. Před zahájením experimentu jsme nechali zvířata 15 min, aby si zvykla v novém prostředí klece. Tělesná teplota mláďat byla udržována vyhříváními



podložkami na 34°C teploty hnízda.

Zaznamenávali jsme motorické fenomény během GTKZ, tzn. pentetrazolem vyvolané fenomény, jako jsou záškuby, minimální pentetrazolové záchvaty, klonické záškuby hlavy a předních končetin se zachovaným vzpřimovacím reflexem a generalizované tonické záchvaty se ztrátou vzpřimovacího reflexu. Stupeň závažnosti záchvatu byl hodnocen za použití pěti bodové stupnice: 0 - žádný fenomén; 1- záškuby; 2 – atypické minimální záchvaty; 3 – typické minimální záchvaty; 4 – záchvat bez tonické komponenty; 5 – plně vyvinutý záchvat. Průměrné skóre jsme spočítali pro každou dávku a věkovou skupinu (Pohl a Mareš, 1987).

Vyhodnotili jsme uvedené základní parametry: latenci, incidenci, behaviorální projevy a letalitu.

#### **5.6.4. Aplikace ligandů - LY379268**

**LY379268** (-)-2-oxa-4-aminobicyklo[3,1,0]hexane-4,6-dicarboxylát, (Eli Lilly & Co. Ltd., UK), byl podán i.p. v dávkách 2,5; 5; 10 a 20 mg/kg u P12 a P18, u nejstarší testované věkové skupiny P25 v dávkách 2,5; 5 a 10 mg/kg. Koncentrace roztoku byla 10 mg/1 ml, rozpouštědlem opět fyziologický roztok. Kontrolním zvířatům bylo podáno odpovídající množství fyziologického roztoku namísto **LY379268**.

**Pentetrazol** (PTZ, Sigma, St. Louis, MO) byl rozpuštěno ve fyziologickém roztoku o koncentraci 50 mg/1 ml a podáno subkutánně v dávkách 100 mg/kg všem třem věkovým skupinám. Interval mezi injekcemi byl 30 min. Počet zvířat ve skupinách se pohyboval v rozmezí 6 až 8 (tab. 7).

**Tab. 7:** Dávky LY379268 a počty zvířat ve skupině

Model generalizovaných tonickoklonických záchvatů - PTZ100		
LY379268		
Věk [dny]	Dávka [mg/kg]	Počet zvířat
P12	2.5	6
	5	6
	10	6
	20	6
	KO-PTZ100	8
P18	2.5	6
	5	6
	10	6
	20	6
	KO-PTZ100	8
P25	2.5	7
	5	6
	10	6
	KO-PTZ100	7

#### 5.6.4. Statistické vyhodnocení

Incidence epileptických záchvatů byla statisticky vyhodnocena Fischerovým testem, latence a závažnost záchvatu ANOVou (SigmaStat SPSS). Stupeň statistické signifikace byl stanoven na 5%.

## 6. Výsledky

### 6.1. Experiment 1 - Korové následné výboje

#### 6.1.1. Registrace následných výbojů

##### 6.1.1.1. MPEP

###### Motorické fenomény

U skupiny kontrolních zvířat nebyl prokázán rozdíl v intenzitě pohybů během opakovaných stimulací. Přímá aktivace senzomotorické kůry, vyvolaná rytmickou elektrickou stimulací, nebyla signifikantně ovlivněna podáním MPEP u sledovaných věkových skupin.

U kontrolních zvířat se skóre závažnosti klonických projevů, doprovázejících následné výboje, pohybovalo v rozmezí průměrných hodnot 2,2 a 3 Racinovy stupnice. Žádné signifikantní rozdíly se však neprojevily během opakované stimulace ani u jedné ze sledovaných věkových skupin. Intenzita klonických záchvatů nebyla rovněž výrazně změněna po podání MPEP u žádné skupiny potkanů.

###### Délka následných výbojů

###### Dvanáctidenní potkani

Dvanáctidenní kontrolní zvířata se vyznačovala progresivním prodlužováním následných výbojů během opakovaných stimulací. Všechny následné výboje, vyvolané po podání fyziologického roztoku (druhá až šestá stimulace), byly signifikantně delší než následný výboj po stimulaci první (graf 1A). Ukázalo se, že obě vyšší dávky MPEP (20 a 40 mg/kg) byly u P12 schopny zablokovat toto prodlužování následných výbojů. U dávky 20 mg/kg je zřejmá tendence ke zkrácení druhého NV, ale rozdíl nedosáhl hladiny signifikance. Poté byla patrná tendence prodlužování NV při opakovaných stimulacích, šestý NV byl už signifikantně delší než druhý (graf 1). Naopak dávka 40 mg/kg vedla k signifikantnímu zkrácení druhého NV. Tendence k prodlužování NV byla zřejmá, ale i šestý NV byl kratší než první. Na druhé straně třetí až šestý NV byly signifikantně delší než druhý (graf 1). Efekt dávky 10 mg/kg byl jen částečný,

---

prodlužování NV při opakovaných stimulacích bylo pouze zpožděno. Pokud srovnáváme následné výboje během jednotlivých stimulací se stimulací první (tzn. před podáním MPEP), 5. a 6. NV u 10 mg/kg byl signifikantně delší (graf 1). Dále se ukázalo, že obě vyšší dávky MPEP (20 a 40 mg/kg) u dvanáctidenních mláďat potkana vedly k signifikantnímu zkrácení délky následných výbojů v porovnání s odpovídající kontrolní skupinou v rámci jedné stimulace. U nejnižší dávky MPEP (10 mg/kg) bylo pozorováno zkrácení NV pouze po třetí stimulaci (graf 1).

#### Osmnáctidenní potkani

U této věkové skupiny u kontrolních zvířat bylo taktéž pozorováno pozvolné prodlužování následného výboje během opakovaných stimulací. Pokud porovnáváme první následný výboj s ostatními, signifikantní rozdíl v délce najdeme pouze u šestého následného výboje (graf 1). Při porovnání příslušného NV před aplikací dávky 20 a 40 mg/kg a poté, zjišťujeme, že, druhý následný výboj se signifikantně zkrátil. Po jasném zkrácení, které následovalo po aplikaci MPEP, měly následné výboje tendenci se prodlužovat, ale jediný signifikantní rozdíl se ukázal u dávky 10 a 20 mg/kg (šestý NV byl delší než druhý) (graf 1).

Podání MPEP vyvolalo zkrácení následných výbojů u obou experimentálních skupin s vyšší dávkou v porovnání s kontrolami. Již zmíněné zkrácení bylo signifikantní u obou vyšších dávek během druhého, třetího a čtvrtého následného výboje. Dávka 10 mg/kg MPEP nevedla k signifikantním změnám v délce trvání NV (graf 1).

#### Dvacetpětidenní potkani

I když je u kontrolní skupiny s nižším objemem podaného fyziologického roztoku jasná tendence k prodlužování následných výbojů během opakované stimulace, nebyl prokázán signifikantní rozdíl v trvání jednotlivých NV. Opačná situace nastala u kontrol, kterým byl podán větší objem fyziologického roztoku. U této kontrolní skupiny se projevilo signifikantní prodloužení následných výbojů u všech stimulací ve srovnání s první.

U experimentálních skupin se neukázal signifikantní rozdíl průměrných hodnot délky následného výboje proti kontrolám. Jedinou výjimkou je zkrácení NV po

druhé stimulaci při dávce 40 a 80 mg/kg. Co se týče individuálních dávek, skupina s nejnižší dávkou MPEP prokázala prodloužení NV již od třetí stimulace v porovnání s první. Ostatní tři vyšší dávky MPEP vyvolaly zkrácení a následné prodloužení NV. Tato druhá fáze (prolongace NV) vede k signifikantním rozdílům při srovnání prvního a druhého NV s třetím až šestým NV u dávky 20 a 40 mg/kg; dále pak druhého s čtvrtým až šestým NV u nejvyšší dávky (graf 1).

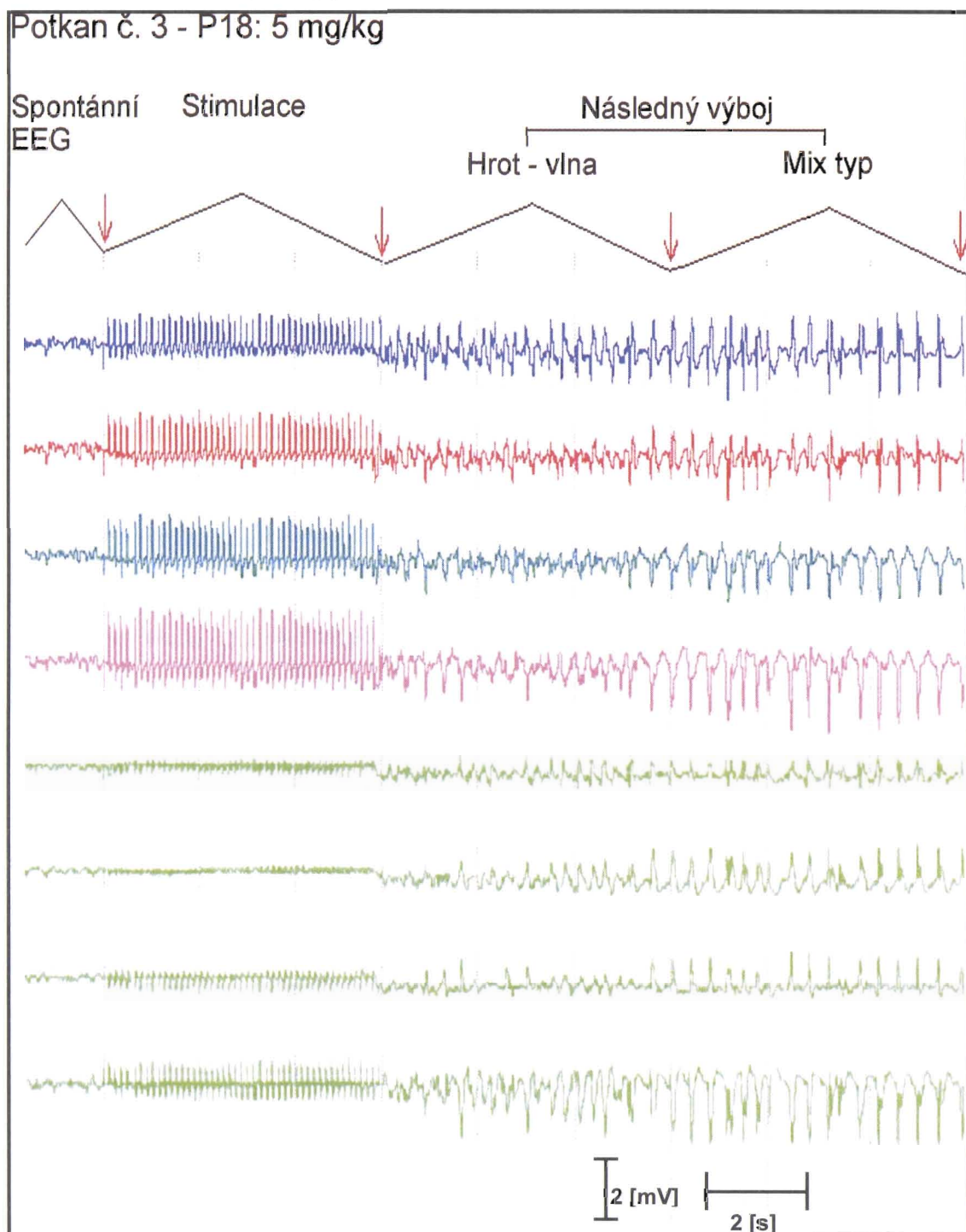
#### Srovnání tří věkových skupin

Při srovnání všech tří věkových skupin byly nalezeny signifikantní rozdíly v délce následných výbojů. Dvanáctidenní kontrolní zvířata ukázala signifikantně delší NV než obě starší věkové skupiny kontrolních zvířat, signifikantní rozdíl se projevil u třetího, čtvrtého a pátého NV. Dvanáctidenní zvířata s dávkou 10 mg/kg ukázala rozdíl vůči 18- a 25denním zvířatům pouze u stimulace č. 6. U dávky 20 mg/kg byly rovněž prokázány signifikantní rozdíly délky následných výbojů mezi jednotlivými věkovými skupinami. 25ti denní zvířata vykazovala signifikantně menší zkrácení NV než 18denní. Signifikantní rozdíly nebyly prokázány u sledovaných věkových skupin při dávce 40 mg/kg.

Pokud dáme dohromady všechny následné výboje z první stimulace (tj. všechny před aplikací) a srovnáme jednotlivé věkové skupiny mezi sebou, nenajdeme u těchto kontrolních stimulací signifikantní rozdíl. Taktéž nebyl patrný rozdíl při srovnání první stimulace kontrol proti první stimulaci u experimentálních skupin ve všech sledovaných věkových skupinách.

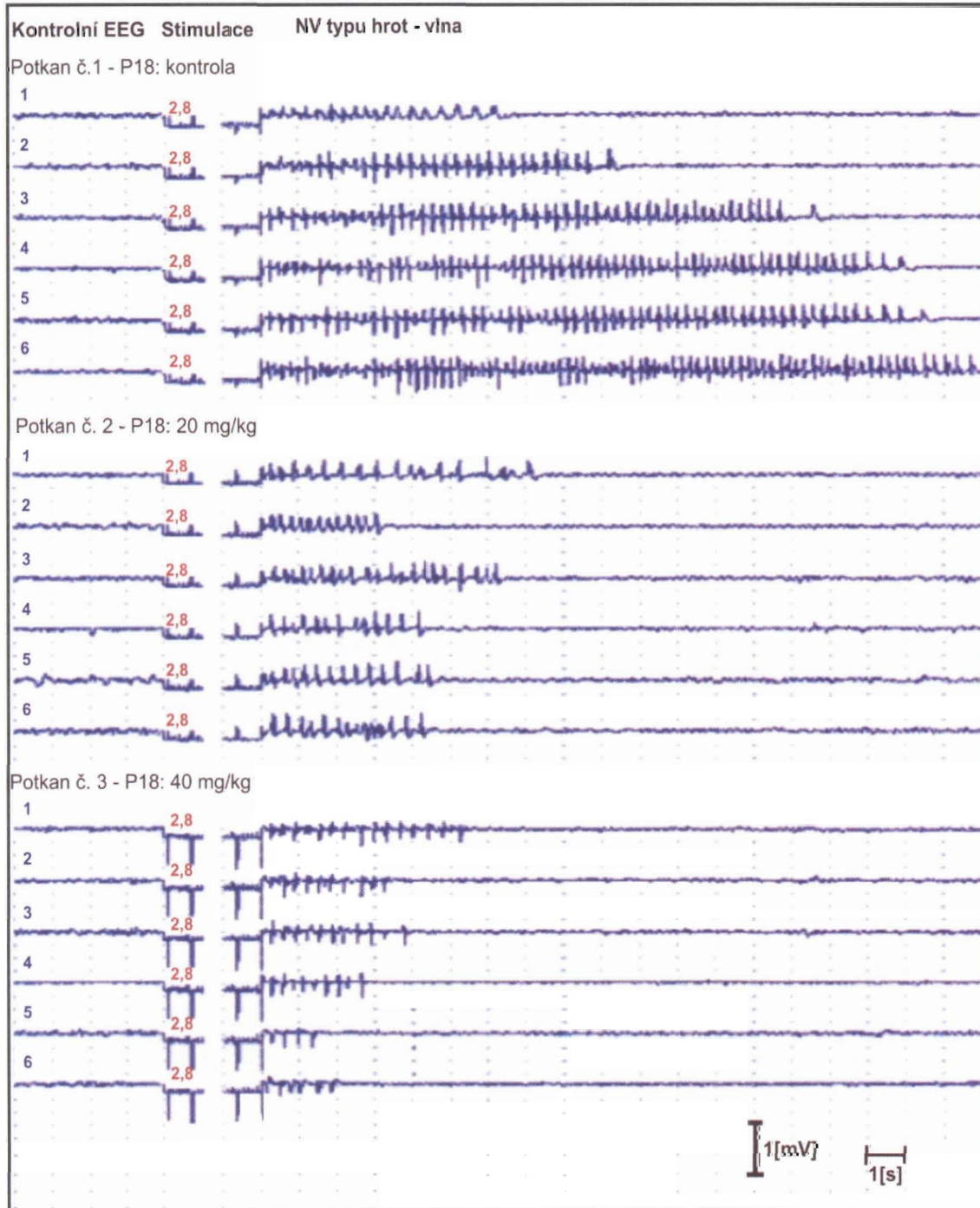
Přechod NV typu hrot-vlna do smíšeného typu záchvatu (MIX) charakterizovaného pomalými vlnami v EEG jsme zaznamenali pouze výjimečně a to ve všech věkových skupinách. Uvedená změna EEG vzorce byla doprovázena změnami v chování - klonické záškuby přešly v automatismy (obr. 10).

**Obr. 10:** Ilustrativní záznam EEG zobrazuje dva typy následných výbojů u kontrolního osmnáctidenního potkana. V záznamu je uvedeno EEG před stimulací, stimulace (zkrácený záznam), následný výboj typu hrot-vlna a přechod do smíšeného typu (MIX). Šipky naznačují hranice čtyř jmenovaných fenoménů v EEG, kalibrace amplitudy je 2 mV, časová značka 2 s.



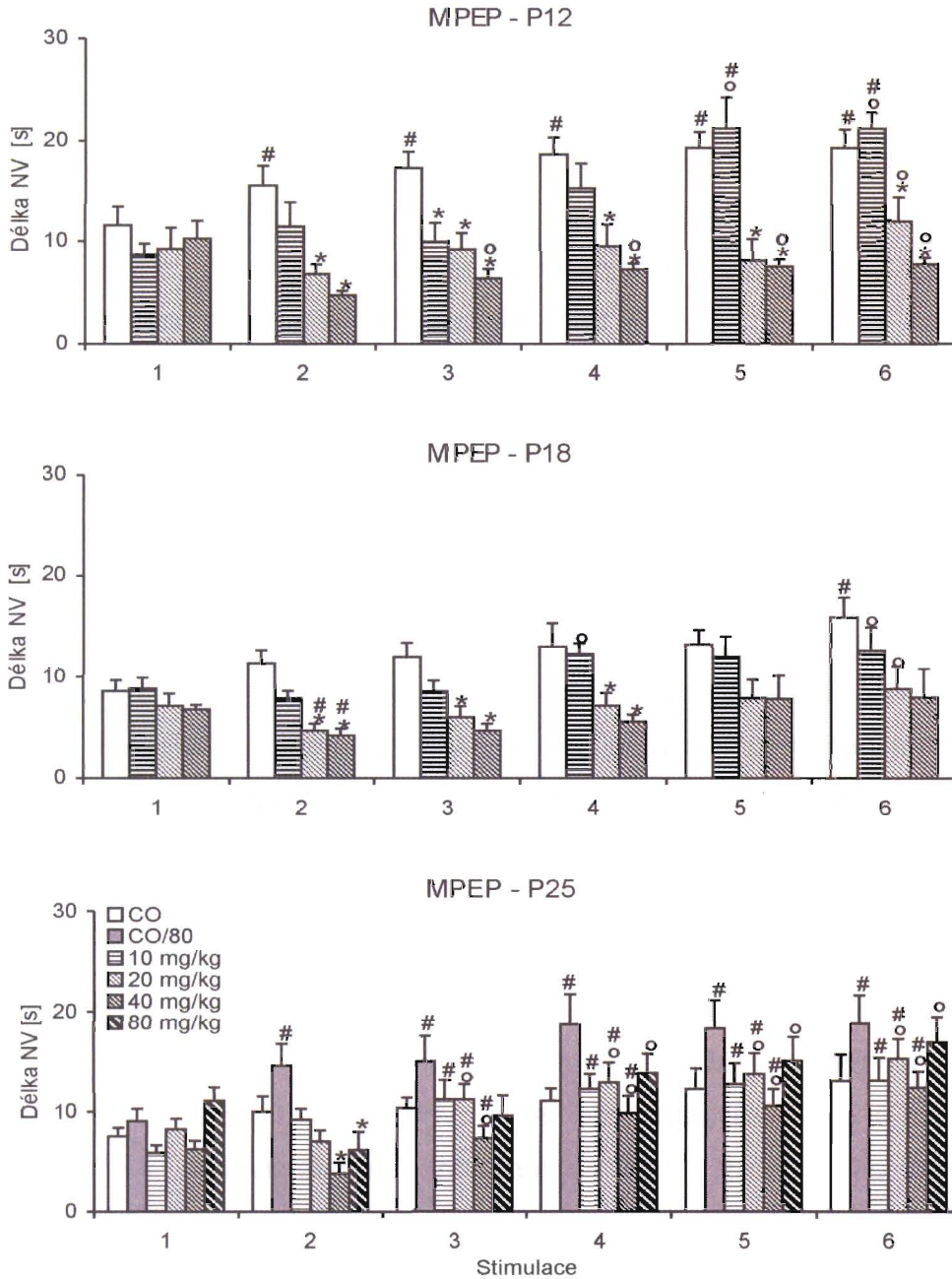
**Obr. 11:** Následné výboje – vliv MPEP

Srovnání korových následných výbojů u tří 18denních zvířat, a to shora dolů kontrolní zvíře, potkan s dávkou 20 a s dávkou 40 mg/kg MPEP. Pro každé zvíře je zobrazeno šest po sobě jdoucích NV, intenzita stimulace byla u všech tří 2,8 mA. Podstatná část záznamu stimulace je vynechána (13 s). Aplikace proběhla 15 min po první stimulaci. 1-6 je číslo stimulace, amplitudová kalibrace je 1 mV, časová značka 1 s.



**Graf 1: Následné výboje - vliv MPEP**

Efekt MPEP na délku korových epileptických následných výbojů (průměr + S.E.M.) u 12-, 18- a 25denních zvířat. MPEP nebo fyziologický roztok byly podány po první stimulaci. Na ose x je počet stimulací, na ose y délka NV [s]. Signifikantní rozdíly mezi NV a odpovídající kontrolní skupinou jsou označeny hvězdičkou (\*). Signifikantní rozdíly proti odpovídajícímu prvnímu NV jsou značeny dvojitým křížkem (#), proti druhému NV kolečkem (o).





### 6.1.1.2. MTEP

#### Motorické fenomény

Výsledky kontrolních skupin odpovídaly údajům uvedeným v předcházející kapitole popisující účinky MPEP. U všech tří věkových skupin a jednotlivých dávek MTEP nebyly signifikantně ovlivněny ani pohyby vyvolané přímo stimulací, ani klonické záškuby během následného výboje.

