

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Doktorský studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Petr Fábera**

**Následky časného inzultu v excitabilitě mozku laboratorního potkana**

Consequences of perinatal insult on brain excitability in immature and adult rats

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Praha, 2022

**Prohlášení:** Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného či stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 23.5. 2022

Petr Fábera

## **Poděkování**

Tato práce by nemohla vzniknout bez pomoci a spolupráce řady kolegů. Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli, prof. MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc., nejen za odborné vedení, ale především za vstřícnost a podporu během celého mého doktorského studia. Poděkování za odbornou pomoc s řešením jednotlivých experimentů patří dále všem kolegům z Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu Akademie Věd ČR, zejména Doc. Haně Kubové, CSc., Mgr. Liborovi Uttlovi a Mgr. Grygoryi Tsenovovi, Ph.D. Za technickou pomoc s experimentální částí této práce bych mezi jinými rád poděkoval laborantkám, paní Irině Neševě a paní Blance Čejkové.

V neposlední řadě bych rád poděkoval celé své rodině, zejména svojí manželce, MVDr. Veronice Fáberové, která v každé chvíli zůstává mou největší oporou.

## **Obsah**

<b>1. ÚVOD</b>	9
1.1. Epileptogeneze	9
1.2. Status epilepticus	10
1.3. Temporální epilepsie	11
1.4. Animální modely pro studium temporální epilepsie	12
1.4.1. Pilokarpinový model epileptického statu	13
1.4.2. Elektricky indukované SE modely a modely epileptických záchvatů	14
1.5. Adenosin a jeho role v epileptogenezi	15
1.5.1. Adenosinové receptory	16
1.5.2. Adenosinkináza	18
1.5.3. Ontogenetické aspekty adenosinergního systému v CNS	20
1.5.4. Farmakologické možnosti ovlivnění adenosinergního systému v epileptogenezi	20
<b>2. CÍLE A HYPOTÉZY</b>	24
<b>3. VLASTNÍ POZOROVÁNÍ</b>	26
3.1. Vývojový profil adenosinového receptoru A1 a isoform ADK	26
3.1.1. Metodika	26
3.1.2. Výsledky	28
3.2. Vliv agonisty A1R na změny excitability hipokampu v průběhu ontogeneze	33
3.2.1. Metodika	33
3.2.2. Výsledky	36
3.3. Úloha ADK ve změně excitability hipokampu v průběhu intaktního vývoje mozku a po indukovaném SE	40
3.3.1. Metodika	40
3.3.2. Výsledky	45
<b>4. SOUHRNNÁ DISKUZE</b>	52
<b>5. ZÁVĚRY</b>	62
<b>6. PUBLIKACE AUTORA</b>	64
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA</b>	66
<b>8. PŘÍLOHY</b>	79

## Seznam zkratek

5-ITU	5-iodotubercidin
A1R	adenosinový A1 receptor
A2AR	adenosinový A2A receptor
A2B	adenosinový A2B receptor
A3R	adenosinový A3 receptor
AD/ADs	následný výboj/následné výboje
ADK	adenosinkináza
ADK-L	isoforma L adenosinkinázy
ADK-S	isoforma S adenosinkinázy
ADP	adenosindifosfát
AED	antiepileptická medikace
AMP	adenosinmonofosfát
AP	anteroposteriorně
ATP	adenosintrifosfát
BZD	benzodiazepin
CA	cornu ammonis hipokampu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBZ	karbamazepin
CCPA	2-chloro-N6-cyclopentyladenosin
CNS	centrální nervová soustava
CNT	koncentrační nukleosidový transportér
CPA	N6-cyclopentyladenosin
CZP	clonazepam
D	hloubka
DG	gyrus dentatus
ECT	extracelulární tekutina
ENT	ekvilibrační nukleosidový transportér
ESL	eslikarbazepin
FAD	flavinadenindinukleotid
GABA	kyselina gamma aminomáselná
GBP	gabapentin

GPCR	metabotropní receptory spřažené s G proteiny
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
L	laterálně
LCM	lakosamid
LiCl	lithium chlorid
LTG	lamotrigin
M1	muskarinový receptor 1
M2	muskarinový receptor 2
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NIU	normalizované jendotky intenzity
OXC	oxkarbazepin
PARA	paraldehyd
PGB	pregabalin
PER	perampanel
PILO	pilokarpin
PS	polyspikes
RNA	ribonukleová kyselina
SAH	S-adenosylhomocystein
SE	status epilepticus
SEM	standard error of the mean
SMA	senzorimotorický kortex
TLE	temporální lobární epilepsie
TPM	topiramát
VPA	valproát
WB	Western blot
WDS	wet dog shakes
ZNS	zonesamid

## Abstrakt

Perinatální inzult může vést k trvalému poškození vyvíjejícího se mozku a rozvoji epilepsie. Epileptický status (SE) v perinatálním období vede s odstupem ke zvýšení excitability hipokampu. Funkční a strukturální změny hipokampu jsou podkladem epileptogeneze, procesu vedoucímu k manifestaci temporální epilepsie (TLE). Významnou roli v patogenezi TLE hraje adenosin. Adenosin zajišťuje antikonvulzivní účinek prostřednictvím adenosinových A1 receptorů (A1R). Koncentrace adenosinu podléhá regulaci působením enzymu adenosinkinázy (ADK), která se vyskytuje ve dvou isoformách - ADK-L a -S. Hlavním cílem disertační práce je objasnit souvislost změny excitability hipokampu a exprese A1R a ADK v rámci přirozeného vývoje mozku a po působení SE. Aplikace A1R agonisty 2-chloro-N6-cyclopentyladenosinu (CCPA) a inhibitoru ADK 5-iodotubercidinu (5-ITU) ovlivňuje antikonvulzivní účinek, který se mění s ohledem na změny exprese A1R a ADK. Po navození LiCl-pilokarpinového SE byla studována excitabilita hipokampu pomocí modelu hipokampálních následných výbojů (ADs). Výsledky byly korelovány se změnami exprese A1R a ADK. Krátce po vyvolání SE bylo prokázáno snížení excitability hipokampu, v delším odstupu se měnil v hyperexcitabilitu spojenou s rozvojem spontánních epileptických záchvatů. V průběhu vývoje dochází ke zvyšování exprese ADK-S, exprese ADK-L se nemění. Po SE dochází ke snížení exprese ADK-L a poté stoupá, u ADK-S je to naopak. Exprese A1R klesá od 10. dne vývoje. Aplikace 5-ITU vede k výraznému snížení excitability hipokampu, současně i k poklesu incidence epileptických záchvatů po SE. Aplikace CCPA rovněž souvisí s poklesem excitability hipokampu v průběhu ontogeneze. Vývojové změny exprese A1R a ADK významně ovlivňují excitabilitu hipokampu a tím se mohou podílet na rozvoji epilepsie. Farmakologické ovlivnění A1R a ADK s vhodným načasováním aplikace tak představuje nové možnosti léčby i prevence epilepsie.