#### Délka následných výbojů

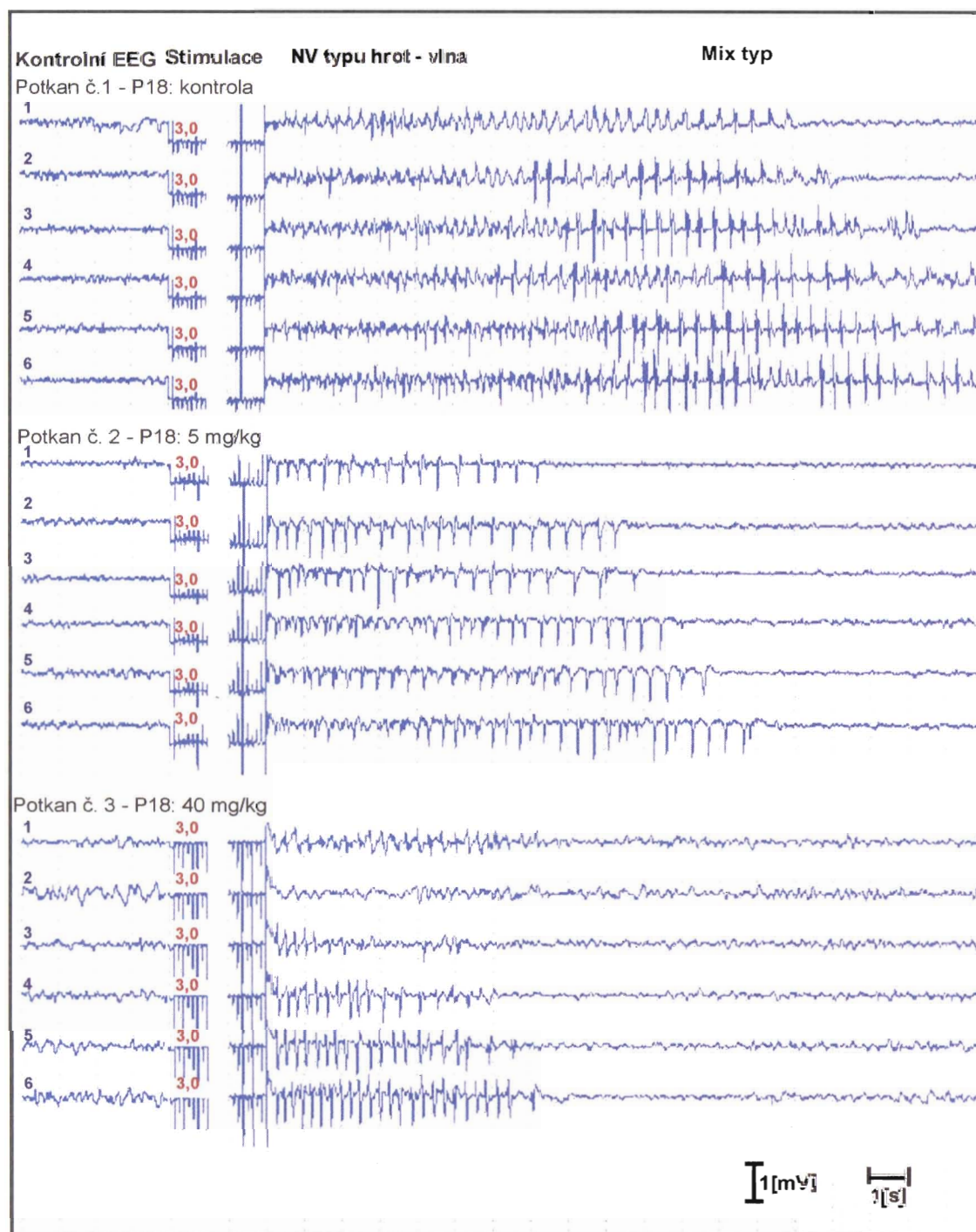
Pouze tendence ke zkrácení délky NV byla pozorována u všech tří věkových skupin s MTEP, a to po dávku 20 mg/kg. Nejvyšší dávka (40 mg/kg) vedla však k signifikantnímu zkrácení v porovnání s kontrolami. U 12denních potkanů u stimulace druhé až páté, u osmnáctidenních mláďat u všech stimulací počínaje druhou, u 25denních jen u stimulace druhé (graf 2).

Při porovnání prvního následného výboje s ostatními u P12, signifikantní rozdíl v délce najdeme pouze u čtvrtého až šestého následného výboje u kontrol a šestého u dávky 10 mg/kg (graf 2). U osmnáctidenních zvířat jsme zjistili, že v porovnání s daným NV před aplikací fyziologického roztoku u kontrol se signifikantně prodloužil 4. až 6. následný výboj. Dále pak u dávek 5; 20 mg/kg a u kontrol v porovnání s druhým NV se objevilo prodloužení u stimulace č. 6, u dávky 10 mg/kg u stimulace páté. U dvacetipětidenních kontrolních zvířat po třetí stimulaci se následné výboje signifikantně prodlužovaly v porovnání s délkou NV po stimulaci první, u dávky 2,5 mg/kg po stimulaci čtvrté. Signifikantní rozdíl se rovněž ukázal po stimulaci č. 5 u dávky 20 a 40 mg/kg v porovnání se stimulací druhou, také u dávky 5; 20 a 40 mg/kg v porovnání se stimulací první i druhou (graf 2).

U některých zvířat všech experimentálních skupin jsme zaznamenali přechod typu NV hrot-vlna do smíšeného typu záchvatu (MIX) charakterizovaného pomalými vlnami v EEG, a to nejdříve u třetí stimulace. Tato změna byla rovněž doprovázena behaviorálními změnami, tzn. z klonického záchvatu k automatismům.

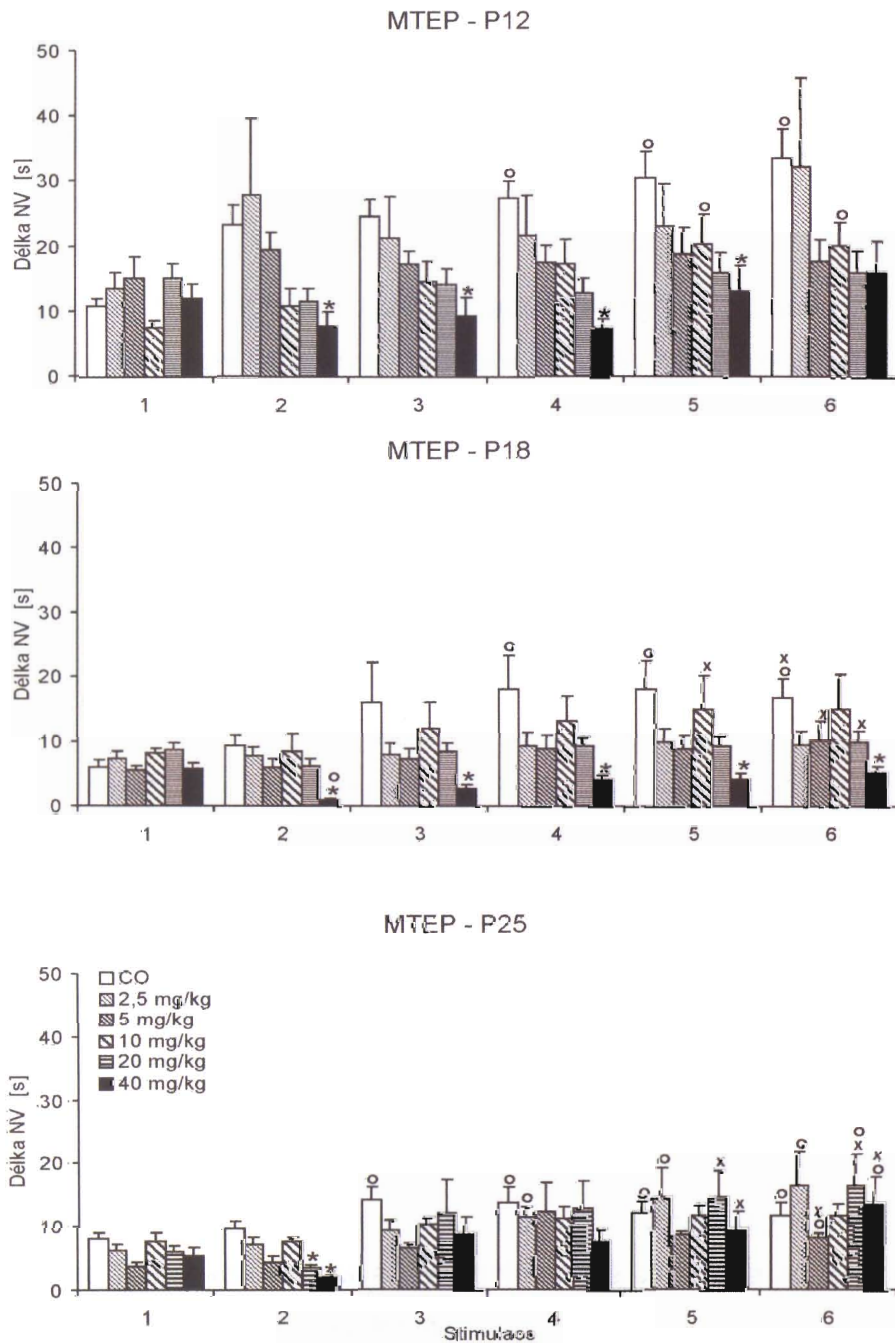
**Obr. 12.:** Následné výboje – vliv MTEP

Obrázek uvádí EEG záznam tří osmnáctidenních zvířat, shora dolů kontroly, zvíře s dávkou 5 mg/kg a s dávkou 40 mg/kg MTEP. Detaily jsou stejné jako u obrázku č. 11.



**Graf 2: Následné výboje – vliv MTEP**

Vliv podání MTEP po prvním NV na délku korových následných výbojů (průměrná hodnota + S.E.M.). Na ose x jsou vyneseny jednotlivé stimulační (celkem šest) u kontrol a zvířat s různou dávkou MTEP, na ose y délka NV v sekundách. Signifikantní rozdíly mezi NV a odpovídající kontrolní skupinou jsou označeny hvězdičkou (\*). Rozdíly v dané skupině s odpovídajícím prvním NV kolečkem (o), s druhým NV křížkem (x).



## 6.1.2. Stanovení prahových intenzit stimulace

### 6.1.2.1. Memantin

#### Motorické fenomény

Prahová intenzita, potřebná pro vyvolání pohybů doprovázejících stimulaci a následné výboje, nebyla signifikantně ovlivněna memantinem u žádné z věkových skupin v porovnání s kontrolami.

Pohyby během stimulace nebyly ovlivněny podáním memantinu v porovnání s kontrolami. Intenzita klonických křečí během následného výboje byla signifikantně snížena pouze u 12denních mláďat při intenzitách stimulace 4 a 5 mA.

#### Následné výboje (EEG)

U dvanáctidenních zvířat byla pouze tendence ke zvýšení prahové intenzity. Obě dávky memantinu vedly ke zvýšení prahové intenzity následných výbojů typu hrot-vlna u osmnáctidenních zvířat. U nejstarší věkové skupiny se nevyskytly žádné změny v porovnání s kontrolami (obr. 13, graf 3).

Při vyšší intenzitě stimulace se v EEG objevil přechod následného výboje typu hrot-vlna (HV) do smíšeného typu záchvatu (MIX), který je charakterizovaný pomalými vlnami. Tato změna v EEG záznamu byla doprovázena rovněž změnou behaviorálních parametrů, klonické záškuby byly nahrazeny automatismy. Prahová hodnota intenzity stimulačního proudu pro přechod do limbického typu (MIX) následného výboje byla signifikantně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou pouze u 25denních zvířat (obr. 13, graf 3).

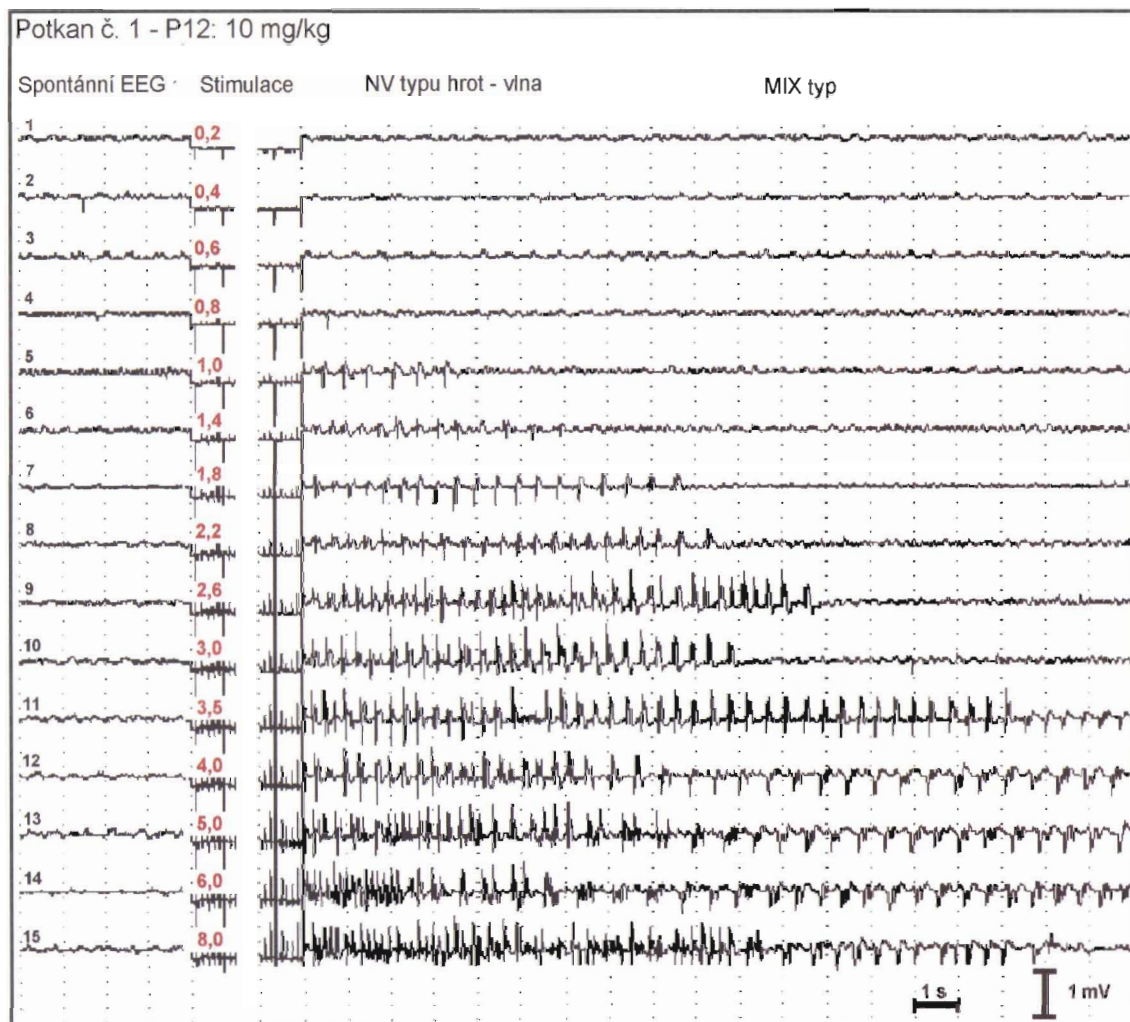
#### Délka následných výbojů

Podání memantinu v dávkách 10 a 20 mg/kg vedlo k zkrácení celkové délky následných výbojů se vzrůstající intenzitou stimulace u všech tří věkových skupin v porovnání s kontrolní skupinou (graf 4). U dvanáctidenních zvířat u dávky 10 mg/kg byly NV zkráceny při intenzitě 4; 5; 12 a 14 mA, u dávky 20 mg/kg u všech intenzit počínaje intenzitou 3 mA. U osmnáctidenních zvířat jsou u obou dávek NV signifikantně kratší v porovnání s kontrolami počínaje intenzitou 2,6 mA. U P25 při dávce 10 mg/kg byla délka NV signifikantně ovlivněna pouze u intenzity 4 mA, zatímco u dávky 20 mg/kg u intenzit stimulace 1,4 – 6 mA.

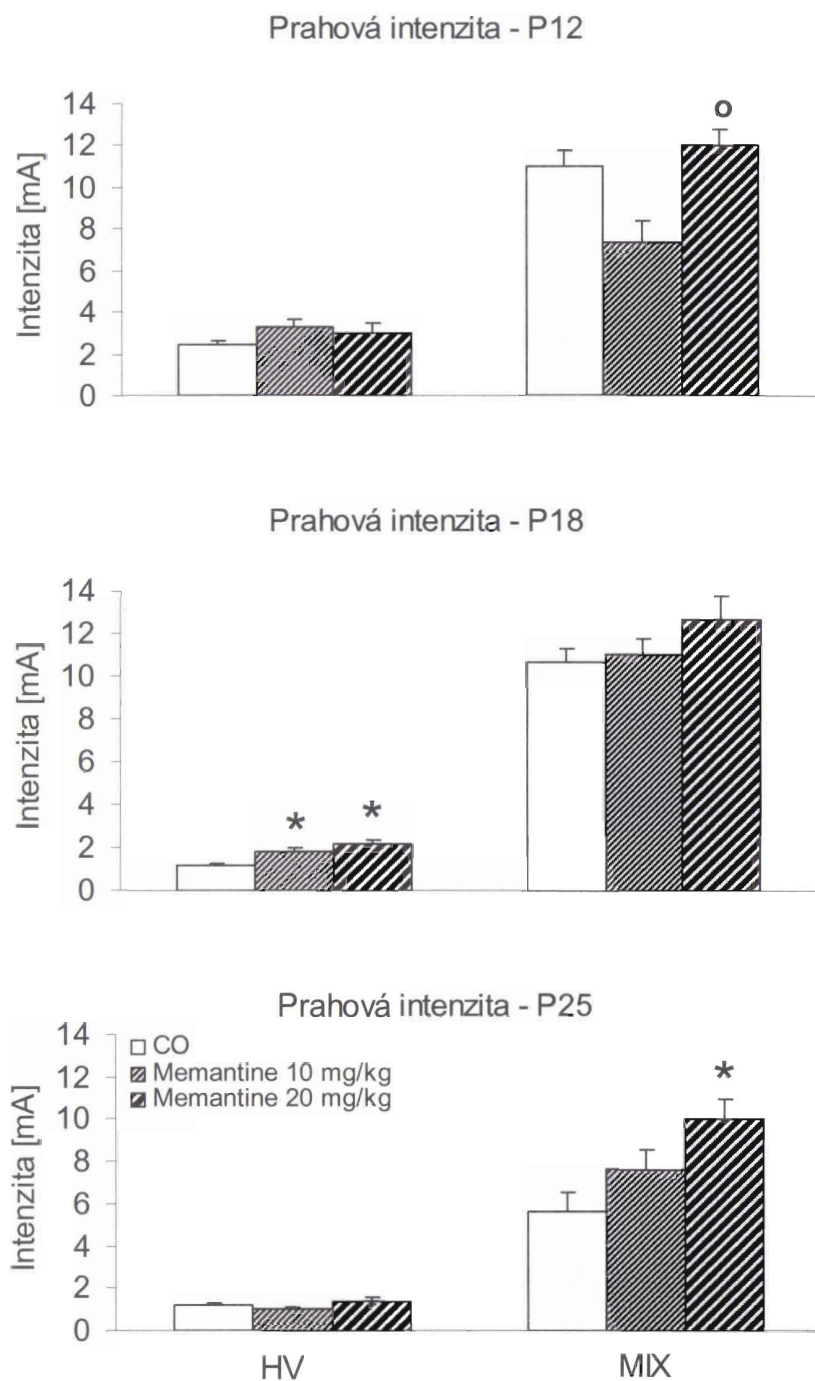
---

**Obr. 13:** Stanovování prahových intenzit pro vyvolání následných výbojů

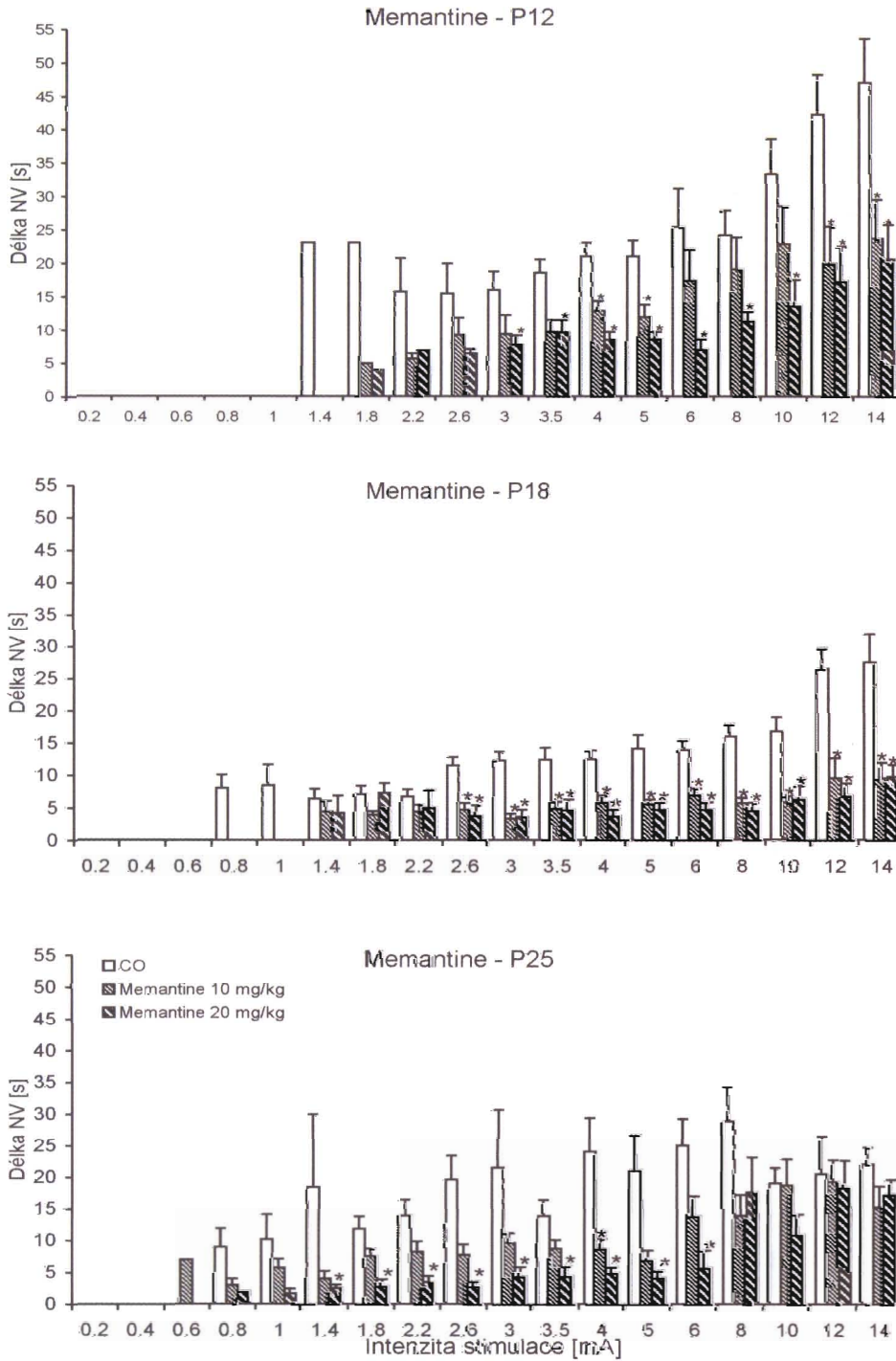
EEG záznam dvanáctidenního zvířete. Obrázek reprezentuje korové následné výboje ovlivněné zvyšující se intenzitou stimulace (0,2 až 8 mA) po podání 10 mg/kg memantinu. U vyšších intenzit je patrný přechod NV typu hrot-vlna (HV) v typ smíšený (MIX). Časová značka je 1s, amplitudová kalibrace 1 mV. Stimulace během experimentu trvala celkem 15 s, na uvedeném obrázku je vynecháno 13 s.



**Graf 3:** Ovlivnění prahové intenzity stimulace podáním memantinu (průměrná hodnota + S.E.M.). Prahová intenzita smíšeného záchvatu (MIX) byla signifikantně zvýšena u dávky 20 mg/kg memantinu u P25, dále u obou dávek memantinu u NV typu hrot-vlna (HV) u P18. Hvězdičky značí srovnání s kontrolou, kolečka srovnání s nižší dávkou memantinu.



**Obr. 4:** Efekt memantinu na trvání korových následných výbojů (průměrná hodnota + S.E.M.). U všech věkových skupin byla signifikantně zkrácena délka NV po podání memantinu (10 a 20 mg/kg) v porovnání s kontrolami (\*).



## 6.2. Experiment 2 – Evokované potenciály

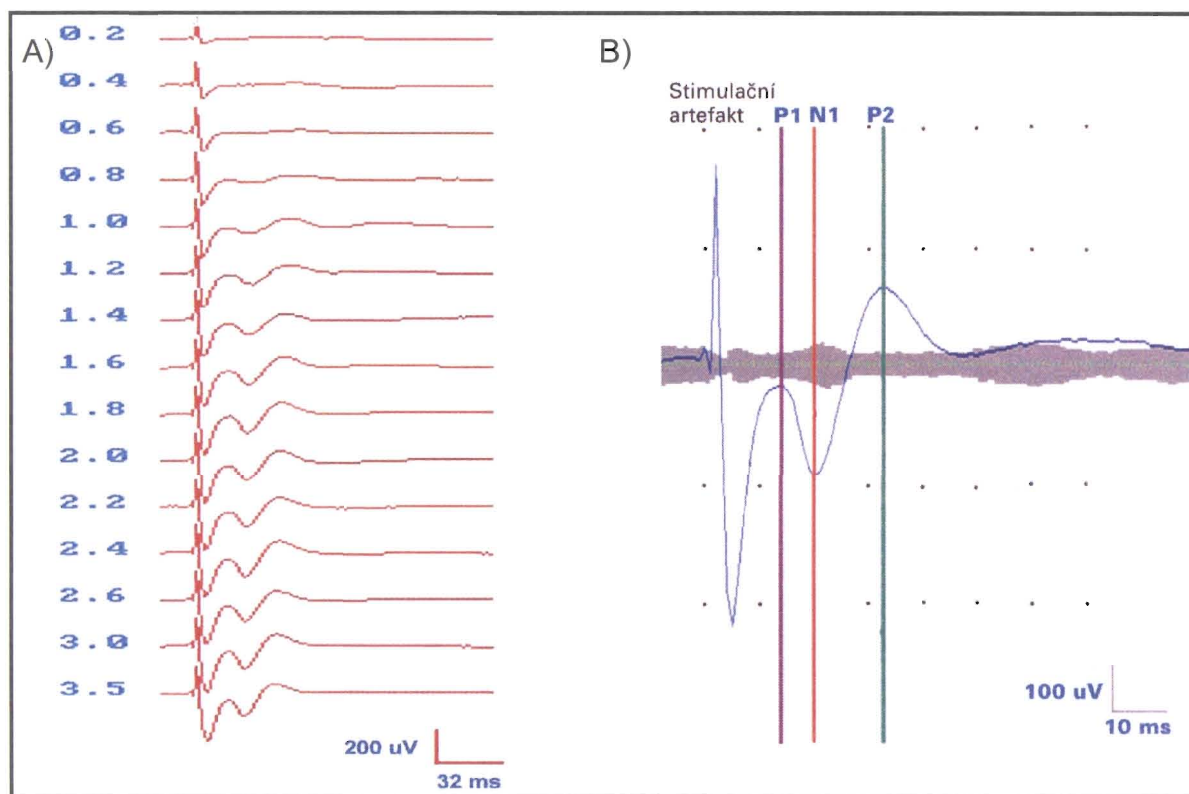
### 6.2.1. Vztah mezi intenzitou podnětu a amplitudou odpovědi - memantin

Korové interhemisferické odpovědi se skládají z první pozitivní a negativní vlny a následné druhé pozitivní a pozdní druhé negativní vlny. Amplituda korových interhemisferických odpovědí (obr. 14), měřená jako rozdíl mezi dvěma vrcholy první negativní a druhé pozitivní vlny (průměr $\pm$ S.E.M), nebyla ovlivněna podáním memantinu (10 a 20 mg/kg) u žádné ze tří věkových skupin mláďat potkana.

Pro zkonstruování závislosti byly amplitudy vztaženy k použité stimulační intenzitě. Statistické hodnocení bylo provedeno s absolutními hodnotami, relativní hodnoty byly použity v grafu pro zjednodušení (graf 5A).

#### Obr. 14: Evokované potenciály

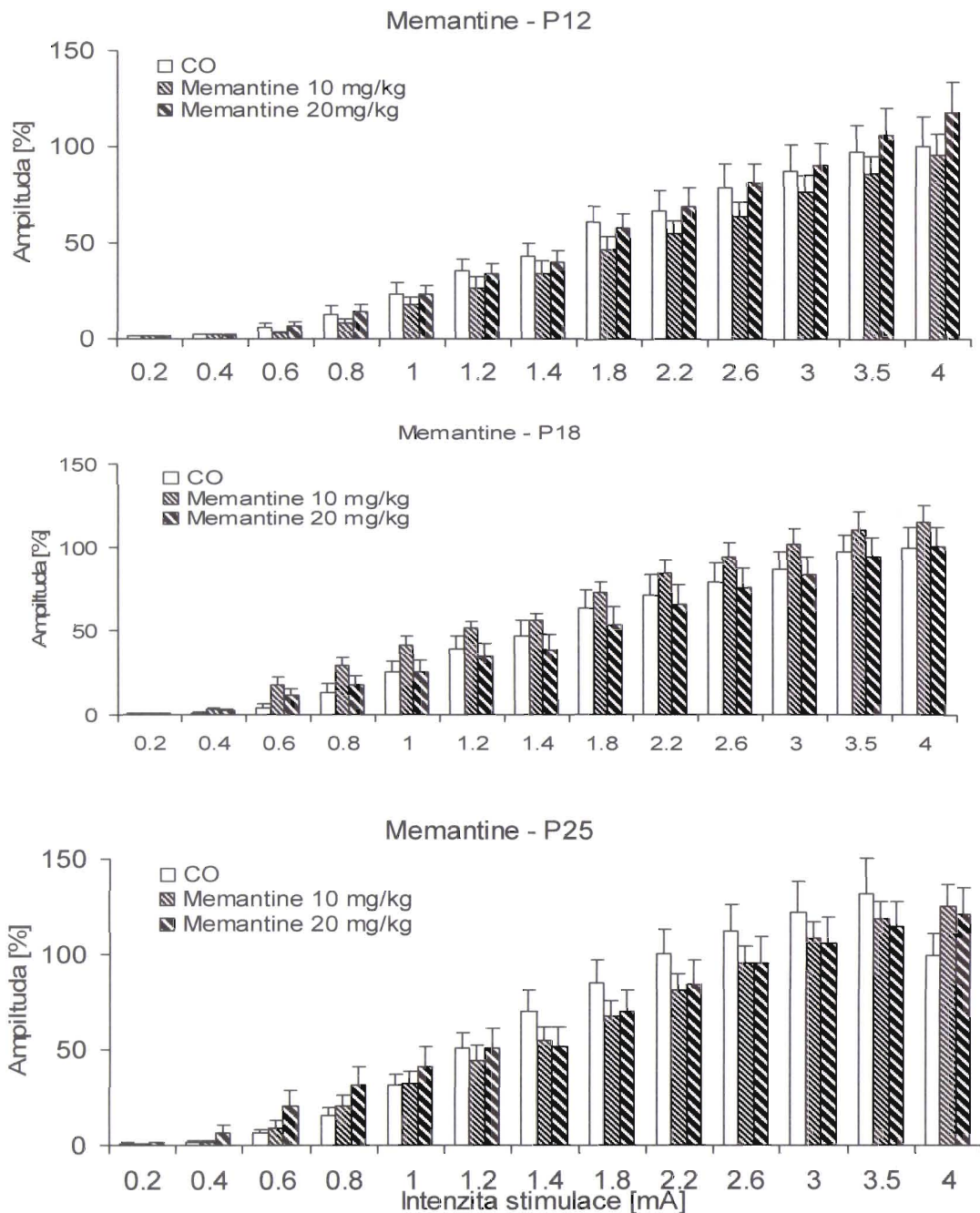
A - Ilustrativní ukázka záznamu EP dokladuje závislost odpovědi na zvyšující se intenzitě stimulace (0,2-3,5 mA), kalibrace amplitudy 200  $\mu$ V, časová značka 32 ms. B - Průměrný záznam EP z osmi odpovědí při intenzitě proudu 1,6 mA, kde P1 a P2 – 1. a 2. pozitivní vlna odpovědi, N1 – 1. negativní vlna odpovědi. P1 je často skrytá ve stimulačním artefaktu, proto jsme hodnotili amplitudu vln N1 - P2. Kalibrace amplitudy 100  $\mu$ V, časová značka 10 ms.





**Graf 5A: Evokované potenciály**

Vliv memantinu na korové interhemisferické odpovědi (průměr + S.E.M) u tří věkových skupin mláďat potkana. U žádné ze tří věkových skupin nebyla amplituda odpovědi ovlivněna podáním ligandu. Na ose x je vynesena intenzita jednotlivých opakovaných stimulací [mA], na ose y relativní hodnoty amplitudy (vyjádřené v procentech). Pro grafické znázornění je brána jako 100 % amplituda odpovědi při intenzitě 4 mA u kontrol, všechny ostatní hodnoty kontrol i obě skupiny s memantinem jsou vztaženy k této hodnotě.



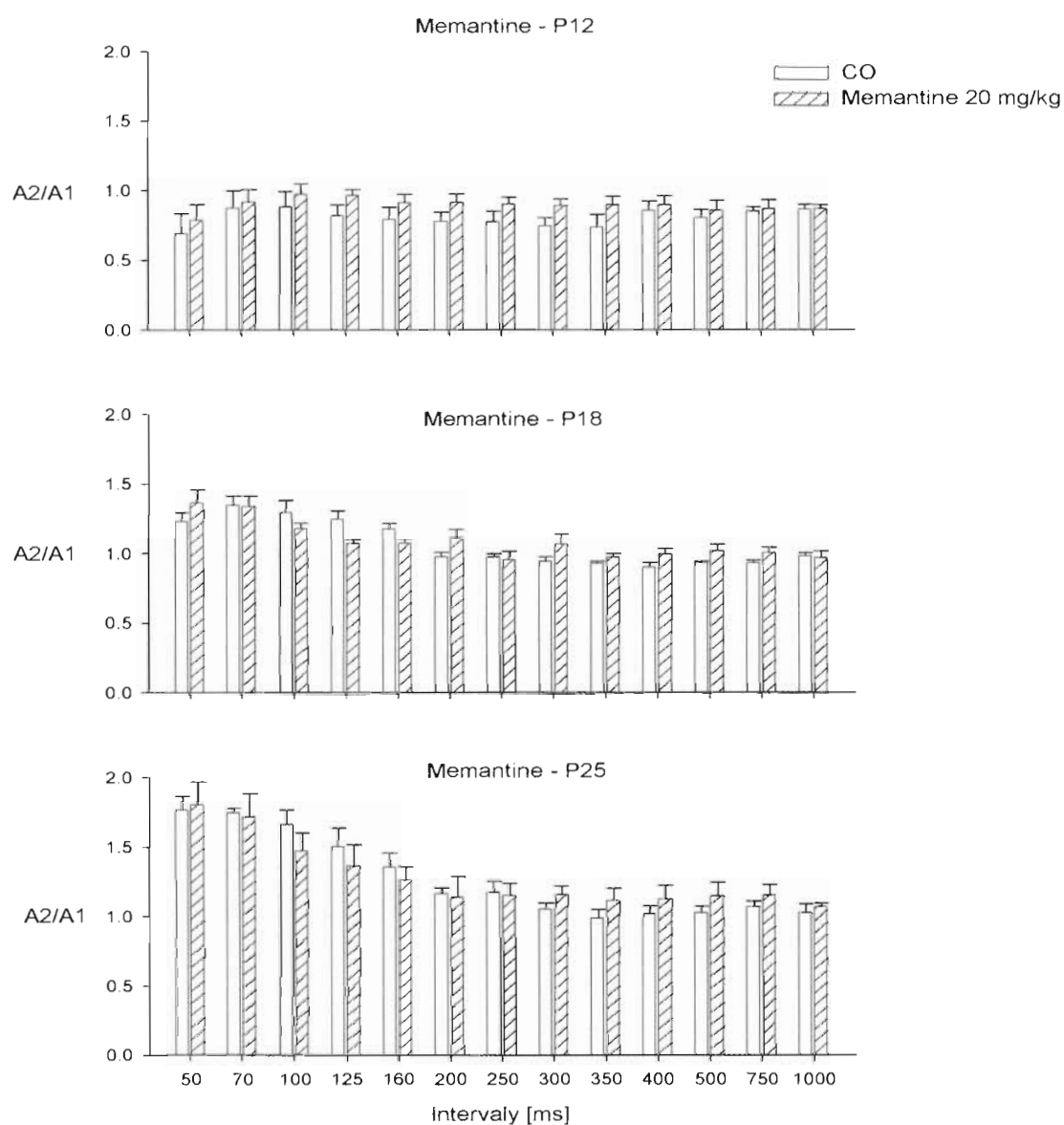
### 6.2.2. Párová potenciace korových odpovědí - memantin

Párová potenciace korových interhemisferických odpovědí se neobjevila u dvanáctidenních mláďat potkana u kontrolních zvířat. Amplituda druhé odpovědi nedosáhla velikosti odpovědi první, byla registrována deprese namísto potenciace druhé odpovědi. Nejvyšší amplituda byla u intervalu 100 a 125 ms, i když stále nedosahovala odpovědi první. Osmnáctidenní kontrolní zvířata měla obě odpovědi srovnatelné, s maximální amplitudou druhé odpovědi u intervalů do 125 ms. Nejvýraznější odpovědi jsou patrné u dvacetipětidenních zvířat, které jsou již podobné odpovědím dospělých zvířat. Maximální potenciace byla pozorována u intervalů do 100 ms (graf 5B).

Ani memantin ani fyziologický roztok neovlivnily interhemisferické odpovědi na párovou stimulaci, při vyhodnocení nebyly prokázány systematické rozdíly.

**Graf 5B: Párová potenciace**

Párová potenciace korových interhemisferických odpovědí (průměr + S.E.M) u tří věkových skupin mláďat potkana. U žádné ze tří věkových skupin nebyla amplituda druhé odpovědi systematicky ovlivněna podáním ligandu. Na ose x jsou vyneseny intervaly [ms] při jednotlivých opakovaných stimulacích, na ose y poměr amplitudy druhé (A2) a první (A1) odpovědi.



### 6.3. Experiment 3 – Model absencí

#### 6.3.1. Registrace EEG u pentetrazolového modelu absencí - MPEP

U kontrolních (fyziologický roztok) osmnácti- i dvacetipětidenních zvířat podání PTZ vyvolalo epizody typu hrot-vlna o frekvencí 4-5 Hz (obr. 15). Latence nástupu první epizody byla  $310 \pm 33$  s u 18denních a  $304 \pm 52$  s u 25denních mláďat.

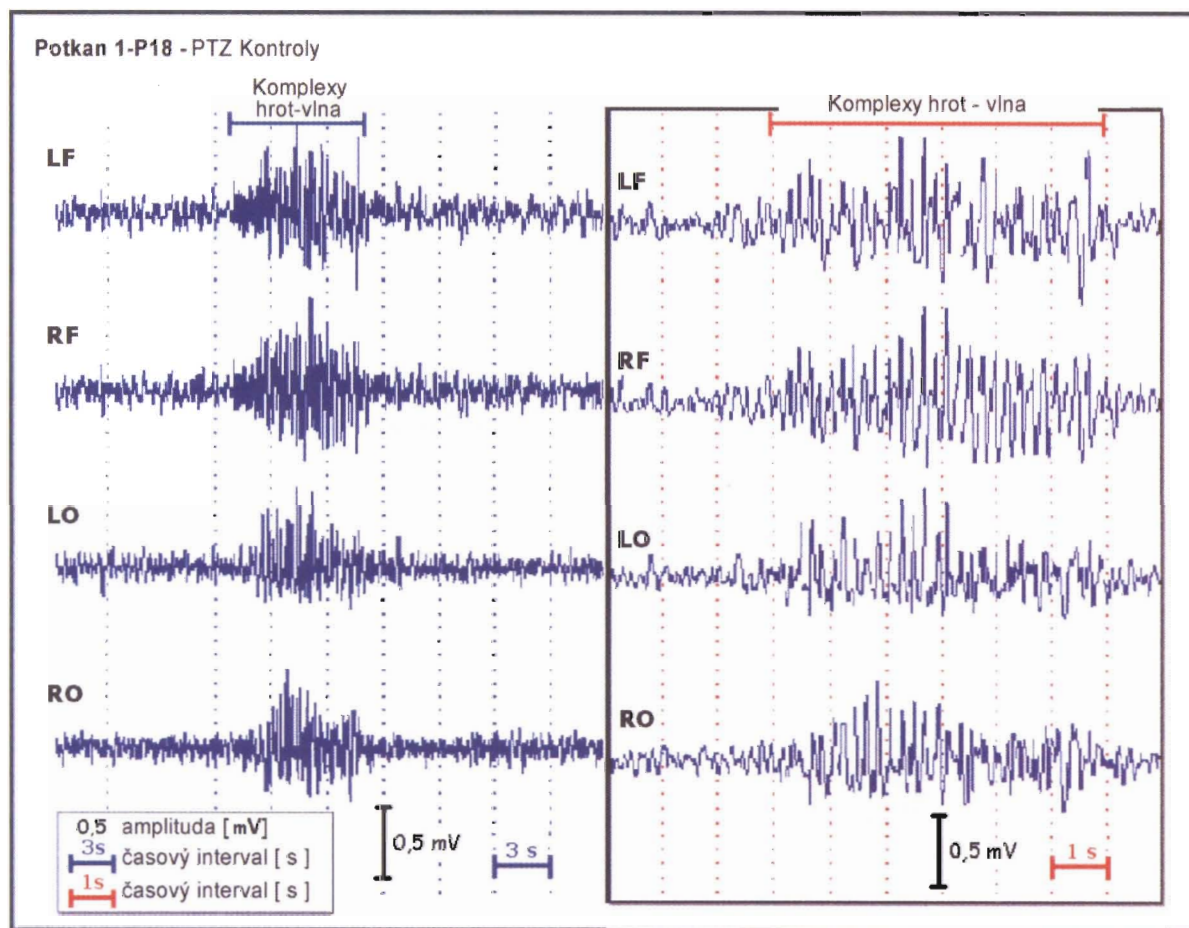
U obou věkových skupin zvířat se po podání MPEP objevily v EEG dlouhé epizody pomalých vlny s vysokou amplitudou (frekvence  $< 2$  Hz) (obr. 16), a to s latencí  $236 \pm 24$  s u P18 a  $195 \pm 26$  s u P25 (průměrná hodnota  $\pm$  S.E.M). Pomalé vlny vyvolané podáním MPEP byly patrné až do PTZ injekce, poté byly dočasně potlačeny, znovu se objevily 15-20 min po PTZ aplikaci. Pomalé vlny, které se opětovně vyskytly po podání PTZ u P25, se vracely v relativně krátkých epizodách. Zatímco u P18 se objevovaly v podobné formě jako před podáním PTZ. U P25 potkanů, kteří dostali dávku 80 mg/kg MPEP, byl relativně rychlý návrat epizod pomalých vln po PTZ injekci. Tato vyšší dávka nebyla podána P18.

U modelů absencí u 18denních potkanů při dávce 40 mg/kg MPEP ( $95 \pm 12,6$  s) bylo ve srovnání s kontrolami ( $310 \pm 33$  s) prokázáno jasné zkrácení latence první epizody komplexu hrot-vlna. Počet ani průměrná délka epizod, hodnocená ve dvou 5 min intervalech, nebyla signifikantně ovlivněna podáním MPEP (graf 7A-C).

U starší věkové skupiny (dvacetipětidenních) došlo rovněž k signifikantnímu zkrácení latence po dávce 40 mg/kg MPEP ( $88 \pm 10,9$  s) v porovnání s kontrolami ( $304 \pm 51,7$  s) a s dávkou 80 mg/kg ( $181 \pm 31,4$  s) MPEP. Počet epizod experimentálních skupin se signifikantně nelišil od skupiny kontrolní. Průměrná délka epizod byla signifikantně delší u skupiny s 80 mg/kg ( $99 \pm 9,9$  s) MPEP ve srovnání s nižší dávkou ( $47 \pm 11,2$  s), ale ne ve srovnání s kontrolami ( $68 \pm 13,9$  s) (graf 7A-C).

**Obr. 15:** Model absencí – záznam EEG

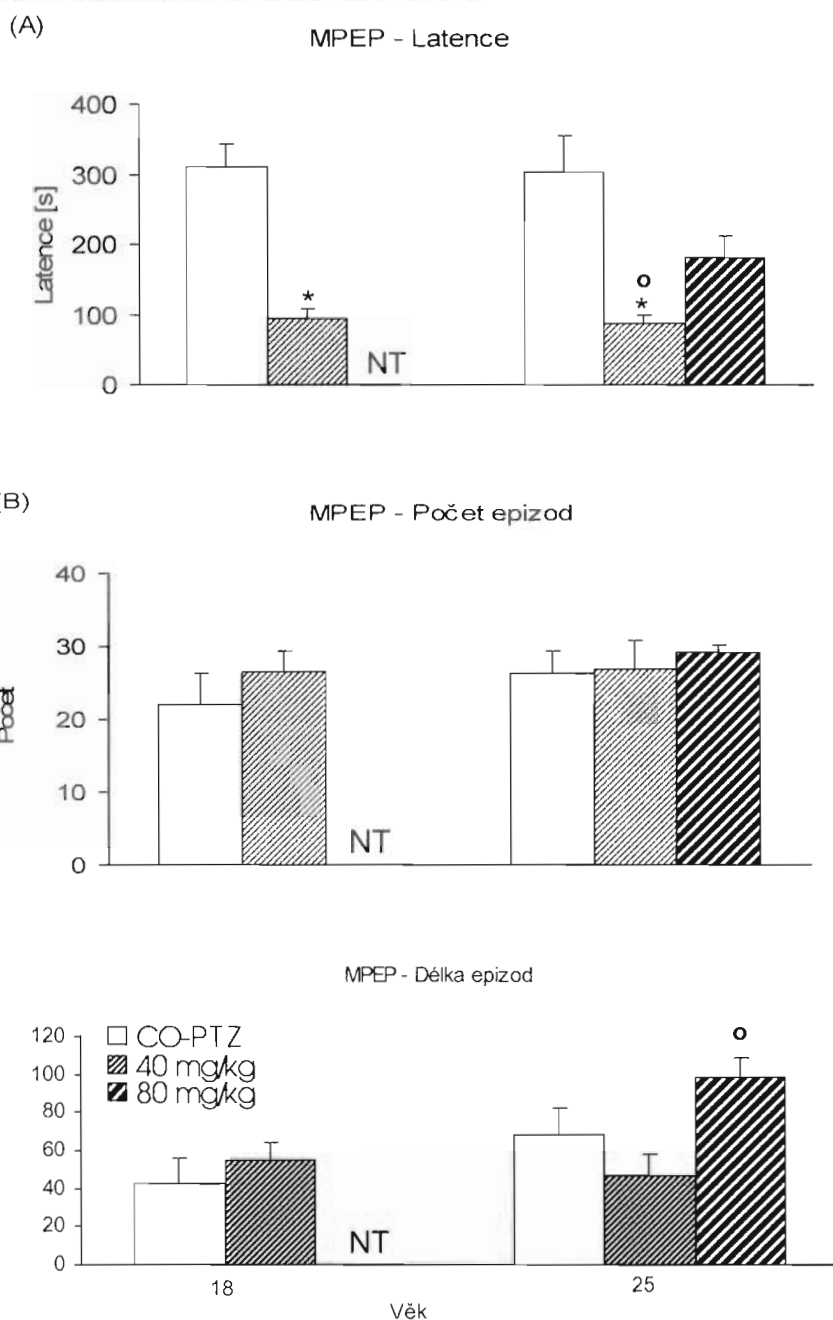
Korové epizody hrot-vlna u kontrolní skupiny P18 vyvolané nízkou dávkou pentetrazolu (35 mg/kg i.p.). Levá polovina obrázku – 30 s část záznamu, pravá polovina ukazuje tutéž epizodu při 3krát rychlejším časovém posunu. Záznam je pořízen z levé a pravé frontální (LF a RF), levé a pravé okcipitální (LO a RO) korové oblasti. Všechny jsou zapojeny proti referenční elektrodě. Časová značka je 3 s v levé části a 1 s v pravé části obrázku, amplitudová kalibrace je 500  $\mu\text{V}$ .