**Klíčová slova:** adenosin, adenosinkináza, hipokampus, následný výboj, isoforma, ontogeneze, pilokarpin, receptor, status epilepticus

## **Abstract**

Perinatal insult may lead to a permanent impairment of brain function resulting in the development of epilepsy. Status epilepticus (SE) in immature rats leads to hippocampal hyperexcitability. The functional and morphological changes of the hippocampus are similar to those seen in human temporal lobe epilepsy. The excitability may be influenced by adenosine. Adenosine acts its anticonvulsant effect by activation of A1 receptors (A1R). The concentration of adenosine is regulated by adenosine kinase (ADK) present in two isoforms – ADK-L and -S. The main goal of the thesis is to elucidate the changes in A1R and ADK isoforms expression during intact brain development and after SE. A1R agonist 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA), as well as inhibition of ADK by 5-iodotubercidin (5-ITU), may bolster the anticonvulsant effect, but their action may correspond with the level of A1R and ADK. Hippocampal excitability in immature rats after LiCl-pilocarpine SE was studied by the model of hippocampal afterdischarges (ADs) and correlated with changes of A1R and ADK in the hippocampus. ADs demonstrated significantly decreased hippocampal excitability shortly after SE induction, whereas significant hyperexcitability accompanied by spontaneous seizures in older rats was shown. Increasing ADK-S expression during early brain development was revealed, ADK-L remained unchanged. In SE rats, ADK-L showed an initial decline in expression followed by an increase, whereas ADK-S demonstrated opposite changes. A1R expression gradually decreased in 10-day-old rats. 5-ITU inhibited ADs and decreased the incidence of spontaneous seizures. CCPA decreased hippocampal excitability in immature rats. Age-related differences in hippocampal excitability might be due to the expression of A1R and ADK in the hippocampus. A1R agonists and ADK inhibitors may represent promising approaches to developing a new anticonvulsant and/or preemptive treatment of epilepsy.

**Key words:** adenosine, adenosine kinase, afterdischarge, hippocampus, isoform, ontogenesis, pilocarpine, receptor, status epilepticus



## 1. ÚVOD

Epilepsie je považována za jedno z nejčastějších neurologických onemocnění postihující jak dětskou i dospělou populaci. Je definována jako onemocnění charakterizované výskytem spontánních neprovokovaných záchvatů, jejichž podkladem je abnormální synchronizovaná aktivita nervových buněk. Postihuje okolo 60 milionů lidí po celém světě, což odpovídá přibližně 0,1 % celosvětové populace (McNamara, 1999; Fisher a kol., 2014).

Předpokládá se, že přibližně 50 % všech případů epilepsie je spojeno s předcházejícím vyvolávajícím faktorem neboli inzultem. U různých věkových skupin se mohou nejčastější faktory vedoucí k rozvoji epilepsie lišit. V dospělosti dominuje cévní mozková příhoda, zánětlivé postižení mozku a traumata CNS, u dětí často komplikované porody s hypoxickým poškozením mozku, záněty a traumatické postižení mozku (Delovrenizo a kol., 2005; Huser a Annegers, 1991; Hauser a kol., 1991). Z klinických studií vyplývá, že některé patologické stavy v období perinatálního vývoje (např. asfyxie, CNS hemoragie, neuroinfekce, asymetrické febrilní křeče či epileptický status) zvyšují riziko vzniku epilepsie v dětství i v dospělosti (Chin a kol., 2004; Rosenow a kol., 2007). Neprovokované spontánní epileptické záchvaty se objevují zpravidla po různě dlouhé latentní době po působení vyvolávajícího inzultu (u laboratorních potkanů měsíce, u lidí roky). Patofyziologické mechanismy, které jsou vyvolány faktory, které vedou k rozvoji spontánních neprovokovaných záchvatů u doposud zdravého mozku jsou předmětem intenzivního výzkumu. Proces, při kterém se zcela funkčně normální mozek stává náchylným k epileptickým záchvatům neboli se zvyšuje pravděpodobnost k vyvolání epileptického záchvatu, se označuje termínem epileptogeneze (Dudek a Staley, 2012).

### 1.1. Epileptogeneze

Původně byl pojem epileptogeneze výlučně užíván pro období tzv. latence neboli časový úsek od působení iniciálního inzultu (ischemie, trauma CNS, epileptický status atd.) po rozvoj prvního neprovokovaného epileptického záchvatu. Řada studií však naznačuje, že frekvence a intenzita záchvatů se může po prvním neprovokovaném záchvatu dále měnit (Bertram a Cornett, 1993; Hetlier, 1998), což podporuje hypotézu, že proces epileptogeneze je proces kontinuální a neukončený, charakterizovaný nejen rozvojem prvního neprovokovaného

záchvatu. Změny, které se odehrávají v průběhu epileptogeneze jsou doposud nedokonale objasněné. Z experimentálních i klinických dat vyplývá, že incidence rozvoje epilepsie je nejvyšší v prvních měsících až letech po vyvolávajícím inzultu, s delším časovým odstupem incidence klesá (Annegers a kol., 1998; Hesdorffer a kol., 1998). Mezi jednotlivými iniciálními inzulty jsou rovněž rozdíly. Signifikantně vyšší incidence je u epileptického statu (SE) v porovnání s ischemickou mozkovou příhodou nebo traumatickým poškozením mozku (Lothman a Bertram, 1993). Incidence rozvoje neprovokovaných záchvatů navíc koreluje s rozsahem a lokalizací poškození mozkové tkáně (Annegers a kol., 1998; Hesdorffer a kol., 1998). Na rozvoji spontánních záchvatů se nezanedbatelně podílí i genetická predispozice a epigenetické mechanismy (Miller a kol., 2010; Wagner a kol., 2010). Genetické mutace mohou způsobit strukturální a funkční alterace klíčových proteinů včetně presynaptických komplexů (Toader a kol., 2013), alterace  $Ca^{++}$ ,  $Na^{+}$  a  $K^{+}$  kanálů (D'Adamo a kol., 2013).

Proces epileptogeneze je v posledních letech terčem intenzivního výzkumu. Možnosti farmakologického ovlivnění epileptických záchvatů se opírají o antikonvulzivní terapii, jejíž hlavním účinkem je zabránit šíření vzruchu. Mezi základní mechanismy účinku v současné době nejužívanějších antiepileptik (AED) patří blokáda přenosu excitačního neurotransmiteru působením přes napěťově řízené  $Na^{+}$  (CBZ, ESL, LTG, OXC, LCM, VPA, ZNS, TPM) či  $Ca^{+}$  kanály (GBP, PGB), blokáda receptorů excitačních aminokyselin (PER, TPM), posílením účinku inhibičních neurotransmiterů (BZD, CZP, TPM), inhibicí enzymu karboanhydrázy (TPM, ZNS). Současné trendy v ovlivnění epileptických záchvatů směřují k důkladnému porozumění mechanismů, které v budoucnosti vedou k rozvoji prvního neprovokovaného záchvatu. Včasným rozpoznáním rizikových faktorů a jejich důkladným porozuměním může v budoucnosti představovat vývoj nových možností léčby, vedoucí k eliminaci rizika rozvoje prvního epileptického záchvatu. S tímto cílem je zásadní studium vyvolávajícího inzultu a co nejdůkladnější poznání změn probíhajících v období od jeho vyvolání k rozvoji spontánních záchvatů za účelem možného terapeutického ovlivnění. Jedním z nejčastějších modelů užívaných ke studiu mechanismů vedoucích k rozvoji spontánních záchvatů je model SE.

## 1.2. Status epilepticus

Status epilepticus (SE) představuje jeden z nejčastějších život ohrožujících stavů v dětské neurologii s roční incidencí kolem 20/100 000 jedinců; téměř 50 % všech případů SE se manifestuje do 2 let věku dítěte (Lothman a kol., 1993). Je definován jako stav, který je

důsledkem selhání mechanismů nezbytných k zastavení záchvatové aktivity a/nebo iniciace mechanismů vedoucích k prolongovaným záchvatům (Trinka a kol., 2015). Je spojen s výraznou morbiditou a mortalitou, přičemž nejčastější pozdní komplikací proběhlého SE je rozvoj spontánních epileptických záchvatů v budoucnosti (Cowan, 2002). V případě dětské populace dochází k rozvoji epilepsie až u 74 % procent pacientů s anamnézou konvulzivního SE do 2 let věku (Raspall-Chaure a kol., 2006).

Patofyziologickým podkladem SE je selhání cerebrálních mechanismů, které se podílejí na ukončení jednotlivých záchvatů a navození refrakterní periody, během níž nemůže vzniknout další záchvat. SE, který proběhl v časném vývojovém období, má negativní důsledky na citlivost některých neurotransmitterových systémů (GABA, glutamát, acetylcholin, adenosin), vede ke změně propustnosti hematoencefalické bariéry, aktivaci zánětlivé odpovědi, gliových buněk a reparačních procesů (neurogeneze, angiogeneze). Následkem těchto změn dochází ke ztrátě neuronů a to zejména GABAergních interneuronů hipokampu (McNamara a kol., 2006). Nedostatek inhibičních synapsí, který vede ke zvýšené excitabilitě dalších neuronů, se tak významně uplatňuje v patogenezi epilepsie. Vlivem iniciálního inzultu v těchto strukturách kromě úbytku inhibičních GABAergních interneuronů a snížení koncentrace kyseliny gamma aminomáselné (GABA) dochází i ke zvýšení koncentrace glutamátu, snížení senzitivity GABAA receptorů, aktivaci iono- i metabotropních glutamatergních receptorů a např. i zvýšení koncentrace  $Ca^{++}$  iontů (McNamara a kol., 2006). Struktury mozku, které jsou nejvíce náchylné k rozvoji prolongovaných záchvatů až SE a mohou podléhat epileptogenezi, zahrnují zejména struktury temporálního laloku – hipokampus, amygdalu, entorhinální a piriformní kortex (Aroniadou-Anderjaska a kol., 2008). Recentní studie zabývající se studiem mechanismů epileptogeneze poukazují na významnou roli astrocytů. Úbytek neuronů vlivem iniciálního inzultu je v hipokampu nahrazen zvýšenou proliferací astrocytů a utvářením gliové jizvy (Boison, 2008a). Astroglíóza neboli patologická proliferace a hypertrofie astrocytů hraje zásadní roli v rozvoji epilepsie. Změny v zastoupení a funkci astrocytů se projevují narušením složení extracelulárního prostředí. Astrocyty se mohou podílet na regulaci synaptické transmise prostřednictvím ovlivnění metabolismu  $Ca^{++}$  iontů a uvolňováním glutamátu (Duffy a kol., 1999; Hallasa a kol., 2007). SE v období raného vývoje mozku představuje jeden s nejvýznamějších rizikových faktorů k rozvoji temporální epilepsie (Gordon a kol., 2012; Patterson a kol., 2014).

### 1.3. Temporální epilepsie

Temporální epilepsie (TLE) je označením pro elektroklinický syndrom, pro který je charakteristická lokalizace epileptogenního fokusu neboli zóny začátku záchvatu v temporálním laloku ve strukturách limbického systému, zejména hipokampu, entorhinálním kortexu a amygdale (Bartolomei a kol., 2005). TLE je nejčastějším typem fokální epilepsie dospělých. Až třetina všech případů TLE není uspokojivě léčena pomocí dosavadní antiepileptické medicíny a je vyžadována chirurgická léčba (Choi a kol., 2008).