**Graf 6A-C: Model absenci**

Efekt MPEP na průměrné hodnoty (+S.E.M.) latence (6A), počtu (6B) a délky epizod typu hrot vlna (6C) vyvolaných nízkou dávkou PTZ.

**Graf 6A:** Latence první epizody komplexu hrot-vlna. Ve srovnání s kontrolami (\*) a dávkou 80 mg/kg ( ) se u dávky 40 mg/kg MPEP signifikantně zkrátila latence u obou věkových skupin. **Graf 6B:** Počet epizod u experimentálních skupin se signifikantně neliší od kontrol u obou věkových skupin po podání MPEP. **Graf 6C:** Průměrná délka epizod byla signifikantně ( ) delší u dávky 80 mg/kg ve srovnání s nižší dávkou MPEP, ale ne ve srovnání s kontrolami.



## 6.4. Experiment 4 – Monitoring EEG

### 6.4.1. Registrace EEG - 2 hod záznam - MPEP

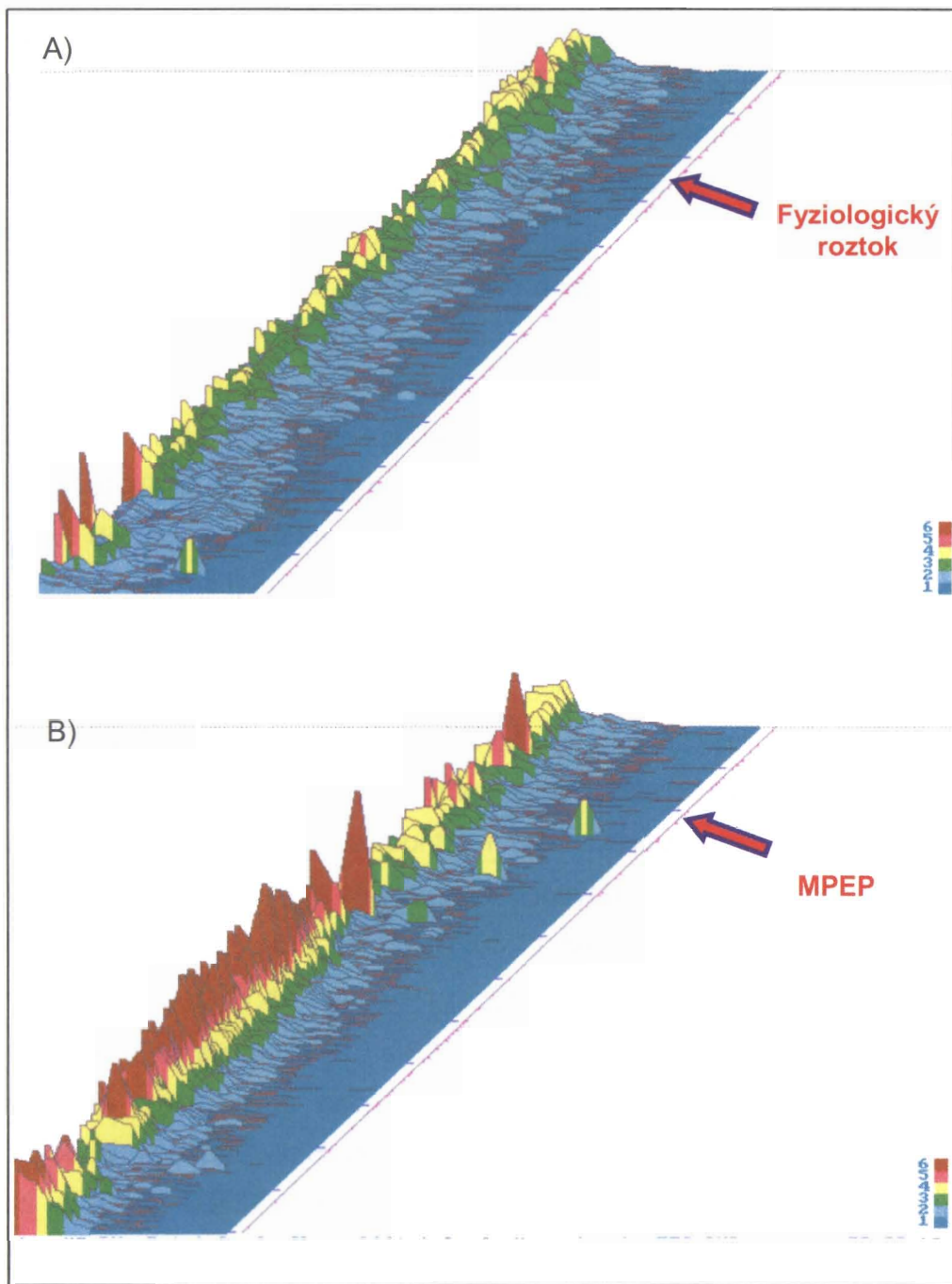
V návaznosti na data získaná v experimentu č. 3, jsme tento experiment doplnili ještě o jednu experimentální skupinu, která místo PTZ dostala pouze fyziologický roztok v kombinaci se 40 mg/kg MPEP, a tentokrát u všech tří věkových skupin. MPEP podstatně zvýšil počet delta vln u všech tří věkových skupin. Tento efekt trval minimálně 60 min a byl lépe vyjádřen u starších věkových skupin než u dvanáctidenních mláďat (obr. 16, 17).

U nejmladší věkové skupiny byla latence výskytu první epizody pomalých vln, vyvolaná podáním 40 mg/g MPEP, zaznamenána  $262 \pm 58,09$  s po aplikaci látky, u P18  $173 \pm 54,84$  s a u nejstarší věkové skupiny  $433 \pm 92,46$  s po podání. Celková délka počítaných epizod u P25 se lišila v porovnání ( $0:50:46 \pm 0:2:53$  hod) s nejmladší věkovou skupinou ( $0:30:52 \pm 0:8:37$  hod). Hodnoty pro osmnáctidenní zvířata jsou  $0:37:18 \pm 0:2:11$  hod. Dvanáctidenní zvířata měla kratší průměrnou délku jedné epizody ( $0:0:14 \pm 0:0:1$  hod) v porovnání s P18 ( $0:1:25 \pm 0:0:5$  hod) i P25 ( $0:1:59 \pm 0:0:3$  hod). Rovněž nejmladší věková skupina ukázala vyšší počet epizod ( $128,5 \pm 19,9$ ) než obě starší věkové skupiny ( $27,33 \pm 2,85$  u P18;  $26,5 \pm 2,2$  u P25).

Na základě těchto předběžných výsledků jsme provedli podrobnější testování během 24 hod monitoringu EEG (viz následující experiment).

**Obr. 16:** Efekt MPEP na spontánní EEG –ilustrativní obrázek

Frekvenční analýza dvouhodinového záznamu EEG ze somatosensorických oblastí kůry u dvacetipětidenních zvířat – u kontroly (část A) a u zvířete s dávkou 40 mg/kg MPEP (část B). EEG je analyzováno v 10ti sekundových sekcích se začátkem v pravém horním rohu pokračujícím doleva dolů. Frekvence od 0,5 do 15 Hz jsou uvedeny zleva doprava. Odlišné barvy ukazují amplitudu jednotlivých frekvencí. Po podání MPEP je patrné zvýšené zastoupení pomalých vln. Moment aplikace je označen šipkou.





#### 6.4.2. Registrace EEG - 24hodinový záznam - MPEP

Kontrolní zvířata vykazovala pravidelné úseky spánkové aktivity (nepravidelné delta vlny s vysokou amplitudou) přerušované periodami bdění, které byly charakterizované desynchronizací v EEG (obr. 17).

Spontánní elektrokortikogram byl ovlivněn podáním 40 mg/kg MPEP u všech tří věkových skupin. Po uplynutí doby latence výskytu první epizody, tj.  $260 \pm 41$  s u P12;  $319 \pm 43$  s u P18 a  $192 \pm 52$  s u P25 (průměrná hodnota  $\pm$  S.E.M.), se začaly objevovat úseky delta vln, které rychle přešly do téměř kontinuální aktivity (po dobu dalších 120 min) u dvacetipěti a osmnáctidenních potkanů (obr. 17). U dvanáctidenních potkanů se vyskytly většinou izolované delta vlny s vysokou amplitudou.

Z dvaceti čtyř hodinového záznamu vlivu podání MPEP na spontánní EEG jsme podrobně vyhodnotili 15 hod záznamu po aplikaci u P18 a P25 a všechny tři jednotlivé časové intervaly u P12. U dvacetipětidenních zvířat bylo jasné ukončení efektu po  $4:39:32 \pm 0:42$  hodinách a u osmnácti denních po  $6:39:06 \pm 0:49$  hod. Účinek ještě částečně přetrvával do  $9:53:32 \pm 1:11$  hodiny u P25 a do  $10:17:25 \pm 0:55$  hodiny u P18 po aplikaci. Jednoznačné ovlivnění spontánního EEG u dvanáctidenních zvířat bylo patrné během prvního i druhého hodnoceného intervalu (detailní popis intervalů viz. metodická část), tzn. 7 hod po aplikaci. Bohužel ne u všech zvířat byla zachována možnost monitorování EEG během druhého a třetího intervalu, matka mláďat poškodila při kmení elektrody. U třetího sledovaného intervalu, tzn. přibližně 21 hod po podání látky, nebyl již patrný vliv MPEP na spontánní EEG aktivitu.

Celková délka počítaných epizod, hodnocených v intervalu 2 hodiny po aplikaci MPEP, tvořila v průměru  $1:11:52 \pm 0:03:11$  hod u P25,  $1:07:47 \pm 0:04:06$  hod u P18 a  $0:32:19 \pm 0:11:41$  hod u P12. Signifikantní rozdíl v celkové délce epizod jsme našli mezi skupinou P12 a P25 (graf. 7A-C).

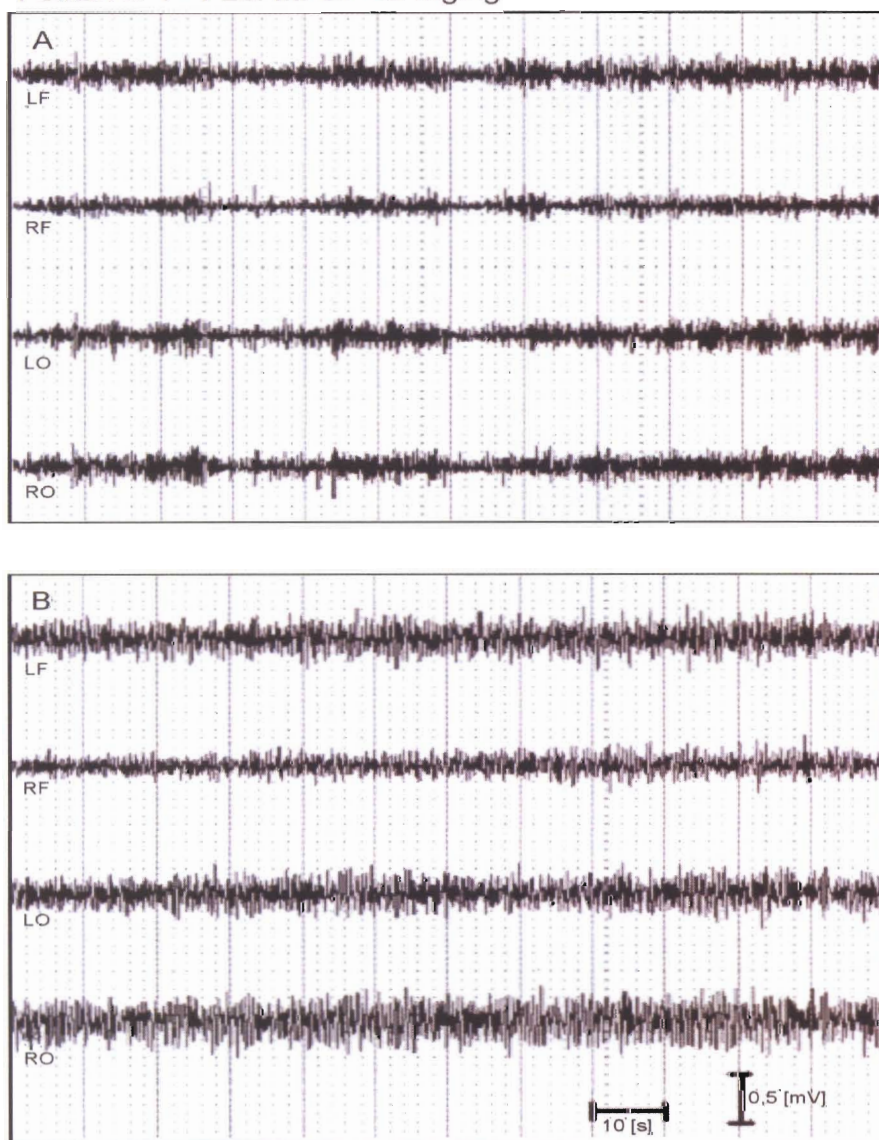
Průměrná délka jedné epizody v intervalu 2 hodiny po aplikaci MPEP se pohybovala v následujících hodnotách, a to u P12  $0:0:32 \pm 0:0:2$  hod;  $0:2:54 \pm 0:0:9$  hod u P18;  $0:2:37 \pm 0:0:4$  hod u P25. Dvanáctidenní zvířata vykazovala signifikantně kratší epizody v porovnání s oběma staršími skupinami (graf 7A-C).

Počet epizod, v intervalu 2 hodiny po aplikaci MPEP, dosahoval hodnot  $29,63 \pm 3,99$  u dvacetipětidenních potkanů;  $26,63 \pm 3,21$  u 18- a  $38,57 \pm 12,28$  u 12denních mláďat. V tomto parametru nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými věkovými skupinami (graf 7A-C).

**Obr. 17:** EEG záznam dvacetipětidenního mláděte

A – kontrolní záznam EEG před podáním MPEP; B – 6 min po aplikaci MPEP (40 mg/kg i.p.). Jednotlivé svody jsou označené jako LF – levý frontální, RF - pravý frontální, LO - levý okcipitální, RO - pravý okcipitální. Všechny jsou zapojeny proti referenční elektrodě. Časová značka je 10 s, amplitudová kalibrace je 0,5 mV.

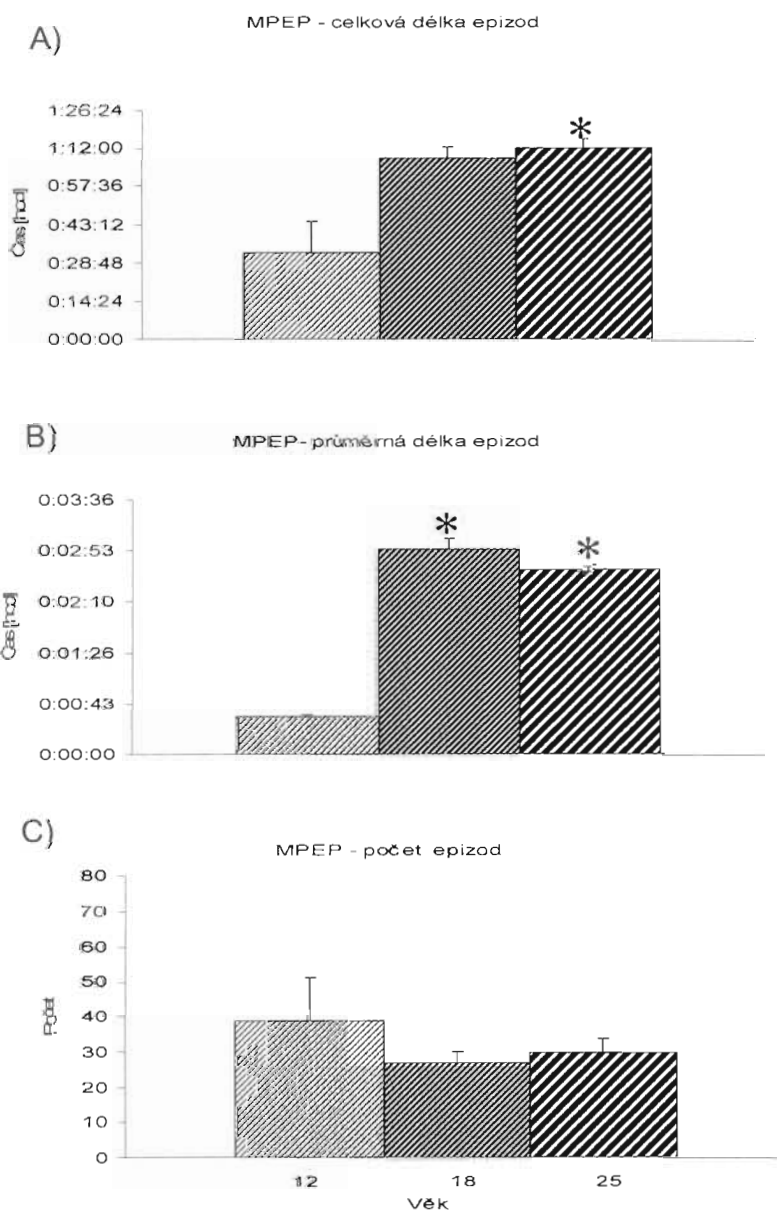
Potkan č. 1 - P25: MPEP 40 mg/kg



**Graf 7A-C: Charakteristiky epizod pomalých vln**

Vliv podání 40 mg/kg MPEP na průměrnou hodnotu (+S.E.M.) celkové délky (7A), průměrné délky (7B) a počtu epizod pomalých vln (7C).

**Graf 7A:** Celková délka epizod byla signifikantně delší u 25denních zvířat v porovnání s nejmladší věkovou skupinou (\*). U 18denních mláďat je pouze tendence k delším epizodám. **Graf 7B:** Průměrná délka epizod byla signifikantně (\*) delší u obou starších věkových skupin v porovnání s 12denními mláďaty. **Graf 7C:** Počet epizod u experimentálních skupin se signifikantně nelišil mezi jednotlivými věkovými skupinami.



## **6.5. Experiment 5 – Morfologická studie**

### **6.5.1. Vyhodnocení morfologických změn – MPEP, MK801**

#### **6.5.1.1. MPEP**

U kontrolních zvířat, Fluoro Jade B pozitivní buňky se ve sledovaných strukturách objevovaly pouze ojedinělé (obr. 18A). V souladu s dřívějšími studiemi (Ikonomidou et al., 1999) incidence Fluoro Jade B pozitivních buněk klesá s věkem.

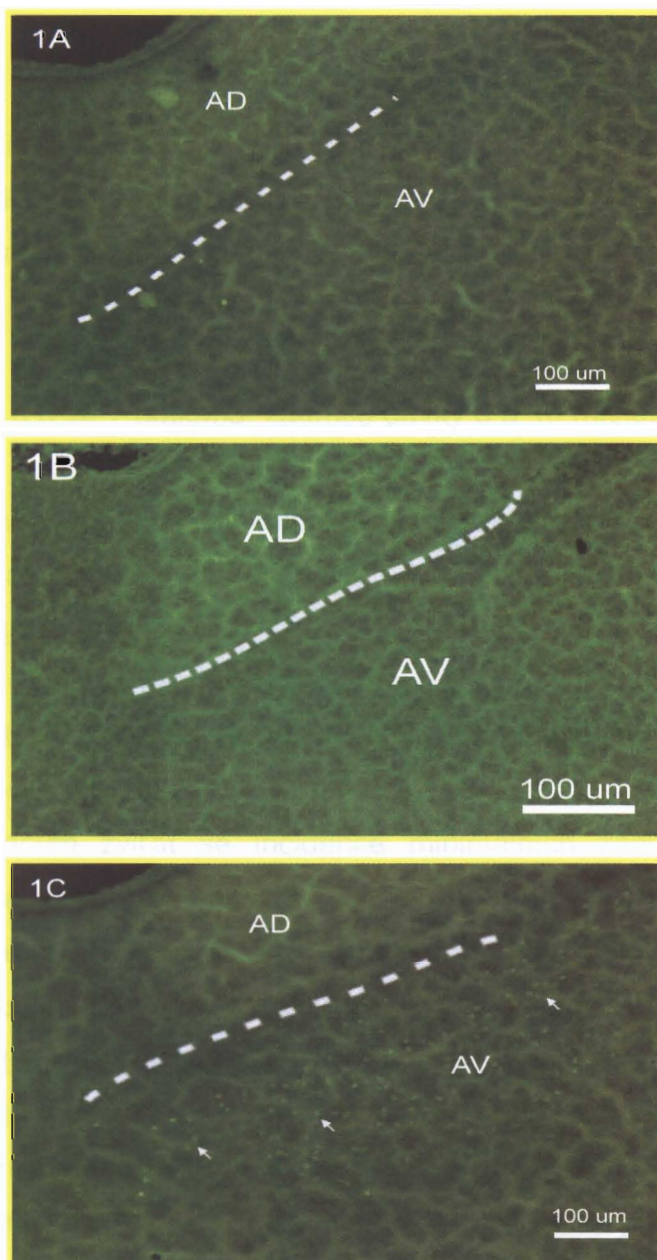
Při sledování morfologických změn dvacet čtyři, dvanáct i čtyřicet osm hodin po aplikaci MPEP bylo prostřednictvím barvení na Fluoro Jade B zjištěno, že MPEP ve sledovaných mozkových strukturách, jako je mozková kůra, talamus, hipokampální formace, nezpůsobuje degeneraci u ani jedné ze tří věkových skupin zvířat (obr. 18B).

Nisslovo barvení (kresylviolet), které jsme použili k identifikaci cytoarchitektonických rozhraní sledovaných struktur, neprokázalo rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou v jednotlivých sledovaných oblastech mozku ani u jedné věkové skupiny potkanů.

#### **6.5.1.2. MK 801**

Antagonista NMDA receptorů – MK 801, který sloužil jako pozitivní kontrola v paralelních pokusech, zvýšil degeneraci buněk u dvanáctidenních zvířat ve všech sledovaných strukturách (obr. 18C). Tento efekt byl věkově závislý - byl méně výrazný u starších věkových skupin. Morfologicky se FJB pozitivní buňky neliší od buněk pozorovaných u kontrolních zvířat.

**Obr. 18 A-C** – Fluorescenční mikrofotografie řezů barvených na FJB u P12. Se shora dolů jsou seřazeny mikrofotografie od kontrolního zvířete, zvířete s MPEP a MK801 (panel A, B a C). Stupnice u všech tří mikrofotografií je vyjádřena 100  $\mu$ m. Obrázky vybraných oblastí byly pořízeny s deseti násobným zvětšením. **Panel 1A a 1B:** U kontrolní skupiny (fyziologický roztok) a skupiny s MPEP (40 mg/kg) nebyly žádné patrné označené buňky FJB. **Panel C:** Obrázek ukazuje rozložení degenerujících buněk (bílé šipky) vyvolané jednorázovou aplikací MK801 (1 mg/kg i.p.) u P12. FJB pozitivní buňky jsou přítomny v anteroventrálním jádře talamu (AV), 24 hod po aplikaci. AD označuje anterodorsální jádro talamu.



## 6.6. Experiment 6 – Model generalizovaných záchvatů

### 6.6.1. Hodnocení motorických záchvatů vyvolaných pentyentetrazolem

Ligand mGluR2/3 - LY379268 ovlivnil chování potkanů ve všech věkových skupinách, a to v závislosti na použité dávce.

#### Myoklonické záškuby:

Dvanáctidenní mláďata vykazovala myoklonické záškuby celého těla po dávce 5 mg/kg a vyšší. Záškuby se objevily s latencí v rozmezí 10-20 min po aplikaci dávky 5 mg/kg a 10 mg/kg, a dále s latencí 7-10 min po nejvyšší dávce LY379268.

U 18denních zvířat vyvolaly dávky 2,5 a 5 mg/kg pouze izolované myoklonické záškuby nebo skoky, avšak obě vyšší dávky (10 a 20 mg/kg) vyvolaly četné skoky, s latencí stejnou jako u dvanáctidenních zvířat.

Dvacetipětidenní potkani předvedli prudké skákání, které začalo 10 min po aplikaci všech tří použitých dávek. Jediný rozdíl byl v incidenci - dávka 2,5 mg/kg vyvolala skákání u 3 ze 7 potkanů, zatímco dávky 5 a 10 mg/kg vedly ke skákání u všech zvířat. Tento typ behaviorálních fenoménů se někdy objevuje jako reakce na zvuk nebo dotekový stimulus. V našem experimentu byly pozorovány i záškuby nebo skákání bez zřejmé příčiny.

#### Minimální klonické záchvaty:

Pentyentetrazol vyvolává minimální záchvaty u kontrolních zvířat až od věku 18 dnů. Po podání LY379268 se tyto záchvaty u věkové skupiny osmnáctidenních zvířat objevily pouze výjimečně.

U dvacetipětidenních zvířat se incidence minimálních záchvatů u zvířat s LY379268 nelišila od kontrol. Latence záchvatů nebyla ovlivněna podáním látky. Průměrná latence ( $\pm$ S.E.M.) u kontrol byla  $254 \pm 53$  s; u dávky 2,5 mg/kg  $305 \pm 78$  s; u 5 mg/kg  $274 \pm 90$  s a  $255 \pm 36$  s u dávky 10 mg/kg.

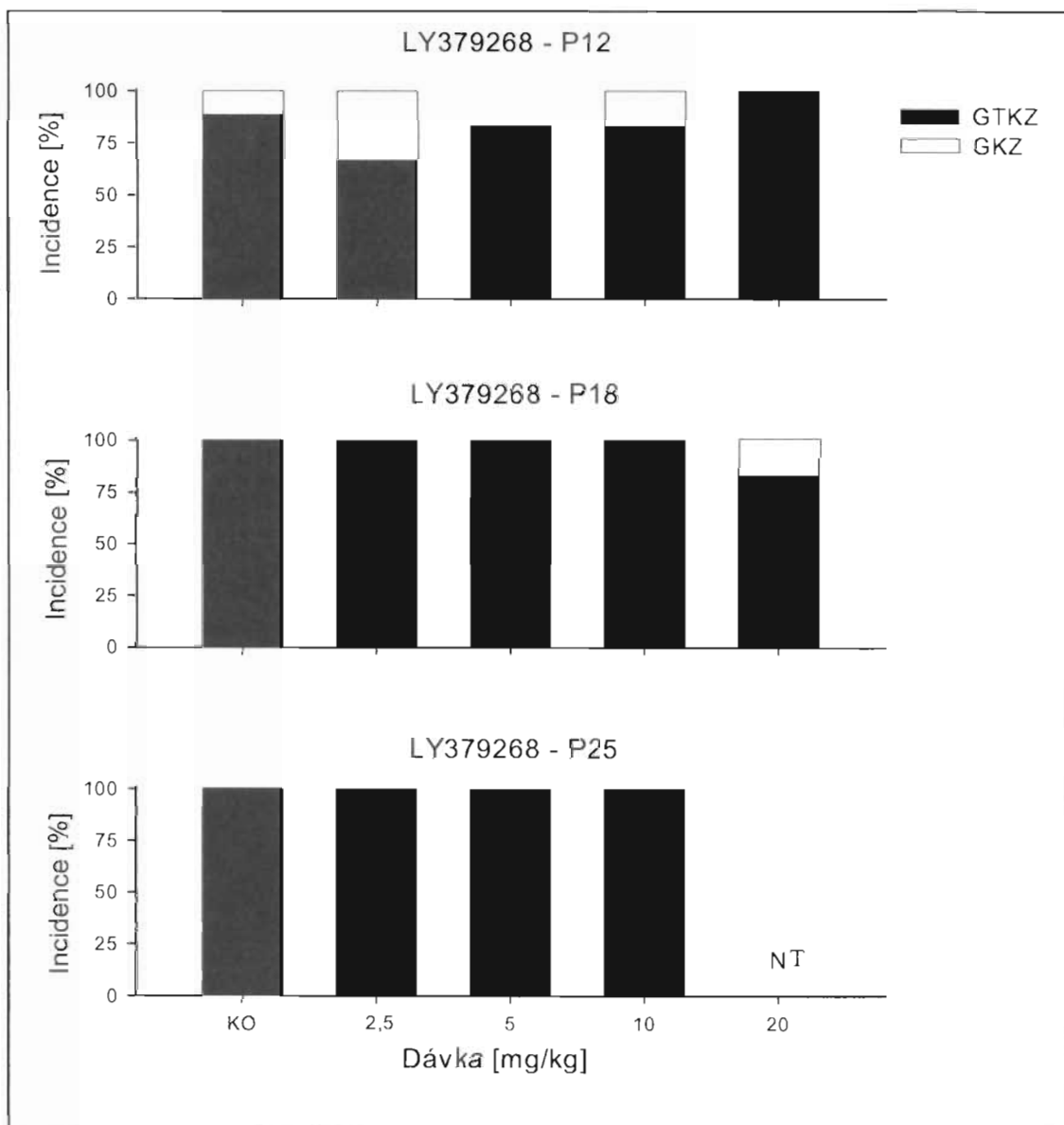
#### Generalizované tonicko-klonické záchvaty

Incidence a stupeň závažnosti generalizovaných tonicko-klonických záchvatů zůstaly nezměněny u sledovaných tří věkových skupin (graf 8;9).

U dvanáctidenních mláďat jsme zaznamenali signifikantní prodloužení latence generalizovaných tonicko-klonických záchvatů u všech dávek LY379268, změna

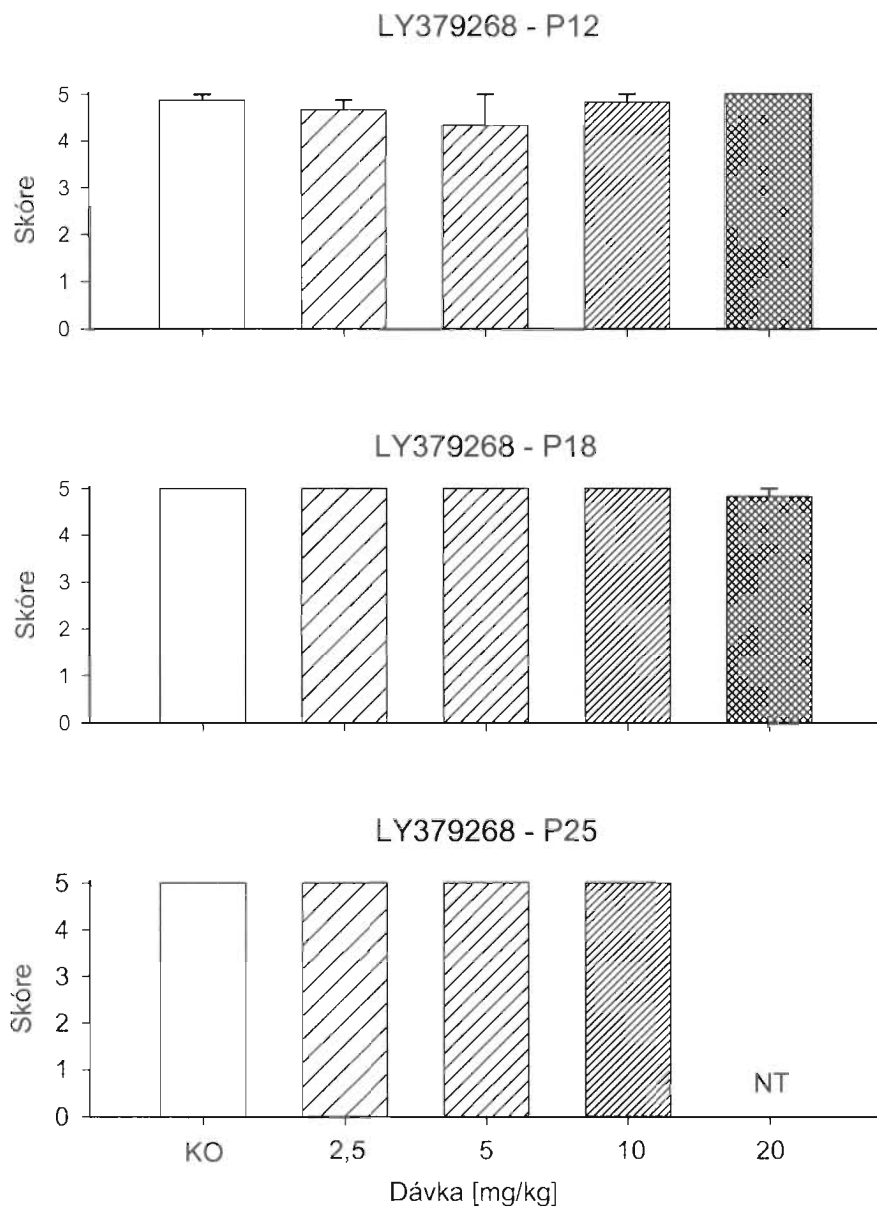
byla zvláště výrazná u dávky 10 mg/kg (graf 10). Osmnácti- a dvacetipětidenní zvířata nevykazovala signifikantní změny latence generalizovaných tonicko-klonických záchvatů. Naznačený rozdíl u 25denních mláďat nedosáhl úrovně statistické významnosti. Stupeň závažnosti záchvatů se nelišil od kontrolních zvířat (graf 9;10).

**Graf 8:** Incidence generalizovaných tonicko-klonických záchvatů u tří věkových skupin. Osa x značí jednotlivé dávkové skupiny (KO – průměrné hodnoty u kontrolních zvířat). Na ose y je vyneseno procento potkanů u kterých se objevil záchvat. Černé části sloupců ukazují kompletní generalizované tonicko-klonické záchvaty, bílé části generalizované klonické záchvaty (tonická fáze chybí).

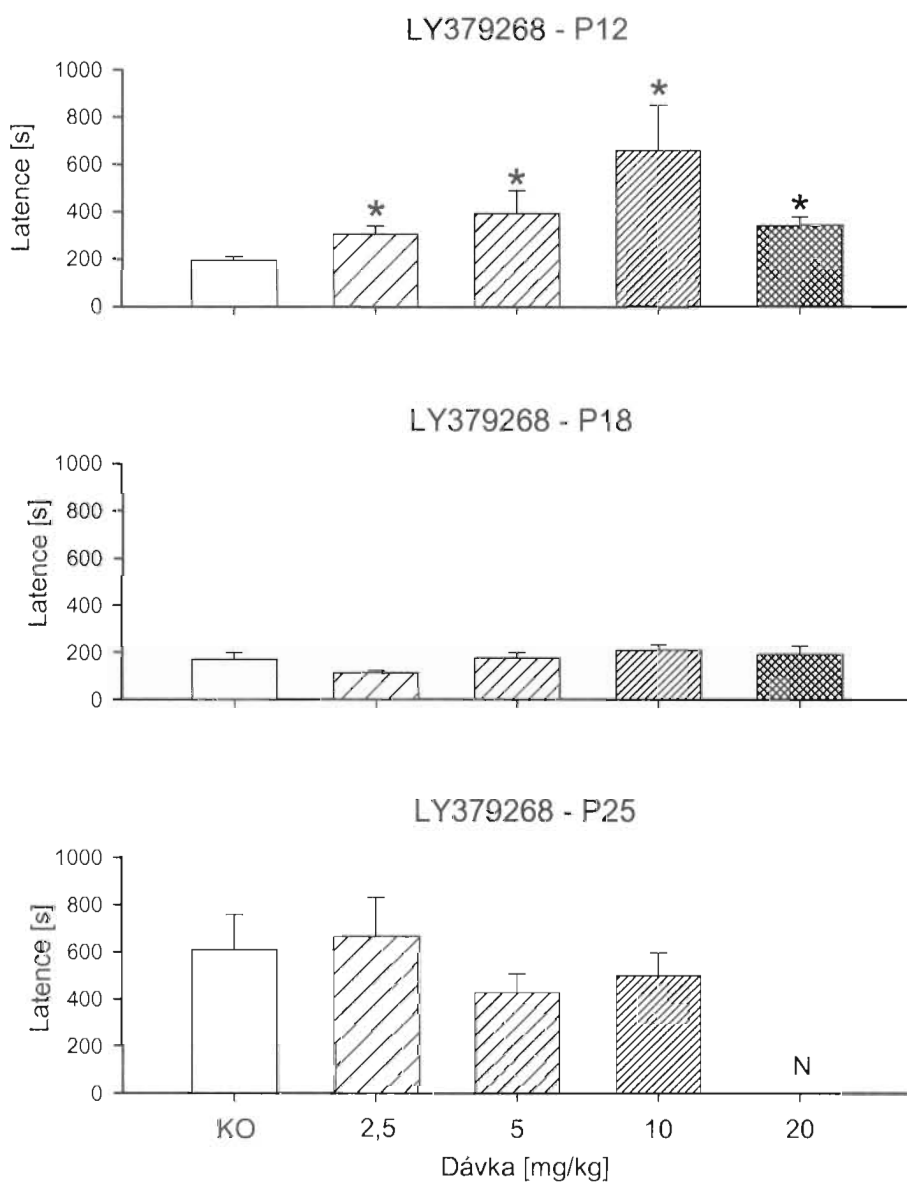




**Graf 9:** Stupeň závažnosti záchvatu (detaily viz graf 8), na ose y je vyjádření stupně závažnosti záchvatů v pětibodové stupnici dle Pohla a Mareše (1987).



**Graf 10:** Latence generalizovaných tonicko-klonických záchvatů (detaily viz graf 8, pouze na ose y je čas v sekundách). Hvězdičky označují signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolami.



## 7. Diskuse

Glutamátové metabotropní i ionotropní receptory, modulující glutamatergní transmissi v CNS, reprezentují důležitý farmakologický přístup při hledání nových antikonvulziv s odlišným mechanismem účinku než mají současně používaná antiepileptika (Schoepp et al., 1999; Doherty a Dingledine, 2002; Ballard et al., 2005). Efekt antikonvulzivních látek je důležité testovat u různých vývojových stádií, protože řada studií ukazuje, že účinnost antikonvulziv se během ontogeneze mění (přehled viz Kubová, 1999).

### 7.1. Antikonvulzivní účinek MPEP

MPEP vykazuje antikonvulzivní účinek u různých modelů epileptických záchvatů u dospělých zvířat nejen proti záchvatům vyvolaným agonisty typu I mGluR, ale i proti audiogenním křečím u DAB/2 myší (genetický model), rytmu hrot-vlna u lethargických (lh/lh) myší (genetický model absencí) (Chapman et al., 2000; Thuault et al., 2002; Moldrich et al., 2003), dále proti maximálním elektrošokovým křečím (potlačení tonické fáze) a klonickým záchvatům vyvolaným korneálním elektrošokem (6 Hz) u myší (Barton et al., 2003; Mareš et al., 2004; Zadrožniak et al., 2004). Naše data se shodují s nálezy Bartona (Barton et al., 2003) u modelů záchvatů vyvolaných elektrickou stimulací. Efektivní dávky jsou rovněž srovnatelné (Barton uvádí ED<sub>50</sub> odpovídající 17,4 mg/kg). Studie antikonvulzivního působení MPEP u záchvatů generovaných v limbickém systému byla provedena pouze na hipokampových řezech (Thuault et al., 2002; Sayin a Rutecki, 2003; Stoop et al., 2003). Rovněž byla prokázána účinnost MPEP proti konvulzivním záchvatům indukovaným pentetrazolem (40 mg/kg) u potkanů (Nagaraja et al., 2004). Tito autoři dále doložili nedostatečný antiepileptický účinek MPEP v modelu kindlingu (Nagaraja et al., 2004). V naší laboratoři jsme prokázali účinek MPEP proti tonické fázi generalizovaných tonicko-klonických záchvatů vyvolaných pentetrazolem u tří věkových skupin mláďat potkana a proti minimálním klonických záchvatům u osmnáctidenních

zvířat (Mareš et al., 2004; Mareš a Mikulecká, 2004).

Naše současná data rozšiřují studii o antikonvulzivní účinek MPEP u vyvíjejících se potkanů u dvou různých modelů, a to u korových následných výbojů (model myoklonických záchvatů) a epizod rytmu hrot-vlna indukovaných nízkými dávkami PTZ (model absencí). Tyto dva modely jsou v EEG charakterizovány výskytem aktivity typu hrot-vlna. Přes obecnou podobnost je zde rozdíl ve frekvenci rytmu hrot-vlna, tj. 2-3 Hz u korových následných výbojů a 4-5 Hz u epizod vyvolaných PTZ (Mareš, 1998). Další výrazný rozdíl je v motorických korelátech obou aktivit. Korové následné výboje jsou charakterizovány výraznými klonickými záškuby hlavy a předních končetin, zatímco epizody indukované PTZ mohou být provázeny jen minimálními záškuby vibris nebo uší. Oba modely se rovněž liší farmakologickou sensitivitou př. ethosuximid potlačuje epizody hrot-vlna vyvolané PTZ, ale postrádá efekt u korových následných výbojů (Mareš, 1998; Panayiotopoulos, 2000). Na druhou stranu nekompetitivní nespecifiční antagonisté NMDA receptorů (př. ketamin) jsou účinní vůči korovým následným výbojům, zatímco nepotlačují minimální klonické záchvaty vyvolané PTZ (Mareš et al., 1992; Velíšek et al., 1993).

Naše současná data o antagonistovi metabotropních glutamátových receptorů - MPEP rovněž vykazují odlišnou sensitivitu uvedených dvou modelů u mláďat potkana. Nedostatečný účinek u PTZ modelu absencí je v rozporu s výsledky experimentu u lethargických myší, kde MPEP potlačilo výskyt epizod rytmu hrot-vlna (Chapman et al., 2000). Což přináší dvě základní otázky, které by měly být v budoucnu analyzovány, tzn. jaký je rozdíl mezi oběma modely absencí a jaká je role excitačních aminokyselin v generování rytmu hrot-vlna. Dalším faktorem, který musí být brán v úvahu může být rozdíl mezi oběma druhy hlodavců a to nejen v dávkování farmak. Byly zjištěny zásadní rozdíly v časovém profilu obsazení mGluR5 receptorů, současně i jiné plazmatické hladiny vycházející z rozdílů v absorpci a metabolismu MPEP u obou druhů zvířat. Vazebná afinita se však u pokusů in vitro se nelišila (Anderson et al., 2003).

Antikonvulzivní efekt MPEP jsme očekávali u obou modelů, jelikož mGluR5 jsou přítomny jak v kůře, tak i talamu (Shigemoto et al., 1993; Romano et al., 1995;

Brodi a Ugolini, 1999; Schoepp, 2001; López-Bendito et al., 2002; Alexander a Godwin, 2006b). Navíc aplikace agonistů mGluR I do talamu indukuje limbické záchvaty u myši (Knöpfel A Gasparini, 1996; Hu et al., 2000), MPEP i jiné ligandy mGluR regulují aktivitu talamu i talamokortikálních spojení (Petersen, 2002; Govindaiah a Cox, 2006), avšak ovlivnění konkrétních jader může hrát roli v jeho efektu (Turner a Salt, 2000). Navíc pokud platí teorie, že MPEP ovlivňuje za určitých podmínek NMDA receptory, bylo dokázáno, že jejich blokáda redukuje epizody hrot-vlna (Alexander a Godwin, 2006b). Ligandy mGluR II i III a mGluR1 ovlivňují talamické oscilace a mohou být potencionálním terapeutickým cílem (Wang et al., 2005; Alexander a Godwin, 2006a,b). Neočekávaný neúspěch MPEP u pentetrazolového modelu absencí vyžaduje další analýzu.

Dávky použité v naší studii jsou relativně vysoké. Ukázalo se, že k obsazení více než 75% receptorů MPEP v mozku potkana stačí dávka 10 mg/kg (Anderson et al., 2003), tj. naše nejnižší dávka. Z tohoto důvodu je důležité zvážit, zda v tomto případě není antikonvulzivní efekt zprostředkován jiným nespecifickým mechanismem. U řady modelů poškození mozku byl popsán neuroprotektivní efekt MPEP (Bruno et al., 2000; Meldrum, 2000; Movsesyan et al., 2001; Risterucci et al., 2006). Poté ze série experimentů vyšlo najevo, že neuroprotektivní účinek MPEP může být zprostředkován ovlivněním NMDA receptorů (Brodi a Ugolini, 1999; Pisani et al., 2001; Gubellini et al., 2004; Baskys et al., 2005a,b). Výsledky z naší laboratoře (antikonvulzivní účinnost MPEP proti oběma typům motorických záchvatů vyvolaných PTZ) nepodporují toto vysvětlení (Mareš a Mikulecká, 2004). MPEP specificky potlačuje tonickou fázi generalizovaných tonicko-klonických záchvatů u dvanácti-, osmnácti- a dvacetipětidenních potkanů a blokuje minimální klonické záchvatu u 18denních mláďat. Antagonisté NMDA receptorů potlačují generalizované tonicko-klonické záchvaty jako celek a neovlivňují minimální záchvaty (Mareš et al., 2004). Stejně tak je rozdílné působení na motoriku – MPEP nepoškozoval motorické schopnosti mláďat potkana (Mareš a Mikulecká, 2004), zatímco podání kompetitivních i nekompetitivních antagonistů NMDA receptorů vyvolávalo výraznou ataxii (Mareš

---

a Mikulecká, 2002). Navíc modulace NMDA receptorů pomocí mGluR je závislá na typu testovaného modelu (Micheli, 2000; Lea et al., 2002; Blaabjerg et al., 2003; Francesconi et al., 2004), zda jsou aktivovány gliální či neuronální mGluR (Lea et al., 2002), na podjednotkovém složení NMDA receptorů a jejich rozložení v mozkových strukturách (Gubellini et al., 2004; Choe et al., 2006), na použité dávce mGluR ligandu apod. (Thomas et al., 2001). Rovněž tak NMDA receptory modulují funkci mGluR5 v řadě oblastí CNS (Alagarsamy et al., 2005).

Naše data ukazují na vývojové změny účinku MPEP. V souladu s dřívějšími výsledky z naší laboratoře, antikonvulzivní účinek MPEP je vyšší u dvanáctidenních než u dvacetipětidenních potkanů. mGluR receptory se v mozkové kůře vyskytují již osmnáctý den embryonálního vývoje. Jejich distribuce se však během vývoje mění, přítomnost ve všech korových vrstvách je prokázána mezi 21. až 30. postnatálním dnem (López-Benedito et al., 2002). V dalších pracích se uvádí overexprese mGluR5 v mozku potkana v druhém postnatálním týdnu s následným úbytkem zastoupení receptorů (Catanie et al., 1994; Romano et al., 1996; Blue et al., 1997). Talamická lokalizace mGluR5 a funkce mGluR v kortikotalamických synapsích byla detailně studována u mláďat myši (Golshani et al., 1998; Liu et al., 1998). Počet mGluR5 v talamu vrcholí sedmý postnatální den, a poté klesá až do dospělosti (Liu et al., 1998). Tento pokles během vývoje může být jedním z vysvětlení našich výsledků u korových následných vývojů (Mareš, 2004). Vývojové změny u mGluR5 mohou ovlivňovat generování rytmu hrot-vlna v EEG, na druhou stranu tento elektrografický fenomén je možné registrovat teprve až od třetího postnatálního týdne u mláďat potkana, tzn. během periody progresivního snížení počtu mGluR5 v kůře i talamu. Z tohoto důvodu lze připustit, že mGluR5 hrají roli jen v některých talamokortikálních oscilacích, tuto možnost budeme dále testovat.

Progresivní prodloužení délky následného vývoje 12denních kontrol v porovnání s ostatními skupinami, může souviset s nedostatečnou vyzrálostí inhibičních mechanismů, které zastavují záchvat, u nejmladší věkové skupiny.

Naopak zkrácení délky NV po podání MPEP v porovnání se staršími věkovými skupinami může mimo jiné souviset s různým stupněm vyzrálosti katabolických

mechanismů na různém stupni ontogeneze.