Rozvoji TLE často předchází iniciální inzult (Mathern a kol., 2002). Období mezi iniciálním inzultem a rozvojem prvního epileptického záchvatu se označuje latentní perioda, která je obdobím změn vyúsťujících v hyperexcitabilitu struktur temporálního laloku (Mathern a kol., 2002). TLE je častým typem epilepsie u dětí, adolescentů i dospělých, která je často asociována se strukturálním poškozením mozku, meziální temporální sklerózou (O'Brien a kol., 1996). Meziální temporální skleróza je charakterizována poškozením hipokampu, úbytkem neuronů včetně atrofie a gliózy, a to zejména jako následku iniciálního inzultu (např. SE, febrilní záchvaty, infekce atd.).

TLE může být vyvolána u animálních modelů různými typy poškození mozku včetně modelu SE. Podobným mechanismem poškození mozku může dojít k rozvoji TLE i u lidí.

### 1.4. Animální modely pro studium epileptogeneze u temporální epilepsie

Komplexní mechanismy epileptogeneze nelze studovat jen pomocí poznatků z klinických dat. V epileptologickém výzkumu se využívá široké škály animálních modelů. Experimentální modely jsou nepostradatelné pro studium podkladových mechanismů podmiňujících vznik, propagaci a ukončení epileptických záchvatů, krátkodobých i dlouhodobých následků záchvatů, ale i pro studium nových antiepileptik. Neuropatologické změny, které vedou k rozvoji TLE u pacientů s anamnézou SE a animálních modelů s využitím SE, jsou velmi podobné.

Podrobná znalost mechanismů navozených iniciálním inzultem vedoucí k rozvoji elektrografického i klinického epileptického záchvatu je zásadní k vytvoření správných terapeutických postupů. Jednotlivé mechanismy se rovněž mohou charakterem iniciálního inzultu měnit. Jedním z nejvíce prostudovaných iniciálních insultů je SE. SE může být vyvolán různými formami aplikace příslušné substance či elektrickým proudem pomocí zavedených

elektrod. Mezi nejčastěji používané látky k navození SE patří pentylentetrazol, kompetitivní antagonist GABAA receptorů bikukulin, agonista ionotropních glutamátových kainátových receptorů kainát, inhalační chemokonvulzivum fluorothyl a zejména pilokarpin.

#### **1.4.1. Pilokarpinový model epileptického statu**

Pilokarpinem navozený SE je jedním z nejužívanějších modelů užívaných v epileptologii. Pilokarpinový model SE byl v mnoha studiích použit k analýze molekulárních, patofyziologických i anatomických změn, které mohou sloužit jako predispozice ve vývoji a rozvoji epilepsie. Pilokarpin je neselektivní cholinergní agonista muskarinových receptorů, který svou funkci v CNS zprostředkovává prostřednictvím vazby na M1 a M2 muskarinové receptory (Hoffman a kol., 2006). Ačkoliv mechanismus účinku pilokarpinu v CNS není dopodrobna prostudován, je prokázáno, že aktivace M1 receptorů vede k inicializaci kaskády dějů vedoucí k hyperexcitabilitě, apoptóze a remodelaci neuronálních sítí limbického systému včetně hipokampu (Cavalheiro a kol., 1996). Mozková tkáň zvířat vystavených působení pilokarpinu vykazuje v histopatologických řezech změny zejména v hipokampu, amygdale, thalamu, olfaktorickém bulbu i v částech neocortexu (Turski a kol., 1983a). Apoptóza neuronů byla popsána i v subiculu (Knopp a kol., 2005) a entorhinálním cortexu (Wozny a kol., 2005). Reorganizace neuronálních sítí je úzce spojena s úbytkem neuronů (Lehmann a kol., 2001), statem indukovaným tzv. sprouting (Scharfman a kol., 2003), tvorbou atypických dendritů (Silva a kol., 2002). Jak se tyto změny podílí na procesu epileptogeneze je dále předmětem intenzivního studia.

Důsledky působení pilokarpinu závisí nejen na dávce užití, ale zejména na trvání jeho působení. Užití pilokarpinu ve vysokých dávkách je spojeno s výraznou mortalitou. Dosažení stejného účinku a úrovně postižení za současného snížení mortality je umožněno prostřednictvím lithium chloridu (Clifford a kol., 1987).

S rostoucí dobou působení pilocarpinu stoupá rozsah strukturálních změn a tím i riziko rozvoje spontánních záchvatů (Lemos a Cavalheiro, 1995). Převažují studie, ve kterých je míra strukturálních změn, zejména úbytek neuronů, spojena s vyšším rizikem rozvoje epilepsie (Muller a kol., 2009; Furtado a kol., 2011). Nicméně byl popsán i rozvoj epilepsie bez stukturálních změn po indukovaném pilokarpinovém SE (Baram a kol., 2011). Tuto možnost podporuje i fakt, že i přes farmakologickou inhibici úbytku neuronů po SE došlo k rozvoji epileptických záchvatů. V posledních letech je mnoha laboratořemi využíván jako

model pro testování rezistence antiepileptické medikace (Hoffman a kol., 2006). Poprvé byl pilokarpinový SE představen jako model TLE v roce 1983 (Turski a kol., 1983). Pilokarpin vede k destruktivním změnám v různých oblastech mozku – např. thalamus, amygdala, hipokampus a neokortex (Biagini a kol., 2013). Strukturální změny, které jsou podkladem TLE, snižují možnost úspěšných terapeutických přístupů, což často činí nemoc refrakterní k současně užívané antikonvulzivní medikaci. Charakter změn a poškození mozkové tkáně u pacientů s TLE a pilokarpinového modelu SE nasvědčují, že patofyziologické změny v obou případech jsou velmi podobné (Margerison a Corsellis, 1966). Trvání a intenzita SE signifikantně koreluje s úbytkem nervových buněk, aktivací astrocytů a strukturální reorganizací (Löscher a kol., 2015).