Nežádoucí účinky, které by mohly bránit klinickému využití MPEP, nejsou v současné době známy. MPEP neovlivňuje schopnost učení u různých testů provedených na dospělých potkanech (Petersen et al., 2002; Nagaraja et al., 2004; Ballard et al., 2005; Car et al., 2007), ani motorické projevy u mláďat potkana (Spooren et al., 2000; Mikulecká a Mareš, 2002). Na rozdíl od těchto výsledků, se u myši s chybějícím mGluR5 ukázalo, že projevují normální chování v "open field" testu, mají ale problém s úkolem zaměřeným na prostorové učení tj. Morrisovo vodní bludiště, které závisí na nepoškozeném hipokampu (Lu et al., 1997; Steckler et al., 2005). Role mGluR5 v procesu učení musí být dále studována. Zdá se, že efekt MPEP na prostorové učení je závislý na dávce, způsobu aplikace, době aplikace a typu testu (Anwyl, 1999; Zhu et al., 2004; Ballard et al., 2005; Nagaraja et al., 2005; Car et al., 2007).

Pro lepší definování farmakologických vztahů a možných nežádoucích účinků uvedeného ligandu mGluR5 - MPEP nás zajímal jeho vliv na spontánní EEG aktivitu a z morfologického hlediska případný negativní efekt na neurony (neuronální degeneraci).

Je známo, že podání antikonvulzivní dávky některých ligandů iGluR i mGluR ruší normální EEG rytmy, synchronizují EEG aktivitu, vyvolávají zvýšení amplitudy, tvorbu pomalých vln a zároveň ovlivňují i chování zvířat, např. MK801, (+)-HA966, AIDA atd. (Tortella a Hill, 1996; Petersen et al., 2002). V našem experimentu jsme zjistili, že spontánní elektrokortikogram byl ovlivněn podáním MPEP u všech tří věkových skupin. Po uplynutí doby latence výskytu první epizody se začaly objevovat úseky delta vln, které rychle přešly do téměř kontinuální aktivity u obou starších věkových skupin, kdežto u nejmladší skupiny zvířat se vyskytovaly většinou izolované kratší úseky delta vln s vysokou amplitudou. Tyto věkově závislé rozdíly mohou souviset s různým stupněm vývoje mozku, a tím s jinou EEG aktivitou odpovídající různým věkovým skupinám. Po třetím týdnu po narození je EEG mláďat potkanů podobné dospělým jedincům, u mladších věkových skupin než jsou dvanáctidenní, není EEG aktivita ještě kontinuální (Schickerová et al., 1984; Holmes, 1997). Rovněž bylo zjištěno, že intravenózní

podání MPEP dospělým potkanům způsobí zvýšený počet komponent pomalých vln v EEG (Binns a Salt, 2001). Změny ve spontánním EEG po aplikaci MPEP zaznamenané v našem experimentu vyžadují další studium.

Cílem morfologické části naší studie bylo odhalit případné neuronální poškození vyvolané účinkem selektivního antagonisty mGluR5 –MPEP u mláďat potkana, tak jako je tomu u nekompetitivního antagonisty NMDA receptorů - MK-801, který nám sloužil jako pozitivní kontrola. Tento antagonist ionotropních glutamátových receptorů má výrazný antikonvulzivní efekt, ale z klinického použití jej diskvalifikuje řada nežádoucích účinků mezi něž patří i indukce neurodegenerativních procesů u vyvíjejících se mozků (De Sarro a De Sarro, 1993; Ikonomidou et al., 1999). Tento problém se vyskytuje i u klinicky používaných antikonvulziv, jako jsou benzodiazepiny a barbituráty, t.j. farmaka ovlivňující GABA<sub>A</sub> receptory. Tyto látky vyvolávají neurodegeneraci ve vyvíjejícím se mozku (Ikonomidou et al., 2001). V našem experimentu jsme nenalezli neuronální poškození po podání MPEP. V literatuře je uváděno, že MPEP má neuroprotektivní efekt, který je pravděpodobně zprostředkovaný inhibicí NMDA receptorů (Movsesyan et al., 2001; Gubellini et al., 2004; Baskys et al., 2005a,b). Neurotoxický efekt MK801 vychází ze snížení aktivity inhibičních interneuronů, jejichž aktivace závisí na NMDA receptorech, vedoucí k disinhibici excitačních neuronů (Johnson a Kotermanski, 2006).

Nové informace o účinku MPEP mohou vést k vývoji nových strategií v léčbě onemocnění spojených se zvýšenou neuronální excitabilitou.

## 7.2. Antikonvulzivní účinek MTEP

V současné době je MTEP hojně testovaný na různých modelech neurodegenerativních onemocnění, ale neexistuje mnoho studií provedených na modelech epileptických záchvatů (Löscher et al., 2006). Zatím bylo zjištěno, že MTEP v dávkách 10-40 mg/kg není účinný u amygdalového kindlingu u potkanů, tj. u modelu epilepsie temporálního laloku, který je používán pro preklinické hodnocení nových antiepileptik. Jak tento model, tak humánní forma epilepsie temporálního laloku jsou často rezistentní k řadě antiepileptik. Zajímavé je, že po



amygdalovém kindlingu byla prokázána zvýšená exprese mGluR5, přesto je uvedený ligand neúčinný (Löscher et al., 2006). Dalším modelem parciálních nebo limbických záchvatů, kde bylo MTEP testováno, je akutní model - 6Hz-elektrošok u myší. MTEP prokázalo jen slabý antikonvulzivní efekt narozdíl od MPEP, což může opět upozorňovat na nespecifický efekt MPEP (tj. jeho modulační aktivita na mGluR4, NMDA atd.). Navíc NMDA antagonisti jsou účinní vůči 6Hz elektrošoku (Ritzen et al., 2005).

V našem experimentu jsme vycházeli z toho, že mGluR5 jsou četně zastoupeny v kůře, talamu, hipokampu i dalších strukturách (Anderson, et al., 2003; Klodzinska et al., 2004; Pietraszek et al., 2005) (podrobný popis lokalizace a vývojových změn mGluR5 v bodě 7.1.). Signifikantní zkrácení délky následných výbojů jsme zaznamenali až při použití nejvyšší dávky MTEP (40 mg/kg), a to především u obou mladších skupin zvířat. Nejslabší účinek MTEP u nejstarší věkové skupiny může opět souviset s vyzrálostí metabolických mechanismů. Z našich závěrů vyplývá, že při generování fenoménů hrot-vlna pravděpodobně mGluR5 nehrají příliš významnou roli.

Plné obsazení receptorů je dosaženo podáním dávky 10 mg/kg MTEP (Cosford et al., 2003; Busse et al., 2004). Efektivní dávky se zřetelně liší od dávek popsanych u různých modelů neurodegenerativních onemocnění, pohybují se mezi 1 a 30 mg/kg (Anderson, et al., 2003), v našem experimentu jsme se pohybovali v uvedeném rozmezí. U dávek vyšších než 50 mg/kg je riziko nespecifického účinku (Anderson et al., 2002).

Některé studie uvádějí, že MTEP má ještě silnější neuroprotektivní efekt než MPEP (Roppe et al., 2004; Szydłowska et al., 2007). MTEP je selektivnějším antagonistou mGluR5, kde výrazné ovlivnění NMDA receptorů, a s tím spojený antikonvulzivní nebo neuroprotektivní účinek, se nezdá být zcela relevantní. Záleží však na dávce a ovlivňované mozkové struktuře. Navíc se zde neobjevují vedlejší účinky typické pro antagonisty NMDA, př. není ovlivněno chování, lokomoční aktivita apod. (Busse et al., 2004; Pietraszek et al., 2005; Szydłowska et al., 2007). Tyto vedlejší nežádoucí účinky na motoriku, lokomoční aktivitu a proces učení se objevují až u dávek vyšších než 100 mg/kg, což jsou dávky značně

---

převyšující antikonvulzivní dávky (Zhu et al., 2004; Löscher et al., 2006). Navíc nepřímé ovlivnění NMDA receptorů je jen jedním z mechanismů účinku ligandů mGluR vedle modulace GABAergních, noradrenergických systémů apod. (Govindaiah a Cox, 2006; Szydłowska et al., 2007).

MTEP nepochybně má a bude mít své místo ve studiu vlastností mGluR5 a jejich vztahu k epileptickým záchvatům.

### 7.3. Antikonvulzivní účinek memantinu

Z řady studií vyplývá, že memantin je efektivní u generalizovaných záchvatů, naopak neúčinný u komplexních parciálních záchvatů (Kohl a Dannhardt, 2001). Memantin v dávce 5-10 mg/kg je účinný u metrazolového elektrošoku; dávka 7-12 mg/kg se osvědčila proti pentetrazolem vyvolaným tonickým záchvatům u myši, dále záchvatům indukovaným bikukulinem, pikrotoxinem, NMDA a AMPA u mláďat i dospělých potkanů a u myši. Efekt po podání AMPA může být spojený s jiným mechanismem účinku nesouvisejícím s modulací NMDA receptorů. Memantin neúčinkuje proti klonickým záchvatům vyvolaným shodnými agens, potlačil však spontánní absence u potkanů (5-10 mg/kg) (Bisaga et al., 1993; Parsons et al., 1999; Kohl a Dannhardt, 2001). Synergický efekt bez nežádoucích účinků při terapeutické dávce se projevil v kombinaci s antagonistou AMPA receptorů NBQX. Antikonvulzivní efekt u amygdalového kindlingu (5-10 mg/kg) memantin nemá, navíc dávky nad 20 mg/kg zhoršují záchvat (Löscher a Hönack, 1994).

Memantin je registrován a používá se klinicky u Alzheimerovy demence (Parsons et al., 1999; Jiráček a Souček, 2006).

Důležitým výsledkem z naší studie je průkaz antikonvulzivní účinnosti memantinu u modelu korových následných výbojů se vzrůstající intenzitou stimulace, kde byla ovlivněna délka NV i práh u všech věkových skupin. Obecně tento výsledek odpovídá antagonistům NMDA receptorů (MK801, CGP 40116), kteří prokazují efektivnost u korových následných výbojů i řady dalších modelů záchvatů (Mareš, 2002; Šlamberová a Mareš, 2005). Z klinicky používaných antiepileptik je u tohoto modelu úspěšný např. valproát, fenobarbital (Kubová et al., 1996;

---

Haugvicová et al., 2002), NMDA receptory ovlivňuje felbamát (Kohl a Dannhardt, 2001). Výraznější efekt u nižších věkových skupin souvisí s různým stupněm vývoje na molekulární úrovni glutamátových receptorů i zralostí katabolických mechanismů (Mareš et al., 2002). Během vývoje se mění složení, typ i funkce iGluR, např. snižuje se exprese NR2B a relativně se zvyšuje NR2A, v expresi NR1 podjednotek nejsou výrazné rozdíly v ontogenezi (Petralia, 2005).

Epileptické následné výboje typu hrot-vlna, vyvolané v našem experimentu, jsou korového a talamokortikálního původu. Druhý typ následného výboje, tzv. MIX (limbický), je způsoben šířením epileptické aktivity z talamokortikálních struktur do limbických struktur. Existuje řada propojení mezi talamem a limbickým systémem, cesty šíření této aktivity nejsou doposud přesně popsány (Dinner et al., 2002; Matsumoto et al., 2007). Účinnost memantinu vůči korovým následným výbojům v naší studii je v kontrastu s nedostatečným efektem k jinému modelu záchvatu (vyvolaného PTZ) se stejným motorickým vzorcem, jenž bude pravděpodobně spouštěný z jiné struktury (Mareš et al., 2002). Citlivost generátorů korových epileptických následných výbojů k antagonistům NMDA receptorů je pravděpodobná díky tomu, že se uvedené receptory hojně vyskytují v kůře a talamu (Mareš et al., 2002). V literatuře se uvádí, že NMDA receptory jsou lokalizovány postsynapticky a nejvíce jsou zastoupeny v mozkové kůře, hipokampu, mozečku. Podjednotkové zastoupení se v různých strukturách liší např. NR2A se vyskytují rovnoměrně, NR2B především v předním mozku, NR2C jsou hojné v mozečku. Memantin se váže se stejnou afinitou v kůře i mozečku (Bresnik et al., 1995; Dingledine et al., 1999).

Výraznější antikonvulzivní efekt vyšší dávky (20 mg/kg) memantinu potřebuje další vysvětlení. Může to být způsobeno modulačním vlivem na další systémy (Parsons et al., 1999). Je třeba brát v úvahu, že memantin podaný v dávce 10 mg/kg a vyšší, vyvolal nežádoucí účinky typické pro antagonisty NMDA receptorů, jako je hyperlokomoce, ataxie, stereotypní chování a poruchy motoriky u zvířat (Löscher a Hönack, 1994). U pacientů, po podání dávek vyšších než 20 mg/kg, přivodil psychotomimetický efekt (Parsons, 1999). Jeho velkou výhodou je absence vážných nežádoucích účinků při terapeutické dávce (Barnes et al.,

1996; Parsons et al., 1999; Jiráček a Souček, 2006; Johnson a Kotermanski, 2006). Vysvětlení pro slabé nežádoucí účinky v porovnání s antagonisty NMDA je, že pro memantin existují dvě vazebná místa na NMDA receptoru. První je totožné s místem pro MK801 a ketamin uvnitř iontového kanálu, druhé vazebné místo je na NR2C podjednotce NMDA receptoru. Navíc moduluje i dopaminergní, serotonergní, cholinergní a noradrenergický systém (Bresink et al., 1995; Parsons et al., 1999; Bolshakov et al., 2005; Johnson a Kotermanski, 2006). Další výhodnou vlastností memantinu je neuroprotektivní efekt projevující se při kombinační terapii s MPEP u NMDA řízené excitotoxicity (Zieminska a Lazarewicz, 2006). Má schopnost blokovat NMDA receptory a díky specifickému mechanismu účinku vykazuje na rozdíl od jiných NMDA antagonistů zlepšení kognitivních funkcí (Barnes et al., 1996; Johnson a Kotermanski, 2006). Na pokusech s potkany, při podávání 30 mg/kg memantinu denně po dobu 20 měsíců bylo zjištěno, že tato chronická léčba významně zvýšila počet vazebných míst pro MK801 i glycin u dospělých potkanů. Změny vlastností receptorového kanálu během stárnutí jsou tedy brzděny podáním memantinu (Bresnik et al., 1995).

Výsledky z interhemisferických odpovědí nejsou v souladu s výsledky, ke kterým jsme dospěli u korových následných výbojů. V tomto experimentu nebyl nalezen významný účinek memantinu u závislosti intenzity podnětu na rozsahu odpovědi. Odlišná aktivita memantinu u obou modelů byla překvapující. Kalosální vlákna odpovědná za generování prvních dvou vln interhemisferických odpovědí vycházejí ze III. a V. korové vrstvy (Akers a Killackey, 1978). Předpokládá se, že kalosální propojení obou hemisfér hraje určitou roli v generování korových epileptických záchvatů společně s talamokortikálním. Na druhé straně, jednotlivé interhemisferické odpovědi představují spíše fyziologickou aktivitu a proto nepřítomnost efektu memantinu bychom mohli považovat za pozitivní.

U kontrolních zvířat jsme pozorovali, že se tvar interhemisferických odpovědí během vývoje mění. Nejzřetelnější odpovědi jsou patrné u nejstarší věkové skupiny (P25), které se již podobají zvířatům dospělým (Mareš et al., 1975). Párová potenciace je také věkově závislá, druhá odpověď zde má různě velkou

amplitudu a je typická pro určité věkové stádium. Dvanáctidenní mláďata mají malou amplitudu druhé odpovědi (tj. deprese namísto potenciace druhé odpovědi), u P15 lze prvně měřit druhou odpověď o shodné amplitudě, u P18 jsou obě odpovědi celkem srovnatelné (Mareš et al., 1993a,b). Při testování ovlivnění odpovědí běžně používanými antiepileptiky bylo zjištěno, že ani fenytoin ani karbamazepin neovlivnily velikost odpovědi (Mareš et al., 1993b). I potenciaci párovými podněty můžeme považovat za fyziologický jev, a proto neúčinnost memantinu nelze brát jako nedostatek.

Glutamát hraje klíčovou roli v epileptogenezi. Zvýšená stimulace iGluR vede k záchvatovým projevům. NMDA receptory jsou jedním z hlavních cílů v neurofarmakologii, ligandy těchto receptorů jsou účinné, ale mají řadu nežádoucích účinků (Trist, 2000). Memantin dává naději na objevení dalších klinicky využitelných ligandů.

#### **7.4. Antikonvulzivní účinek LY379268**

Generalizované tonicko-klonické záchvaty jsou vyvolány u potkanů z mozkového kmene (Browning et al., 1999). GTKZ modelují stejný typ humánních záchvatů. Podáním přiměřené dávky pentetrazolu lze však vyvolat dva typy záchvatů, tj. minimální záchvaty (model myoklonických záchvatů) a GTKZ. Z klinicky používaných léčiv antikonvulzivní účinek u GTKZ vykazuje např. valproát, tiagabin, lamotrigin, potlačení tonické fáze u mláďat potkana je typické pro fenytoin, karbamazepin atd. (Thomsen a Dalby, 1998; Haugvicová et al., 2000).

Vzhledem k tomu, že mGluR II jsou lokalizovány zejména na presynaptických zakončeních v předním mozku, talamu, hipokampu atd. (Schoepp, 2001; Anderson et al., 2006a), mGluR<sub>3</sub> i na gliových buňkách (Lujan et al., 1997), předpokládali jsme efekt LY379268 u daného modelu záchvatu. LY379268 je silným specifickým agonistou, který se váže na mGluR 2/3. Bylo prokázáno, že nemá nespecifický účinek na NMDA, AMPA, kainátové receptory. Při vysokých koncentracích se však váže i na mGluR6 a 8 podtypy in vivo (Monn, 1999; Moldrich, 2001).

Antikonvulzivní aktivita LY379268 byla prokázána u generalizovaných i

parciálních modelů záchvatů: u genetických modelů, tj. u DBA/2 myši (myši citlivé na zvukový signál, který vyvolá generalizované motorické záchvaty) a lethargických myši (lh/lh) (model absencí s komplexy hrot-vlna), u amygdalového kindlingu (model komplexního parciálního záchvatu a jeho progresu) u potkanů, u limbických záchvatů u myši a u 6Hz-elektrošoku u potkanů. To kromě antikonvulzivní účinnosti prokazuje i dobrý přestup přes hematoencefalickou bariéru po systémovém podání. V neposlední řadě LY379268 působí i proti záchvatům vyvolaným agonistou mGluR I a neselektivním antagonistou II/III u myši (Monn, 1999; Pin, et al., 1999; Moldrich et al., 2001; Barton et al., 2003, Doherty a Dingledine, 2002).

Naopak agonista LY379268 nebyl účinný u motorických záchvatů u GEP potkanů (genetically prone-rats) a navíc vykazoval prokonvulzivní efekt. Rozdíl mezi efektem u DBA/2 myši a GEPR potkanů je překvapující, je možné jej pravděpodobně vysvětlit změnou exprese a funkce mGluR 2/3 během vývoje (jiný stupeň vývoje obou modelů) a mezidruhovou variabilitou (Moldrich, 2001).

Mechanismus účinku agonisty mGluR 2/3 spočívá v inhibici uvolňování glutamátu z presynaptických zakončení. Je třeba uvážit možnou dualistickou roli ligandu modulací mGluR 1/5, a tím uvolnění glutamátu, což by vysvětlovalo prokonvulzivní aktivitu vysokých dávek (Moldrich, 2001). Dále prokonvulzivní efekt může být vysvětlen snížením GABAergní transmise, která vede k převaze excitačních dějů v hipokampu po podání LY379268, a tím nedostatečnému antikonvulzivnímu účinku u některých modelů limbických záchvatů u potkanů (Schoepp, 2001; Smolders et al., 2004). Zajímavé je, že u DBA/2 modelu potlačil LY379268 záchvaty vyvolané zvukovým signálem, pokud byl aplikován pouze ligand bez zvukového signálu, vyvolal prokonvulzivní aktivitu (po i.c.v. nikoliv po i.p. podání), jako je divoký běh (Moldrich, 2001). Stejný fenomén byl pozorován u nestimulovaných zvířat u amygdalového kindlingu po i.p. aplikaci dávky 30 mg/kg (Moldrich, 2001).

Z nežádoucích účinků se uvádí především ovlivnění motorických funkcí a sedace při dávce 30 mg/kg i výše zmíněný prokonvulzivní efekt u některých modelů (Moldrich et al., 2001). Prokonvulzivní aktivita byla charakterizována kýváním

---

hlavy, spontánními skoky následujícími 15-50 min po aplikaci (Moldrich et al., 2001).

V našem experimentu jsme dospěli k podobnému závěru, kdy u mláďat potkana bylo negativně ovlivněno chování u všech tří věkových skupin, zatímco záchvaty nebyly potlačeny. Nežádoucí motorické účinky byly výraznější u starších mláďat. Rozdíl mezi věkovými skupinami je dán pravděpodobně rozdílem ve vývoji motorických schopností u jednotlivých vývojových stádií potkana v postnatálním období.

Ligandy mGluR modulují záchvaty vyvolané PTZ (160 mg/kg) u myši buď antagonistickou reakcí mGluR I ligandů nebo aktivací skupiny III mGluR. Selektivní agonisté mGluR II/2 měly prokonvulzivní účinek a neblokují tonické záchvaty vyvolané PTZ, neovlivňují však latenci záchvatů (Thomsen a Dalby, 1998). PTZ indukované záchvaty se objevily s latencí 5 min, trvaly 30 min (Thomsen a Dalby, 1998). V našem experimentu byla ovlivněna latence nástupu GTKZ pouze u nejmladší věkové skupiny a byla patrná tendence k potlačení tonické fáze záchvatu. Tento náznak antikonvulzivního účinku LY379268 u nejmladší věkové skupiny může souviset s změny glutamatergní transmise během vývoje (Mareš et al., 1993a,b),

Na druhou stranu LY379268 prokázal dlouhotrvající silný neuroprotektivní efekt po i.p. podání 10 mg/kg u některých modelů mozkového poškození. Neuroprotektivita může být dána prevencí uvolňování glutamátu z presynaptických zakončení ovlivněním mGluR2 a aktivací mGluR3 na astrocytech, které produkují faktory chránící buňku (Bond et al., 1999; Bruno et al., 2001, Kingston et al., 1999). Farmakokinetické studie prokázaly 24 hod po podání 10 mg/kg přetrvávání dostatečné koncentrace LY379268 pro aktivaci receptorů v mozku (Bond et al., 2000).

Řada studií ukazuje na antikonvulzivní a neuroprotektivní účinek LY379268 u některých zvířecích modelů, a tím na jeho význam pro další studium mechanismů spojených s mGluR aktivitou.

## 8. Shrnutí

V naší práci jsme si stanovili za cíl ověřit antikonvulzivní účinek vybraných ligandů metabotropních i ionotropních glutamátových receptorů u různých modelů epileptických záchvatů u tří věkových skupin mláďat potkana. Dále nás zajímal vliv jednoho z ligandů metabotropních glutamátových receptorů, použitých v naší studii, na spontánní EEG aktivitu a v neposlední řadě jeho případný neurodegenerativní účinek.

Vzhledem k tomu, že glutamát hraje významnou roli v epileptogenezi, je v posledních letech snahou hledat vhodné ligandy ovlivňující glutamátové receptory, jakožto potencionální antikonvulziva.

### MPEP

Nekompetitivní specifický antagonist metabotropních glutamátových receptorů typu I - MPEP prokázal po systémovém podání antikonvulzivní účinek proti korovým následným výbojům u všech sledovaných věkových skupin. Jeho efekt se více projevil u 12- a 18- než u 25denních potkanů. Naše data ukazují na změny v senzitivitě sensorimotorické kůry nebo talamokortikálního systému během ontogeneze.