Astroglíóza, tedy patologická proliferace a hypertrofie astrocytů způsobuje zvýšení excitability neuronů, která může nakonec vyústit v rozvoj spontánních epileptických záchvatů. Na rozvoji proepileptogenního stavu se mohou astrocyty podílet i změnami propustnosti hematoencefalické bariéry (Tian a kol., 2005) a regulací adenosintrifosfát (ATP) signalizační kaskády (Kumaria a kol., 2008). Astrocyty jsou hlavním zdrojem ATP, který je následně svým inhibičním působením významným způsobem zapojen do procesu geneze, propagace i ukončení epileptického záchvatu (Kumaria a kol., 2008). Astrocyty mohou uvolňovat ATP prostřednictvím regulace vezikulárního transportu (Pascual a kol., 2005). Extracelulární ATP se následně rozštěpí pomocí enzymatické kaskády ectonucleosidáz na adenosin (Cunha, 2001; Zimmermann, 2000). Presynaptické uvolnění ATP a jeho následné štěpení na adenosin představuje zásadní prvek synaptické transmise.

#### **1.4.2. Elektricky indukované SE modely a modely epileptických záchvatů**

Pro studium excitability nervových struktur se nejčastěji užívají modely přímé kortikální stimulace. Výhodou užití přímé kortikální stimulace je velmi nízká mortalita a vysoká reprodukovatelnost, jelikož působení vyvolávajícího faktoru lze opakovat, aniž by docházelo ke strukturální přestavbě mozkové tkáně. Epileptiformní následné výboje (afterdischarges = ADs) sloužící ke studiu fokálních záchvatů vycházejících z temporálního laloku jsou vyvolány stimulací limbických struktur (Kandratavicius a kol., 2014; Maresova a Mares, 1987; Velisek and Mares, 2004). Nejčastějším z nich jsou hipokampální ADs, které reprezentují model fokálních epileptických záchvatů s poruchou vědomí s automatizmy, které jsou patognomické pro temporální epilepsii (Gorter a kol., 2016). Hipokampus patří mezi

velmi vulnerabilní struktury mozku, jehož elektrickou stimulací dochází ke generování ADs i u zdravého mozku (Gollwitzer a kol., 2018). Délka trvání ADs, práh k vyvolání následných výbojů, morfologie výbojů patří mezi základní parametry, které se sledují nejen v experimentálních podmínkách, ale i u pacientů s implantovanými elektrodami (Gollwitzer a kol., 2018). Bylo prokázáno, že v místě epileptogenního ložiska je trvání ADs delší a práh k jejich vyvolání pomocí kortikální stimulace nižší než v místech, které epileptiformní aktivitu negenerují (Liu a kol., 2017).

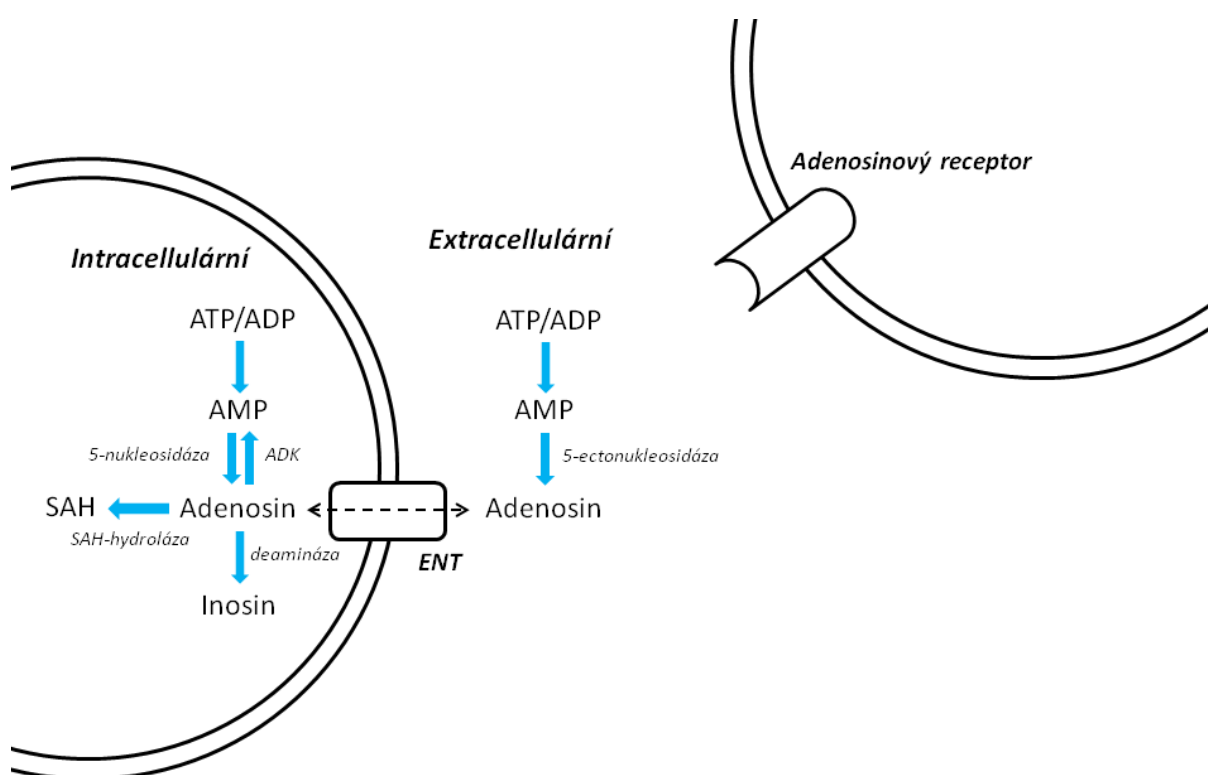
### **1.5. Adenosin a jeho role v epileptogenezi**

Pro všechny žijící organismy je nezastupitelná existence mechanismů, které zajišťují svým buňkám dostatečný zdroj energie. Ribonukleosid adenosin je endogenní neuromodulátor synaptické transmise uplatňující se v řadě fyziologických i patofyziologických procesů – např. regulace průtoku krve, regulace glykémie, lipolýzy, konzumpce kyslíku (Fredholm a kol., 2005a). Významným podílem se uplatňuje v regulaci excitability mozku (Dunwiddie, 1980; Fredholm a kol., 2005b), proto jakékoliv narušení metabolismu adenosinu může vést k rozvoji širokého spektra neurologických a/nebo psychiatrických onemocnění.

Adenosin se významně zapojuje do regulace homeostázy ovlivněním signalizačních kaskád a neurochemických substrátů hrajících roli v etiopatogenezi epilepsie. ATP uvolněné z astrocytů a nervových buněk a jeho následná konverze na adenosin je hlavním zdrojem extracelulárního adenosinu. Adenosin a jiná nukleosidová analoga jsou hydrofilní a proto neprostupují přes plasmatické membrány. Do intracelulárního prostoru je adenosin distribuován pomocí nukleosidových transportérů (Cass a kol., 1999). Nukleosidové transportéry jsou dělené do dvou skupin – koncentrační nukleosidové transportéry (CNT – concentrative nucleoside transporters) spojené s gradientem  $\text{Na}^+$  a ekvilibrační (ENT – equilibrative nucleoside transporters). Za fyziologických podmínek ENT hrají dominantní roli v udržování koncentrace intra- i extracelulárního adenosinu v mozku. Intracelulární metabolismus adenosinu je ovlivňován tímto řízeným influxem adenosinu a nepřímo i koncentrací extracelulárního adenosinu.

Při poklesu ATP dochází k vzestupu koncentrace adenosinu, který mechanismem zpětné vazby vede ke zpomalení metabolismu fyziologických dějů za účelem úspory energie (Newby a kol., 1985). Adenosin je strukturální součástí nejen energetických metabolitů AMP,

ADP a ATP, ale rovněž integrální součástí RNA, koenzymů NAD, FAD a sekundárních poslů (např. cAMP). Zdroj adenosinu v extracelulárním prostoru je zajišťován pomocí nukleosidových transportérů, štěpením z ATP pomocí ectonukleosidás a rozpadem cAMP (Dunwiddie a Masino, 2001). V důsledku úzké vazby k energetickému metabolismu buňky je považován za jeden z klíčových regulátorů energetické homeostázy (Obr. 1). Svoji funkci adenosin zprostředkovává prostřednictvím vazby vysokoafinitních inhibičních A1 (A1R) a excitačních A2A adenosinových receptorů (A2AR) a/nebo nízkoafinitních A2B (A2BR) a A3 adenosinových (A3R) receptorů (Zhou a kol., 1992; Dunwiddie a Masino, 2001).



**Obr. 1. Metabolismus adenosinu** | AMP – adenosinmonofosfát; ATP/ADP – adenosintri/difosfát; ADK – adenosinkináza; ENT – ekvilibrační nukleosidový transportér; SAH – S-adenosylhomocystein

### 1.5.1. Adenosinové receptory

Inhibiční účinek adenosinu v centrální nervové soustavě je zprostředkován přes působení A1R. A1R mají ubikviterní zastoupení v CNS s nejvyšší koncentrací v hipokampu a neokortexu, oproti tomu A2R má nejvyšší zastoupení ve striatu (Rivkees a kol., 1995a). A1R jsou lokalizovány jak pre- i postsynapticky. A1R patří do skupiny metabotropních receptorů



spřažených s G proteiny (GPCR) – inhibičními  $G_i$  a  $G_o$ . Jejich vazbou dochází k inhibici adenylylcyklázy aktivující napětově řízené  $K^+$  kanály, dále k inhibici N-, P-, a Q-typu  $Ca^{++}$  kanálů a aktivaci fosfolipázy C (Fredholm, 2005). Aktivací presynaptických A1R dochází k inhibici uvolňování excitační aminokyseliny glutamátu. Výsledkem aktivace A1R je antikonvulzivní účinek projevující se potlačením záchvatové aktivity (Boison, 2007a) a účinek neuroprotektivní (Cunha, 2005). Kromě synaptického účinku A1R je popisován i extrasynaptický efekt umožňující ovlivnění metabolismu mozkové tkáně (Haberg a kol., 2000), kontrolu funkce astrocytů (van Calcar a Biber, 2005). Tonická aktivace A1R působením endogenního adenosinu je považována za jeden z možných mechanismů inhibičního účinku i na vzdálenosti větší než působení monosynaptické, principem umožňujícím tzv. heterosynaptickou depresi (Manzoni, 1994). Ve strukturách s nejvyšší expresí A1R, např. hipokampus a neokortex (Fredholm, 2001) tak může prostřednictvím těchto receptorů docházet k modulaci šíření epileptické aktivity (Fedele, 2006; Kochanek, 2006).

A2R jsou na rozdíl od A1R spřaženy s aktivačními G proteiny -  $G_s$  a  $G_{olf}$  (Dunwiddie a Masino, 2001) a zprostředkovávají zejména excitační účinek v různých částech mozku včetně hipokampu (Fredholm, 2001). Uplatňují se zejména v neuroprotekcii (Cunha, 2005), prevenci apoptózy (Silva, 2007). A2A receptory hrají klíčovou roli v modulaci účinku ostatních neurotransmiterů a neuromodulátorů (Sebastiao a Ribeiro, 2000). A2A receptory jsou lokalizovány výlučně na úrovni synapse (Ferre, 2005).

Rozdíly v afinitě receptorů a vysoce determinovaná prostorová distribuce v jednotlivých strukturách CNS zajišťuje vysoký stupeň modulace nervové aktivity včetně jiných neurotransmiterů a modulátorů (Cunha-Reis a kol., 2007; Poulsen a Quinn, 1998; Rees a kol., 2003; Sebastiao a Ribeiro, 2000; Studer a kol., 2006; Yu a kol., 1998) (Obr. 2). A1R i A2AR jsou součástí zejména glutamaterních synapsí (Rebola a kol., 2005a; Rebola a kol., 2005b), ale jejich přítomnost byla rovněž prokázána i v GABAergních synapsích (Cunha a Ribeiro, 2000). A2BR a A3R jsou zastoupeny v axonálních zakončeních, schwannových buňkách a myocytech (Garcia a kol., 2013).