Žádný z parametrů, které byly sledovány u pentetrazolového modelu absencí, nebyl po aplikaci MPEP ani u jedné věkové skupiny ovlivněn. MPEP nemá antikonvulzivní efekt proti tomuto typu modelu, naopak se zde projevil mírný prokonvulzivní účinek.

Odlíšná antikonvulzivní účinnost antagonisty mGlu receptorů typu I MPEP u obou sledovaných modelů epileptických záchvatů vypovídá o rozdílném mechanismu, jakým jsou záchvaty generovány.

Změny vyvolané podáním MPEP ve spontánním EEG, tj. nárůst pomalých vln, byly pozorovány u všech tří věkových skupin.

Podání MPEP nevyvolalo degeneraci buněk ve vybraných strukturách, tzn. kůře, talamu a hipokampální formaci u mláďat potkana. Absence tohoto závažného nežádoucího účinku zvyšuje potenciální klinické využití MPEP nebo jiného



mGluR5 antagonisty. Naproti tomu **MK801** zvýšil degeneraci buněk v uvedených strukturách. Efekt byl věkově závislý.

Získání podrobnějších informací o účincích MPEP přispěje k vývoji nových strategií v léčbě nemocí spojených, které jsou spojené se zvýšenou neuronální excitabilitou. Výhodou MPEP je nepřítomnost vážných nežádoucích účinků.

## **MTEP**

Antikonvulzivní efekt se objevil pouze u nejvyšší dávky (40 mg/kg) po podání selektivního nekompetitivního antagonisty mGluR I - MTEP především u P12 a P18. Nedostatečný efekt antagonisty u dávek do 20 mg/kg ukazuje na to, že skupina I mGluR sama o sobě nehraje příliš významnou roli v generování korových následných výbojů. Díky jeho specifitě je však nález důležitý pro studium mechanismů spojených s aktivitou mGluR.

## **Memantin**

Antagonista NMDA receptorů prokázal antikonvulzivní účinek proti korovým následným výbojům pro sledované fenomény, a to především v dávce 20 mg/kg u dvanácti-, osmnácti/ a dvacetipětidenních mlád'at potkana.

Memantin přitom neovlivnil interhemisferické (transkalosální) evokované potenciály.

Memantin zůstává vhodným agens pro studium iGluR především pro absenci vážných nežádoucích účinků při terapeutické dávce.

## **LY379268**

Agonista skupiny II mGluR - LY379268 - nepotlačil motorické záchvaty vyvolané pentetrazolem u modelu generalizovaných tonicko-klonických záchvatů u mlád'at potkana. Navíc se u něj projevil výrazné změny chování u zvířat, které měly prokonvulzivní charakter. Díky prokázané antikonvulzivní aktivitě u jiných modelů záchvatů, má tento ligand stále své místo při studiu mechanismů u neuronálních onemocnění.

## 9. Závěr

Současná antiepileptická léčba je bohužel neuspokojující, nabízí pouze symptomatická řešení, je neúspěšná u řady pacientů (farmakorezistence se vyskytuje přibližně v jedné třetině případů) a je doprovázena řadou nežádoucích účinků. Nový pohled do buněčných, molekulárních a genetických mechanismů iktogeneze a epileptogeneze povede k novým strategiím v terapii, prevenci nebo dokonce přímo léčbě neuronálních onemocnění (Löscher, 2002).

Metabotropní glutamátové receptory mohou být potenciálním cílem pro vývoj nových léčiv v neurologii a psychiatrii. V současné době se v naší oblasti základní výzkum zaměřuje na hledání antikonvulzivních účinků ligandů těchto receptorů u zvířecích modelů a možnosti jejich klinického využití. Získání podrobnějších informací o účincích těchto ligandů pravděpodobně umožní vývoj nových strategií v léčbě nemocí, které jsou spojené se zvýšenou neuronální excitabilitou.

V naší práci jsme při testování antikonvulzivního účinku antagonisty mGluR 5 - MPEP zjistili, že vykazuje antikonvulzivní efekt proti korovým následným výbojům, nevyvolává neurodegeneraci, ale způsobuje změny ve spontánním EEG. U modelů absencí je zcela neúčinný. Naproti tomu MTEP, specifitější antagonist metabotropních glutamátových receptorů podtypu 5, prokázal u stejného modelu jen částečný efekt. Antagonista ionotropních glutamátových receptorů (NMDA) - memantin neovlivnil interhemisferické korové odpovědi, ale byl velmi efektivní proti korovým následným výbojům u stejných věkových skupin mláďat potkana jako MPEP. Z toho vyplývá možný nespecifický účinek MPEP na jiné než mGlu receptory např. NMDA. Tato zjištění vyžadují další analýzu. LY379268 byl zcela neúčinný proti modelu generalizovaných tonicko-klonických záchvatů. U všech ligandů jsme našli věkově závislé rozdíly v jejich účinku.

---

## 10. Literatura

1. Akbar MT, Rattray M, et al. Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Mol Brain Res* 1996; 43: 105-116.
2. Akers RM, Killackey HP. Organization of corticocortical connections in the parietal cortex of the rat. *J Comp Neurol* 1978; 181: 513-538.
3. Alagarsamy S, Saugstad J, et al. NMDA-induced potentiation of mGluR5 is mediated by activation of protein phosphatase 2B/calceinurin. *Neuropharmacology* 2005; 49: 135-145.
4. Alagille D, Baldwin RM, et al. Functionalization at position 3 of the phenyl ring of the potent mGluR5 noncompetitive antagonists MPEP. *Bioorg Med Chem Lett* 2005b; 15: 945-949.
5. Alagille D, Baldwin RM, et al. Synthesis and receptor assay of aromatic-ethynyl-aromatic derivatives with potent mGluR5 antagonist activity. *Bioorg Med Chem* 2005a; 13:197-209.
6. Alexander GM, Godwin DW. Metabotropic glutamate receptors as a strategic target for the treatment of epilepsy. *Epi Res* 2006; 71: 1-22.
7. Alexander GM, Godwin DW. Unique presynaptic and postsynaptic roles of group II metabotropic glutamate receptors in the modulation of thalamic network activity. *Neuroscience* 2006a; 141: 501-513.
8. Andersen TF, Vogensen SB, et al. Design and synthesis of labeled analogs of PhTX-56, a potent and selective AMPA receptor antagonist. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 5104-5112.
9. Anderson JJ, Bradbury MJ. In vivo occupancy of mGluR5 receptor antagonists using the novel radioligand [3H]3-methoxy-5-(pyridi-2-ylethynyl)pyridine). *Euro J Pharmacol* 2003; 473: 35-40.
10. Anderson JJ, Rao SP, et al. [3H]Methoxymethyl-3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridine binding to metabotropic glutamate receptor subtype 5 in rodent brain: in vitro and in vivo characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303:1044-1051.
11. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res Rev* 1999; 29: 83-120.
12. Aronica E, van Vliet EA, et al. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 2333-2344.
13. Aronica EM, Gorter JA, et al. Status epilepticus-induced alterations in metabotropic glutamate receptor expression in young and adult rats. *J Neurosci* 1997; 17: 8588-8595.
14. Avanzini G, Franceschetti S. Cellular biology of epileptogenesis. *Lancet Neurol* 2003; 2: 33-42.
15. Avanzini G. Animal models relevant to human epilepsies. *Ital J Neurol Sci* 1995; 16: 5-8.
16. Badawy RA, Curatolo JM, et al. Changes in cortical excitability differentiate generalized and focal epilepsy. *Ann Neurol* 2007; 61: 324-331.
17. Ballard TM, Woolley ML. The effect of the mGluR5 receptor antagonist MPEP in rodent tests of anxiety and cognition: a comparison. *Psychopharmacology* 2005; 179: 85-98.
18. Barnes CA, Danysz W, et al. Effects of the uncompetitive NMDA receptor antagonist memantine on hippocampal long-term potentiation, short-term exploratory modulation and spatial memory in awake, freely moving rats. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 565-567.
19. Barton ME, Steven C, et al. Comparison of the effect of glutamate receptor modulators in the 6 Hz and maximal electroshock seizure models. *Epilepsy Res* 2003; 56: 17-26.

20. Baskys A, Bayazitov I, et al. Group I metabotropic glutamate receptors reduce excitotoxic injury and may facilitate neurogenesis. *Neuropharmacology* 2005b; 49 (Suppl 1): S146-S156.
21. Baskys A, Fang L, et al. Activation of neuroprotective pathways by metabotropic group I glutamate receptors> a potential target for drug discover? *Ann N Z Acad Sci* 2005a; 1053: 55-73.
22. Battaglia G, Bruno V, et al. Selective blockade of type-1 metabotropic glutamate receptors induces neuroprotection by enhancing GABAergic transmission. *Mol Cell Neurosci* 2001; 17: 1071-1083.
23. Ben-Ari Y, Khazipov R, et al. GABA<sub>A</sub>, NMDA and AMPA receptors: A developmentally regulated "ménage a trois". *Trends Neurosci* 1997; 20: 523-529.
24. Bigge Ch. Ionotropic glutamate receptors. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 441-447.
25. Binns KE, Salt TE. Actions of the systematically active metabotropic glutamate antagonist MPEP on sensory responses of thalamic neurons. *Neuropharmacology* 2001; 40: 639-644.
26. Bisaga A, Krzascik P, et al. Effect of glutamate receptor antagonists on N-methyl-D-aspartate- and (S)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acide-induced convulsant effects in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 1994; 242: 213-220.
27. Blaabjerg M, Fang L et al. Neuroprotection against NMDA exitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents. *Exp Neurol* 2003; 183: 573-580.
28. Blue ME, Martin LJ, et al. Ontogeny of non-NMDA glutamate receptors in rat barrel field cortex: I. Metabotropic receptors. *J Comp Neurol* 1997; 386: 16-28.
29. Bolshakov KV, Kim KH, et al. Design of antagonists for NMDA and AMPA receptors. *Neuropharmacology* 2005; 49: 144-155.
30. Bond A, Jones NM, et al. Neuroprotective effects of LY379268, a selective mGluR2/3 receptor agonist: investigation into possible mechanism of action in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 800-809.
31. Bond A, Ragumorthy N, et al. LY379268, a potent and selective group II mGluR agonist, is neuroprotective in gebрил global, but not focal ischemia, cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 1999; 273: 191-194.
32. Bordi F, Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: Implications for brain diseases. *Prog Neurobiol* 1999; 59: 55-79.
33. Braton ME, Shannon HE. Behavioral and convulsant effects of the (S) enantiomer of the group I metabotropic glutamate receptor agonist 3,5-DHPG in mice. *Neuropharmacology* 2005; 48: 779-787.
34. Bresnik I, Danysz W, et al. Different binding affinities of NMDA receptor channel blockers in various brain regions-indication of NMDA receptor heterogeneity. *Neuropharmacology* 1995; 34: 533-540.
35. Brodi F, Ugolini A. Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog Neurobiol* 1999; 59: 55-79.
36. Browning RA, Wang C. effect of precollicular transaction on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats. *Exp Neurol* 1999; 155: 295-301.
37. Bruno V, Battaglia G, et al. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21:1013-1033.
38. Bruno V, Ksiazek I et al. Selective blockade of metabotropic glutamate receptor subtype 5 is neuroprotective. *Neuropharmacology* 2000; 39: 2223-2230.

39. Burbaeva GS, Boksha IS, et al. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 675-680.
40. Busse CS, Brodtkin J, et al. The behavioral profile of the potent and selective mGlu5 receptor antagonist 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]pyridine (MTEP) in rodent models of anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29:1971-1979.
41. Buszaki G, Traub RD. Physiological Basis of EEG activity. Chapter: 74. In Engel J, Pedly T et al. *Epilepsy: the Comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.
42. Car H, Stefaniuk R, et al. Effect of MPEP in Morris water maze in adult and old rats. *Pharmacol Rep* 2007; 59: 88-93.
43. Carroll FY, Stolie A, et al. BAY36-7620: A potent noncompetitive mGlu1 receptor antagonist with inverse agonist activity. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 965-973.
44. Catania MV, Landwehrmeyer GB, et al. Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neuroscience* 1994; 61: 481-495.
45. Chan KFY, Burnham WM, et al. GABA<sub>B</sub> receptor antagonism abolishes the learning impairments in rats with chronic atypical absence seizures. *Eur J Pharmacol* 2006; 541: 64-72.
46. Chapman AG, Nanan K, et al. Anticonvulsant activity of two metabotropic glutamate Group I antagonists selective for the mGlu5 receptor: 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), and (E)-6-methyl-2-styryl-pyridine (SIB 1893). *Neuropharmacology* 2000; 39: 1567-1574.
47. Chapman AG, Smith SE, et al. The anticonvulsant effect of the non-NMDA antagonists, NBQX and GYKI 52466. *Epilepsy Res* 1991; 9: 92-96.
48. Chapman AG, Yip PK, et al. Anticonvulsant actions of LY367385 ((+)-2-methyl-4-carboxyphenylglycine) and AIDA ((R,S)-1-aminoindan-1,5-dicarboxylic acid). *Eur J Pharmacol* 1999; 368: 17-24.
49. Chen J, Larionov S. Experimental analysis of metabotropic glutamate receptors I and III in mouse strains with different susceptibility to experimental temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett* 2005; 375: 192-197.
50. Choe ES, Shin EH, et al. Regulation of phosphorylation of NMDA receptor NR1 subunits in the rat neostriatum by group I metabotropic glutamate receptors in vivo. *Neurosci Lett* 2006; 394: 246-251.
51. Colquhoun D, Silivotti LG. Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *Trends Neurosci* 2004; 27: 337-334.
52. Cortez R, Snead O. Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents. In Pitkanen A, Schwartzkroin PA, et al. *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier academic press, 2006: 10: 111-127.
53. Cosford ND, Roppe J, et al. [3H]-methoxymethyl-MTEP and [3H]-methoxy-PEPy: potent and selective radioligands for the metabotropic glutamate subtype 5 (mGlu5) receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 351-354.
54. Dale LB, Babwah AV, et al. Mechanisms of metabotropic glutamate receptor desensitisation: Role in the pattering of effector enzyme activation. *Neurochem Int* 2002; 41: 319-326.
55. Danober L, Deransart C. Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rats. *Progr Neurobiol* 1998; 55: 27-57.

- 
56. David HN, Abrani JH. The group I metabotropic receptor antagonist S-4-CPG modulates the locomotor response produced by the activation of D1-like, but not D2-like, dopamine receptors in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 2157-2164.
  57. De Blasi A, Conn PJ, et al. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signalling. *TIPS* 2001; 22: 114-120.
  58. De Curtis M, Avanzini G. Interictal spikes in focal epileptogenesis. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 541-567.
  59. De Sarro G, Chimirri A, et al. Group II mGlu agonists potentiate the anticonvulsant effect of AMPA and NMDA receptor block. *Eur J Pharmacol* 2002; 451, 55-61.
  60. De Sarro GB, De Sarro AD. Anticonvulsant properties of non-competitive antagonists of the NMDA receptor in genetically epilepsy-prone rats: comparison with CPPene. *Neuropharmacology* 1993; 32: 51-58.
  61. De Sarro, Ammendola D, et al. Effects of some excitatory amino acid antagonists on imipenem-induced seizures in DAB/2 mice. *Brain Res* 1995; 671: 131-140.
  62. Deckers CL, Czuczwar SJ. Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed. *Epilepsia* 2000; 41: 1364-1374.
  63. Dichter MA, Pollard J. Cell Culture models for studying epilepsy. In Pitkanen A, Schwartzkroin PA, et al. *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier academic press, 2006: 3:23-39.
  64. Dingledine R, Borges K et al. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 1999; 51: 7-61.
  65. Dinner DS, Neme S, et al. EEG and evoked potential recording from the subthalamic nucleus for deep brain stimulation of intractable epilepsy. *Clin Neurophysiol* 2002; 113: 1391-1402.
  66. Doherty AJ, Dingledine R. The roles of metabotropic glutamate receptors in seizure and epilepsy. *Curr Drug Targets-CNS Neurol Dis* 2002; 1: 251-260.
  67. Dolanský J. *Současná epileptologie*. Praha: Triton, 2000.
  68. Domin H, Kajta M, et al. Neuroprotective effects of MTEP, a selective mGluR5 antagonist and neuropeptide Z on the kainate-induced toxicity in primary neuronal cultures. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 846-858.
  69. Engel J, Pedly T, et al. *Epilepsy: The Comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.
  70. Eriksson KJ, Koivikko MJ. Prevalence, classification, and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. *Epilepsia* 1997; 38: 1275-1282.
  71. Fagni L, Fabrice A, et al. Identification and functional roles of metabotropic glutamate receptor-interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol* 2004; 15: 289-298.
  72. Folbergrová J, Druga R, et al. Seizure induced in immature rats by homocysteic acid and the associated brain damage are prevented by group II metabotropic glutamate receptor agonist (2R,4R)-4-aminopyrrolodine-2,4-dicarboxylate. *Exp Neurol* 2005; 192: 420-436.
  73. Folbergrová J, et al. Behavioral and Metabolic Changes in Immature Rats during Seizures Induced by Homocysteic Acid: The Protective Effect of NMDA and Non-NMDA Receptor Antagonists. *Experimental Neurology* 2000; 161: 336-345.
  74. Folbergrová J, Haugvicová R, et al. Attenuation of seizures induced by homocysteic acid in immature rats by metabotropic glutamate group II and group III receptor agonists. *Brain Res* 2001; 908: 120-129.
-

75. Folbergrová J, Haugvicová R, et al. Seizures induced by homocysteic acid in immature rats are prevented by group III metabotropic glutamate receptor agonist (R,S)-4-phosphonophenylglycine. *Exp Neurol* 2003; 180: 46-54.
76. Franceschetti S, Guatteo E, et al. Ionic mechanisms underlying burst firing in pyramidal neurons: intracellular study in rat sensorimotor cortex. *Brain Res* 1995; 696: 127-139.
77. Francesconi W, Cammalleri M, et al. The metabotropic glutamate receptor 5 is necessary for late-phase long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Brain Res* 2004; 1022: 12-18.
78. French JA, Kanner AM. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs I: treatment of new onset epilepsy: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee and Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology* 2004; 62:1252-1260.
79. Gasparini F, Andres H, et al. (<sup>3</sup>H)-M-MPEP, a potent, subtype-selective radioligand for the metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Bioorg Med Chem Lett* 2002a; 12: 407-409.
80. Gasparini F, Bruno V, et al. (R,S')-4-phosphonophenylglycine, a potent and selective Group III metabotropic glutamate receptor agonist, is anticonvulsive and neuroprotective in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 290: 1678- 1687.
81. Gasparini F, Floersheim P, et al. Discovery and characterization of non-competitive antagonists of group I metabotropic glutamate receptors. *Farmacol* 2001; 56: 95-99.
82. Gasparini F, Kuhn R, et al. Allosteric modulators of group I metabotropic glutamate receptors: Novel subtype-selective ligands and therapeutic perspectives. *Curr Opin Pharmacol* 2002b; 2: 43-52.
83. Gasparini F. 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist, *Neuropharmacology* 1999; 38: 1493-1503.
84. Golshani P, Warren RA, et al. Progression of change in NMDA, non-NMDA, and metabotropic glutamate receptor function at the developing corticothalamic synapse. *J Neurophysiol* 1998; 80: 143-154.
85. Govindaiah G, Cox CL. Metabotropic glutamate receptors differentially regulate GABAergic inhibition in thalamus. *J Neurosci* 2006; 26: 113443-13453.
86. Green MD, Jiang X, et al. Inhibition of human hepatic CYP isoforms by mGluR5 antagonists. *Life Sci* 2004; 75: 947-953.
87. Green MD, Yang X, et al. In vitro metabolic studies on the selective metabotropic glutamate receptor sub-type 5 (mGluR5) antagonist 3-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl) ethynyl]-pyridine (MTEP). *Neurosci Lett* 2006; 391: 91-95.
88. Gubellini P, Pisani A, et al. Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases.
89. Gubellini P, Saulle E, et al. Corticostriatal LTP requires combined mGluR1 and mGluR5 activation. *Neuropharmacology* 2003; 44: 8-16.
90. Guscotto MR, Clarke HF, et al. The effect of (±)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol* 2003; 476: 193-199.
91. Hara H, Yamada N, et al. Effect of YM872, a selective and highly water-soluble AMPA receptor antagonist, in the rat kindling and rekindling model of epilepsy. *Eur J Pharmacol* 2006; 531: 59-65.
92. Haugvicová R, Bílková E, et al. Effects of classical antiepileptics on thresholds for phenomena induced by cortical stimulation in rats. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1011-1015.

93. Haugvicová R, Škutová M, et al. Two different anticonvulsant actions of tiagabine in developing rats. *Epilepsia* 2000; 41: 1375-1381.
94. Hauser WA. The prevalence and incidence of convulsive disorders in Children. *Epilepsia* 1994; 35 (Suppl 2): S1-S5.
95. Havlíčková M, Blahoš J, et al. The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptors recognizes C termini of G-protein alpha-subunits. *J Biol Chem* 2003; 278: 35063-35070.
96. Herman ST. Epilepsy after brain insult. *Neurology* 2002; 59 (Suppl 5): S21-S26.
97. Heuttner JE. Kainate receptors and synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 2003; 70: 387-407.
98. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994; 17: 31-108.
99. Holmes GL, Sarkisian M, et al. Mossy fiber sprouting after recurrent seizures during early development in rats. *J Comp Neurol* 1999; 404: 537-553.
100. Holmes GL. Epilepsy in the developing brain: Lessons from the laboratory and clinic. *Prog Epi Res* 1997; 38: 12-30.
101. Hu RQ, Banerjee PK, et al. regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) release in cerebral cortex in the  $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) model of absence seizure in rat. *Neuropharmacology* 2000; 39: 427-439.
102. Huggins DJ, Grat GH. The function of amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model* 2004; 23: 381-388.
103. Ilnatovych I, Novotny J, et al. Opposing changes of trimeric G protein levels during ontogenetic development of rat brain. *Dev Brain Res* 2002; 133: 57-67.
104. Ikonomidou C, Bittigau P., et al. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 401-405.
105. Ikonomidou C, Bosch F, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283: 70-74.
106. ILAE Commission Report. The epidemiology of the epilepsies: Future directions. *Epilepsia* 1997; 38: 641-618.
107. Isaac JTR, Mellor J, et al. Kainate receptor trafficking: Physiological roles and molecular mechanisms. *Pharmacol Ther* 2004; 104: 163-172.
108. Jablonska B, Smith AL. Development of laminar distributions of kainate receptors in the somatosensory cortex of mice. *Brain Res* 1998; 791: 325-329.
109. Jensen FE. Acute and chronic effects of seizures in the developing brain: experimental models. *Epilepsia* 1999; 40 (Suppl. 1): S51-S58.
110. Jiráček R a Souček R. Hodnocení účinků memantinu u pacientů trpících demencí. Otevřené klinické sledování. *Psychiatrie* 2006; 10: 74-79.
111. Johnson JW, Kotermanski SE. Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 61-67.
112. Kew JNC. Positive and negative allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors: emerging therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2004; 104: 233-244.
113. Kingston AE, Griffey K, et al. Inhibition of group I metabotropic glutamate receptor responses *in vivo* in rats by a new generation of carboxyphenylglycine-like amino acid antagonists. *Neurosci Lett* 2002; 330: 127-130.