Nedávné poznatky poukazují na uplatnění adenosinových receptorů v ovlivnění prostupnosti hematoencefalické bariéry (HEB). HEB tvořená pevným spojením buněk endotelu kapilár, bazální membránou a astrocyty vytváří vysoce restriktivní bariéru regulující pomocí vysoce selektivní pinocytózy, transcytózy a transportních systémů její permeabilitu. Po aplikaci agonistů A1R a A2AR dochází k přechodnému zvýšení permeability HEB pro

makromolekuly (např. imunoglobuliny) po dobu působení daného analoga odpovídající přibližně poločas jeho rozpadu (Carman a kol., 2011). Ačkoliv HEB dominuje zejména protektivní úlohou, může její omezená permeabilita představovat překážku v dostupnosti léčiva pro léčbu onemocnění CNS včetně epilepsie.

<b>Stupeň exprese v CNS</b>	<b>A1 receptor</b>	<b>Adenosin kináza</b>
Vysoký	neokortex, hipokampus, mozeček, mícha (Poulsen a Quinn, 1998)	neocortex, hipokampus (Studer a kol., 2006)
Střední	bazální ganglia, diencephalon (Poulsen a Quinn, 1998)	bazální ganglia, thalamus (Studer a kol., 2006)
Nízký	hypofýza (Yu a kol., 1998)	hypofýza (Rees a kol., 2003)

**Obr. 2. Stupeň exprese A1 receptoru a adenosinkinázy v CNS v dospělosti | Detaily uvnitř obrázku.**

### 1.5.2. Adenosinkináza

Adenosinkináza (ADK) je klíčový enzym, který fosforyluje adenosin na 5-adenosinmonofosfát (AMP), tím ovlivňuje a reguluje extracelulární koncentraci adenosinu v mozku (Boison, 2006; Boison, 2008b) (Obr. 1). Adosindeamináza nebo S-adenosylhomocystein (SAH) hydroláza hrají výrazně menší roli v regulaci adenosinu (Boison, 2006). Jako akutní odpověď na infarkt (SE, ischemie, trauma CNS) podléhá ADK rychlému poklesu exprese (downregulace) vedoucí ke zvýšení koncentrace adenosinu, tím se zesiluje i neuroprotektivní účinek adenosinu působícího přes A1R.

V případě probíhajícího prolongovaného záchvatu či epileptického statu dochází k downregulaci ADK do 2 hodin (Gouder a kol., 2004), k úplné obnově exprese ADK dochází po dalších 24 hodinách (Pignataro a kol., 2007). V případě opakovaného vystavení vyvolávajícího faktoru (např. recidivující epileptické záchvaty) dochází naopak dlouhodobě ke zvyšování exprese (upregulaci) ADK (Gouder a kol., 2003). Tyto poznatky nasvědčují, že upregulace ADK v epileptickém mozku, vyznačovaném repetitivními epileptickými záchvaty, je součástí komplexního procesu epileptogeneze, při kterém dochází ke snížení působení

adenosinu na A1R. Za experimentálních podmínek bylo současně s upregulací ADK odhaleno snížení exprese A1R (Ekonomou a kol., 2000; Rebola a kol., 2005b). Astroglióza, která je navozena působením infarktu vede ke zvýšené expresi ADK. Výhradní exprese ADK nervovými buňkami v průběhu vyvíjejícího se mozku může být příčinou zvýšené vnímavosti k epileptickým záchvatům (Studer a kol., 2006). Exprese ADK je u dospělého mozku nejvyšší v neokortexu a hipokampu (Studer a kol., 2006) (Obr. 2). Avšak v důsledku působení stresových faktorů (např. epileptického záchvatu) se může měnit. Zvýšení exprese ADK prokazatelně vedlo v experimentálních podmínkách ke spuštění epileptických záchvatů (Theofilas a kol., 2011). Naopak výsledkem inhibice či zablokováním exprese ADK je rapidní nárůst koncentrace extracelulárního adenosinu (Fedele a kol., 2004; Güttinger a kol., 2005; Huber a kol., 2002), zatímco overexprese ADK vede k redukci synaptické koncentrace adenosinu (Fedele a kol., 2005). Farmakologická inhibice ADK zvyšuje koncentraci adenosinu a tím snižuje nervovou excitabilitu prostřednictvím působení na A1R v hipokampu (Pak a kol., 1994). Jelikož intracelulární koncentrace ATP je 100000x vyšší než koncentrace adenosinu (Fredholm a kol., 2005a), modulace ADK vede k rychlým a významným změnám v koncentraci adenosinu, ale neovlivňuje natolik koncentraci ATP. Zmnožení astrocytů pak vede ke zvýšené expresi ADK, zvýšené fosforylaci adenosinu a tím ke snížení jeho koncentrace (Aronica a kol., 2011). Těsně před ukončením záchvatu naopak hladina adenosinu roste, což může znamenat, že se výrazně podílí na jeho ukončení (Van Gompel a kol., 2014).

Ke konci minulého století byla prostřednictvím imunohistochemických studií prokázána přítomnost 2 isoform ADK (McNally a kol., 1997; Sychata a kol., 1996). Jedná se o formu ADK-L (long = 40,5 kDa) a ADK-S (short = 38,7 kDa). Obě isoformy jsou enzymaticky plně funkční a nevykazují žádné změny ve farmakokinetice (Sahin a kol., 2004). Jediným rozdílem je odlišnost v N-terminálním úseku, která je u ADK-L isoformy tvořena 20-21 AMK. Ty nahrazují v porovnání s ADK-S isoformou její 4 AMK v N-terminálním úseku. Od jejich objevení se dlouhou dobu předpokládalo, že přítomnost obou isoform je vázána na cytoplasmu (Sakowitz a kol., 2001). Recentní práce však prokázaly výhradní zastoupení ADK-L isoformy v buněčném jádře, zatímco přítomnost ADK-S isoformy je výlučně vázána na cytoplasmu (Cui a kol., 2009). Rozdíly v celulózní lokalizaci jednotlivých isoform ADK napovídají o jejich rozdílné funkci ve fyziologických procesech. Kromě nezastupitelné role v metabolismu purinů hrají rozdílnou roli v transmetylačních reakcích (Boison a kol., 2008a). Přítomnost isoformy ADK-L v buněčném jádře poukazuje na její

regulační funkci v metylaci DNA. Na rozdíl od isoformy ADK-S, která se díky své lokalizaci v cytoplasmě podílí na regulaci extracelulární koncentrace adenosinu (Cui a kol., 2009).