114. Kingston AE, O'Neill MJ, et al. Neuroprotective actions of novel and potent ligands of group II metabotropic glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 890: 438-439.
115. Kinney GG, Bruno M, et al. Metabotropic glutamate subtype 5 receptors modulate locomotor activity and sensorimotor gating in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 116-123.
116. Kleinrok Z, Turski WA. Excitatory amino acid antagonists and the anticonvulsive activity of conventional antiepileptic drugs. *Pol J Pharmacol* 1995; 47: 247-252.
117. Klodzinska A, Tatarczynska, et al. Anxiolytic-like effects of MTEP, a potent and selective mGluR5receptor antagonist does not involve GABA<sub>A</sub> signaling. *Neuropharmacology* 2004; 47: 342-350.
118. Knake S, Hamer HM, et al. Tiagabine-induced absence status in idiopathic generalized epilepsy. *Seizure* 1999; 8: 314-317.
119. Knöpfel T, Gasparini F. Metabotropic glutamate receptors: potential drug targets. *CNS Res* 1996; 1: 103-108.
120. Kohl BK, Dannhardt. The NMDA receptor complex: a promising target for novel antiepileptic strategies. *Curr Med Chem* 2001; 8: 1275-1289.
121. Korytová H, Kubová H, et al. Changes of cortical epileptic afterdischarges under the influence of convulsant drug. *Brain Res Bull* 2002; 58: 49-54.
122. Kubová H, Lanštiaková M, et al. Pharmacology of cortical epileptic afterdischarges in rats. *Epilepsia* 1996; 37: 336-341.
123. Kubová H. Ontogenesis and treatment efficacy: Prevention of seizures in the immature brain. *Advances in Neurology* 1999; 81: 357-361. Stefan H, Andermann F. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1998.
124. Kvamme E. Synthesis of glutamate and its regulation. *Progr Brain Res* 1998; 116: 73-85.
125. Landmark CJ. Targets for antiepileptic drugs in the synapses. *Med Sci Monit* 2007; 13: 1-7.
126. Lea PM, Custer SJ, et al. Neuronal and glial mGluR5 modulation prevents stress-induced enhancement of NMDA receptor current. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 287-289.
127. Lea PM, Faden AI. Metabotropic glutamate receptors subtype 5 antagonists MPEP and MTEP. *CNS Drug Rev* 2006; 12: 149-166.
128. Liu XB, Munoz A, et al. Changes in subcellular localization of metabotropic glutamate receptor subtypes during postnatal development of mouse thalamus. *J Comp Neurol* 1998; 395: 450-465.
129. López-Bendito G, Shigemoto R, et al. Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortical development, *Cereb Cortex* 2002; 12: 625-638.
130. Löscher W a Hönack D. Over-additive anticonvulsant effect of memantine and NBQX in kindled rats. *Eur J Pharmacol* 1994; 259: 3-5.
131. Löscher W, Dekundy A, et al. mGluR1 and mGluR5 receptor antagonists lack anticonvulsant efficacy in rodent models of difficult-to-treat partial epilepsy. *Neuropharmacology* 2006; 50: 1006-1015.
132. Löscher W, Schmidt D. Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2006; 47: 1253-1284.
133. Löscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 113-120.
134. Löscher W. Pharmacology of glutamate receptor antagonists in the kindling model of epilepsy. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 721-741.

135. Lüders H, Acharya J, et al. Semiological seizure classification. *Epilepsia* 1998; 39: 1006-1013.
136. Lujan R, Roberts JDB et al. Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J Chem Neuroanat* 1997; 13: 219-241.
137. Lujan R, Shigemoto R, et al. Glutamate and GABA receptor signaling in the developing brain. *Neuroscience* 2005; 130: 567-580.
138. Mareš P, Folbergrová J, et al. Excitatory aminoacids and epileptic seizures in immature brain. *Physiol Res* 2004; 53 (Suppl.1): S115-S124.
139. Mareš P, Haugvicová R, et al. Unequal development of thresholds for various phenomena induced by cortical stimulation in rats. *Epilepsy Res* 2002; 49: 35-43.
140. Mareš P, Kubová H, et al. Mortor and electrocorticographic epileptic activity induced by 3-mercaptopropionic acid in immature rats. *Epilepsy Res* 1993; 16: 11-18.
141. Mareš P, Kubová H. Electrical stimulation - induced models of seizures. In: Pitkanen A., Schwartzkroin PA, et al. *Models of seizures and epilepsy*. Amsterdam, Elsevier Academic Press, 2006. pp. 153-159.
142. Mareš P, Lanštiaková M, et al. Ketamine blocks cortical epileptic afterdischarges but not paired-pulse and frequency potentiation. *Neuroscience* 1992; 50: 339-344.
143. Mareš P, Makal V, et al. Increased epileptogenesis in the immature brain. *Molecular neurobiology of epilepsy* 1992; 9:127-130. Engel J, Wasterlain C, et al. Elsevier Science Publishers BV, 1992.
144. Mareš P, Mareš J, et al. Development of the interhemispheric response in rats. *TIT J Life Sci* 1975; 5: 5-10.
145. Mareš P, Mikulecká N. MPEP, an antagonist of metabotropic glutamate receptors, exhibits anticonvulsant action in immature rats without an impairment of motor performance. *Epilepsy Res* 2004; 60: 17-26.
146. Mareš P, Seidl J, et al. Differential action of phenytoin and carbamazepine on cortical interhemispheric responses in young but not in adult rats. *Neurosci Lett* 1993b; 160: 49-52.
147. Mareš P, Seidl J, et al. Paired -pulse and frequency potentiation of cortical responses in developing rats. *Brain Res Bull* 1993a; 32: 107-111.
148. Mareš p, Zouhar a, et al. The electrocorticographic pattern of generalized seizures in rats during ontogenesis. *Physiol Bohemoslov* 1980; 29: 193-202.
149. Mareš P. Anticonvulsant Action of an Antagonist of Type I of metabotropic glutamate receptors in immature rats. *Epilepsia* 2002; 43 (Suppl. 7): 23 only.
150. Mareš P. Anticonvulsant action of three neurosteroids against cortical epileptic afterdischarges in immature rats. *Brain Res Bull* 2005; 68: 179-184.
151. Mareš P. Bioelectrical activity of an epileptogenic focus in rat neocortex. *Brain Res* 1973; 56: 203-213.
152. Mareš P. Development of sensitivity to excitatory amino acid antagonists. *Psychiatrie* 2004; 8 (S3): S13-19.
153. Mareš P. Developmental changes in the sensitivity of excitatory amino acids. *Psychiatrie* 2001; Suppl. 3: S15-S17.
154. Mareš P. Epileptic phenomena in the immature brain. *Physiol Res* 1991; 40: 577-584.

155. Mareš P. Excitatory amino acids and epileptogenesis during ontogenesis. *Childhood epilepsies and brain development* 1999a; 14: 157-160. Nehlig A, Motte J, et al. John Libbey and Co Ltd., 1999.
156. Mareš P. Ontogenetic development of bioelectrical activity of the epileptogenic focus in rat neocortex. *Neuropadiatrie* 1973; 4: 434-445.
157. Mareš P. Ontogeny of ethosuximide action against two seizure models in rats is different. *L Sci (Pharmacol Lett)* 1998; 63: PL 51-PL57.
158. Mareš P. Some mechanisms of increased epileptogenesis in the immature brain. *Advances in Neurology* 1999b; 81: 57-60. Stefan H, Andermann F. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1999.
159. Mathiesen JM, Svendsen N, et al. Positive allosteric modulation of the human metabotropic glutamate receptor 4 (hmGluR4) by SIB-1893 and MPEP. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 1026-1030.
160. Matsumoto R, Nair DR, et al. Functional connectivity in human cortical motor system: a cortico-cortical evoked potential study. *Brain* 2007; 130: 181-197.
161. McLean KJ, O'Brein TJ, et al. The influence of gender on the aggravation of absence seizures by carbamazepine in the low-dose pentylenetetrazol rat model. *Seizure* 2004; 13: 208-216.
162. McLean MJ, Gupta RC, et al. Prophylactic and therapeutic efficacy of memantine against seizures produced by soman in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 112: 95-103.
163. Meldrum BS, Akbar MT et al. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Res* 1999a; 36: 189-204.
164. Meldrum BS, Chapman AG. Basic mechanisms of gabitril (tiagabine) and future potential developments. *Epilepsia* 1999; 40: 2-6.
165. Meldrum BS, Craggs MD, et al. The effects of AMPA receptor antagonists on kindled seizures and on reflex epilepsy in rodents and primates. *Epilepsy Res* 1992; 9: 307-311.
166. Meldrum BS, Rogawski MA. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* 2007; 4: 18-61.
167. Meldrum BS. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. *Epi Res* 2002; 50: 33-40.
168. Meldrum BS. Excitatory amino acid transmitters in epilepsy. *Epilepsia* 1991a; 32 (Suppl 2): S1-S3.
169. Meldrum BS. Excitotoxicity and epileptic brain damage. *Epilepsy Res* 1991b; 10: 55-61.
170. Meldrum BS. Glutamate and glutamine in the brain. *J Nutr* 2000; 130 (Suppl. 4): S1007-S1015.
171. Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathophysiology. *J Nutr* 2000; 130: 1007-1015.
172. Messenger MJ, Dawson LG, et al. Changes in metabotropic glutamate receptor 1-8 gene expression in the rodent basal ganglia motor loop following lesion of the nigrostriatal tract. *Neuropharmacology* 2002; 43: 261-271.
173. Micheli F. Methylphenylethynylpyridine. *Curr Opin Investig Drugs* 2000; 1: 355-359.
174. Moldrich RX, Beart PM et al. Anticonvulsant activity of 3,4-dicarboxyphenylglycines in DBA/2 mice. *Neuropharmacology* 2001a; 40: 732-735.
175. Moldrich RX, Beart PM. Emerging signalling and protein interactions mediated via metabotropic glutamate receptors. *Curr Drug Targets-CNS Neurol Dis* 2003; 2: 109-122.

176. Moldrich RX, Chapman AG, et al. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. *Eur J Pharmacol* 2003; 476: 3-16.
177. Moldrich RX, Jeffrey M, et al. Antiepileptic activity of group II metabotropic glutamate receptor agonists (-)-2-oxa-4-aminobicyclohexane-4,6-dicarboxylate (LY379268) and (-)-2-thia-4-aminobicyclohexane-4,6-dicarboxylate (LY3897-95). *Neuropharmacology* 2001b; 41: 8-18.
178. Moldrich RX, Talebi A et al. The mGlu2/3 agonist 2R,4R-4-aminopyrrolidine-2,4-dicarboxylate, is anti- and proconvulsant in DBA/2 mice. *Neurosci Lett* 2001c; 299, 125-129.
179. Monn JA, Valli MJ, et al. Synthesis, pharmacological characterization, and molecular modeling of heterobicyclic amino acids related to (+)-2-aminobicyclo[3.1.0] hexane-2,6-dicarboxylic acid (LY354740): identification of two new potent, selective, and systemically active agonists for group II metabotropic glutamate receptors. *J Med Chem* 1999; 42: 1027-1040.
180. Morimoto K, Fahnestock M et al. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* 2004; 73: 1-60.
181. Mosché SL, Pedly TA. Diagnostic evaluation. Chapter: 71. In Engel J, Pedly T et al. *Epilepsy: the Comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.
182. Movsesyan VA, O'Lcary DM, et al. mGluR5 antagonists 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine and (E)-2-methyl-6-(2-phenylethenyl)pyridine reduce traumatic neuronal injury in vitro and in vivo by antagonising N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 41-47.
183. Nagaraja RY, Becker A. Repeated administration of group I mGluR antagonists prevents seizure-induced long-term aberrations in hippocampal synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 2005; 49: 179-187.
184. Nagaraja RY, Grecksch G, et al. Group I metabotropic glutamate receptors interfere in different ways with pentylenetetrazole seizures, kindling, and kindling-related learning deficits. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; 370: 26-34.
185. Nair DR, Mohamed A, et al. A critical review of the different conceptual hypotheses framing human focal epilepsy. *Epileptic Disord* 2004; 6: 77-83.
186. Olsen R, Avoli M. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia* 1997; 38:399-407.
187. Pagano A, Ruegg D, et al. The non-competitive antagonists 2-methyl-6-(phenylethynyl)pyridine and 7-hydroxyiminocyclopropan[b]chromen carboxylic acid ethylester interact with overlapping binding pockets in the transmembrane region of group-I metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem* 2000; 275: 33750-33758.
188. Panayiotopoulos CP. Typical absence seizures and their treatment. *Arch Dis Child* 2000; 81: 351-355.
189. Parsons CG, Danysz W, et al. Memantine is clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist – a review of preclinical data. *Neuropharmacology* 1999; 38: 735-767.
190. Parsons CG, Quack G, et al. Comparison of the potency, kinetics and voltage-dependency of series of uncompetitive NMDA receptor antagonists in vitro with anticonvulsive and motor impairment activity in vivo. *Neuropharmacology* 1995; 1239-1258.
191. Paxinos G and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, New York 1998.
192. Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA et al. The Glur2b hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci* 1997; 20: 464-470.

193. Petersen S, Bomme C, et al. Differential effects of mGluR1 and mGluR5 antagonism on spatial learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 73: 381-389.
194. Petralia RS, Sans N, et al. Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29: 436-452.
195. Petralia RS, Wang YX, et al. The metabotropic glutamate receptors. mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localization. *Neuroscience* 1996; 71: 949-976.
196. Petrovic M, Horák M, et al. Physiology and pathology of NMDA receptors. *Prague Med Rep* 2005; 106: 113-136.
197. Pietraszek M, Gravius A, et al. mGluR5, but not mGluR1, antagonist modifies MK801-induced locomotor activity and deficit of prepulse inhibition. *Neuropharmacology* 2005; 49: 73-85.
198. Pin JP, Colle CD, et al. New perspectives for development of selective metabotropic glutamate receptor ligands. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 277-294.
199. Pisani A, Gubellini P, et al. Metabotropic glutamate receptor 5 mediates the potentiation of NMDA responses in medium spiny striatal neurons. *Neurosci* 2001; 106: 579-587.
200. Pitkänen A, Kubová H. Antiepileptic drugs in neuroprotection. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5: 777-798.
201. Poláček R, Kubová H, et al. Suppression of cortical epileptic afterdischarges in developing rats by anticonvulsants increasing GABAergic inhibition. *Epilepsy Res* 1996; 25: 177-184.
202. Posner EB, Mohamed K, et al. a systematic review of treatment of typical absence seizures in children and adolescents with ethosuximide, sodium valproate or lamotrigine. *Seizure* 2005; 14: 117-122.
203. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizures. *Electroenceph. Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-294.
204. Rajendra W, Armugam A, et al. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 45: 125-41.
205. Risterucci C, Coccorello M, et al. The metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonist MPEP and the Na<sup>+</sup> channel blocker riluzole show different neuroprotective profiles in reversing behavioral deficits induced by excitotoxic prefrontal cortex lesions. *Neuroscience* 2006; 137:211-220.
206. Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5:553-564.
207. Romano C, Sesma MA, et al. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 1995; 355: 455-469.
208. Roppe JR, Wang B, et al. 5-[(2-methyl-1,3-thiazol-4-yl)ethynyl]-2,3-bipyridin: a highly potent, orally active metabotropic glutamate subtype 5 (mGluR5) receptor antagonist with anxiolytic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 3993-3996.
209. Russo E, Constanti A, et al. Nifedipine affects the anticonvulsant activity of topiramate in various animal models of epilepsy. *Neuropharmacology* 2004; 46: 865-878.
210. Sacaan AI, Bymaster FE, et al. Metabotropic glutamate receptor activation produces extrapyramidal motor system activation that is mediated by striatal dopamine. *J Neurochem* 1992; 59: 245-251.
211. Sayin U, Rutecki PA. Group I metabotropic glutamate receptor activation produces prolonged epileptiform neuronal synchronization and alters evoked population responses in the hippocampus. *Epi Res* 2003; 53: 186-95.

212. Schickerová R, Mareš P, et al. Correlation between electrocorticographic and motor phenomena induced by metrazol during ontogenesis in rats. *Exp Neurol* 1984; 84: 153-164.
213. Schmued LC, Albertson CH, et al. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 1997; 751: 37-46.
214. Schmued LC, Hopkins KJ. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 2000; 874: 123-130.
215. Schoepp DD, Jane DE, et al. Pharmacologic agents acting at subtypes of meta-botropic glutamate receptors. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1431-1476.
216. Schoepp DD. Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the CNS. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 12-20.
217. Selbie LA, Stephen JH. G protein-coupled receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19:87-93.
218. Shigemoto R, Nomura S, et al. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. *Neurosci Lett* 1993; 163: 53-57.
219. Shneker BF, Fountain NB. Epilepsy. *Dis Mon* 2003; 49: 426-478.
220. Šlamberová R, Mareš P. Cortical epileptic afterdischarges in immature rats are differently influenced by NMDA receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2005; 516: 10-17.
221. Smolders I, Lindekens H, et al. In vivo modulation of extracellular hippocampal glutamate and GABA levels and limbic seizures by group I and II metabotropic glutamate receptor ligands. *J Neurochem* 2004; 88: 11068-1077.
222. Snead OC, Banerjee PK. Modulation of absence seizures by the GABA<sub>A</sub> receptor: a critical role for metabotropic glutamate receptor 4 (mGluR4). *J Neurosci* 2000; 20: 6218-6234.
223. Snead OC. Antiabsence seizure activity of specific GABA<sub>B</sub> and  $\gamma$ -hydroxybutyric acid receptor antagonist. *Pharmacol Biochem Behav* 1996a; 53: 73-79.
224. Snead OC. Relation of the [<sup>3</sup>H] $\gamma$ -hydroxybutyric acid (GHB) binding site to the  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>) receptor in rat brain. *Biochem Pharmacol* 1996b; 52: 1235-1243.
225. Spooren WPJM, Gasparini F, et al. Effect of the prototypical mGlu(5) receptor antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine on rotarod, locomotor activity and rotational responses in unilateral 6-OHDA-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 406: 403-410.
226. Spooren WPJM, Gasparini F. Novel allosteric antagonists shed light on mGluR5 receptors and CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 331-337.
227. Spreafico R, Frassoni C, et al. Distribution of AMPA selective glutamate receptors in the thalamus of adult rats and during postnatal development. A light and ultrastructural immunocytochemical study. *Dev Brain Res* 1994; 82:231-244.
228. Steckler T, Oliviera AFM, et al. Metabotropic glutamate receptor 1 blockade impairs acquisition and retention in a spatial Water maze task. *Behav Brain Res* 2005; 164: 52-60.
229. Stevens Ch. Presynaptic function. *Curr Opin Neurobiol* 2004; 14: 1-5.
230. Stoop R, Conquet F, et al. Activation of metabotropic glutamate 5 and NMDA receptors underlies the induction of persistent bursting and associated long-lasting changes in CA3 recurrent connections. *J Neurosci* 2003; 23: 5634-44.
231. Stromgaard K, Mellor I. AMPA receptor ligands: Synthesis and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. *Med Res Rev* 2004; 24: 589-620.
232. Szydłowska K, Kaminska B, et al. Neuroprotective activity of selective mGluR1 and mGluR5 antagonists in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 2007; 554: 18-29.

233. Thomas LS, Jane DE, et al. Glutamate release inhibiting properties of the novel mGluR5 receptor antagonist MPEP: complementary in vitro and in vivo evidence. *Neuropharmacology* 2001; 41: 523-527.
234. Thommsen C, Dalby NO. Roles of metabotropic glutamate receptor subtypes in modulation of pentylenetetrazole-induced seizure activity in mice. *Neuropharmacology* 1998; 37: 1465-1473.
235. Thompson SM, Cai X, et al. The use of brain slice cultures for study of epilepsy. In Pitkanen A, Schwartzkroin PA, et al. *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier academic press, 2006: 5: 45-59.
236. Thuault SJ, Davies CH, et al. Group I mGluRs modulate the pattern of non-synaptic epileptiform activity in the hippocampus. *Neuropharmacology* 2002; 43: 141-146.
237. Tortella FC, Hill RG. EEG seizure activity and behavioral neurotoxicity produced by (+)-MK801, but not the glycine site antagonist L-687,414 in the rat. *Neuropharmacology* 1996; 35: 441-448.
238. Traub RD, Jefferys JGR. Epilepsy in vitro: Electrophysiology and computer modeling. In Engel J, Pedly T et al. *Epilepsy: the Comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1998.
239. Trist DG. Excitatory amino acid agonists and antagonists: Pharmacology and therapeutic applications. *Pharm Acta Helv* 2000; 74:221-229.
240. Tsenov G, Mareš P. Korové evokované potenciály jako metoda pro farmakologické studie. *Psychiatrie* 2003; 7: 38-40.
241. Tureček R, Vlachová V, et al. Spontaneous openings of NMDA receptor channels in cultured rat hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1999-2008.
242. Tureček R, Vyklický L Jr. An NMDA glutamate receptor subtype. *Cesk Fysiol* 1997; 46: 122-133.
243. Turner JP, Salt TE. Synaptic activation of the group I metabotropic glutamate receptor mGluR1 on the thalamocortical neurons of the rat dorsal lateral geniculate nucleus in vitro. *Neurosci* 2000; 100: 493-505.
244. Tzschentke TM. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications – An introduction. *Amino Acids* 2002; 23: 147-152.
245. Velíšek L, Vondříčková R, et al. Models of simple partial and absence seizures in freely moving rats: action of ketamine. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 45: 889-896.
246. Velíšek L. Electrical stimulation - induced models of seizures. In: Pitkanen A., Schwartzkroin PA, et al. *Models of seizures and epilepsy*. Amsterdam, Elsevier Academic Press, 2006. pp. 127-146.
247. Velíšek L. Models of chemicaly –induced acute seizures. In Pitkanen A, Schwartzkroin PA, et al. *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier academic press, 2006: 11: 127-147.
248. Wang Ch, Zhao S, et al. Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode induced fluorescence detection. *J Chromatogr B* 2006; in press.
249. Wang X, Ai J, et al. Altered glutamate and GABA release within thalamocortical circuitry in metabotropic glutamate receptor 4 knockout mice. *Neuroscience* 2005; 134: 1195-1203.
250. Wang XM, Bausch SB. Effects of distinct classes of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on seizures, axonal sprouting and neuronal loss in vitro: Suppression by NR2B-selective antagonists. *Neuropharmacology* 2004; 27: 1008-1020.

251. Wasterlain CG. Recurrent seizures in the developing brain are harmful. *Epilepsia* 1997; 38: 728-734.
252. White HS, Smith-Yockman Ms, et al. Therapeutic assays for identification and characterization of antiepileptic and antiepileptogenic drugs. In Pitkanen A, Schwartzkroin PA, et al. *Models of seizures and epilepsy*. Elsevier academic press, 2006: 44: 539-551.
253. White HS. Animal models of epileptogenesis. *Neurology* 2002; 59 (Suppl. 5): S7-S14.
254. Williamson YW, Bertram J, et al., a comparison of three NMDA receptor antagonists in the treatment of prolonged status epilepticus. *Epi Res* 2004; 59: 43-50.
255. Wittmann M, Hubert GW, et al. Activation of metabotropic glutamate receptor 1 inhibits glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 2001; 105: 881-889.
256. Wong LA, Mayer ML, et al. Willardiines differentiate agonist binding sites for kainite-versus AMPA-preferring glutamate receptors in DRG and hippocampal neurons. *J Neurosci* 1994; 14: 3881-3897.
257. Yu M, Tueckmantel W, et al. Methoxyphenylethynyl, methoxypyridylethynyl and phenylethynyl derivatives of pyridine: Synthesis, radiolabeling and evaluation of new PET ligands for metabotropic glutamate subtype 5 receptors. *Nucl Med and Biol* 2005; 32: 631-640.
258. Zadrozniak M, Sekowski A. Effect of MPEP, a selective mGluR5 antagonist, on the antielectroshock activity of conventional antiepileptic drugs. *Pol J Pharmacol* 2004; 56: 595-598.
259. Zarubová J. Epilepsie - Současné možnosti farmkoterapie. *Remedia* 1999; 5: 280-291.
260. Zhu CZ, Wilson SG, et al. Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. *Eur J Pharmacol*. 2004; 506: 107-118.
261. Ziemniska E, Lazarewicz JW. Excitotoxic neuronal injury in chronic homocysteine neurotoxicity studied in vitro: the role of NMDA and group I metabotropic glutamate receptors. *Acta Neurobiol Exp* 2006; 66: 301-309.