### 1.5.3. Ontogenetické aspekty adenosinergního systému v CNS

Postnatální změny v expresi adenosinových receptorů byly doposud popsány v několika studiích. Zvyšující se exprese A1R i A2AR koreluje s progresivní maturací mozkové tkáně v průběhu vývoje (Rivkees a kol., 1995b). Densita A1R je nejvyšší od 10. do 40. dne vývoje a poté postupně klesá (Daval a kol., 1991a; Daval a kol., 1991b). Zvýšená koncentrace extracelulárního adenosinu navíc může tuto densitu adenosinových receptorů přechodně zvyšovat (Doriat a kol., 1996). Strukturální charakteristika A1R i A2AR však nemusí korelovat s funkcí receptorů, navíc působením vyvolávajícího inzultu může podléhat změnám oproti přirozenému vývoji. Při narození je pomocí *in situ hybridizace* zjištěna přítomnost A1R zejména v subkortikálních strukturách (Marangos a kol., 1982; Geiger a kol., 1984), avšak afinita a vazebná kapacita A1R se v průběhu vývoje snižuje (Cunha a kol., 1995).

ADK je exkluzivně exprimována ve vyzrálém dospělém mozku pouze astrocyty (Studer a kol., 2006) s výjimkou neuronů olfaktorického bulbu, kde exprese přetrvává až do dospělosti (Gouder a kol., 2004). V období postnatálním je ADK exprimována pouze nervovými buňkami, avšak v průběhu další maturace dochází k zastavení exprese v nervových buňkách a dochází k převzetí exprese ADK výhradně ve prospěch astrocytů. V mozku laboratorního potkana dochází k této změně v průběhu prvních 3 týdnů vývoje (Studer a kol., 1996).

Nezralý mozek je často náchylnější k rozvoji záchvatové aktivity, než je tomu u mozku dospělého jedince (Moshe, 2010). Rozdíly v měnící se excitabilitě v průběhu vývoje byly popsány i mezi jednotlivými strukturami (Abdelmalik a kol., 2005). Vývojové změny A1R a ADK mohou být vysvětlením pro věkově vázanou změnu excitability hipokampu, nicméně doposud nebyly vývojové změny exprese A1R a isoform ADK korelovány se změnami excitability hipokampu.

### 1.5.4. Farmakologické možnosti ovlivnění adenosinergního systému v epileptogenezi

Obecným cílem vývoje antikonvulzivní terapie je nejen vymizení či významná eliminace epileptických záchvatů, ale i redukce nežádoucích účinků. V současnosti ale dominuje snaha o vytvoření účinné terapie, která by výrazně omezila i pravděpodobnost rozvoje prvního epileptického záchvatu po prodělaném iniciálním inzultu (např. trauma CNS, SE atd.).

Zatímco selektivní antagonisté A1R mají silný prokonvulzivní účinek (Etherington a Frenguelli, 2004), A1R selektivní agonisté jako např. 2-chloro-N6-cyclopentyladenosin (CCPA) působí antikonvulzivně. A1R agonisté tedy vedou k potlačení záchvatové aktivity mozku (Huber a kol., 2002; Monopoli a kol., 1994). V některých modelech farmakorezistentní epilepsie, při kterých selhalo užití doposud užívaných antikonvulziv, se aplikace agonistů A1R jeví z dosavadních výsledků jako možnost potenciálního terapeutického snížení excitability mozku (Gouder a kol., 2003).

V procesu epileptogeneze se mohou uplatňovat i A3R. Aktivace A3R receptorů na axonálních zakončeních v hipokampu může vést k desenzitizaci A1R (Lopes a kol., 2003). V experimentálních podmínkách bylo zjištěno, že při repetitivní stimulaci synapticky uvolněný ATP degradovaný na adenosin není asociovaný s inhibičními A1R ale s naopak s excitačními A2AR, jelikož afinita a vazebná kapacita A2AR převažuje nad A1R (Cunha a kol., 1996). Synaptická aktivace A2AR, která je výsledkem recidivujících epileptických záchvatů následně vede k downregulaci A1R (Lopes a kol., 1999; Ekonomou a kol., 2000; Glass a kol., 1996). Aktivace A2AR tak vede k prolongaci epileptické záchvatové aktivity mozku. V několika studiích však bylo aktivací A2AR dosaženo i antikonvulzivního účinku (De Sarro a kol., 1999; Huber a kol., 2002; Malhorta a Gupta; 1997).

Na počátku 21. století se v preklinických studiích zkoumal účinek inhibitorů ADK k ovlivnění epileptických záchvatů (McGaraughty a kol., 2005; Kowaluk a Jarvis, 2000). Aplikace inhibitoru ADK vychází z předpokladu, že inhibice ADK vede ke zvýšené aktivaci A1R prostřednictvím vyšší dostupnosti adenosinu. V průběhu posledních 30 let došlo k identifikaci řady inhibitorů ADK blokující zejména ADK-S isoformu. ADK-S isoforma se díky své cytoplasmatické lokalizaci považovala za vhodnější cíl k regulaci koncentrace adenosinu a tím ovlivnění excitability mozku. Avšak dosavadní využití a další studium inhibitorů isoformy ADK-S je omezeno pro rozvoj významných nežádoucích účinků, zejména pro hepatotoxicitu a nežádoucí kardiovaskulární účinky (Boison, 2006). Studium isoformy ADK-L bylo recentně zjištěno, že zvýšená exprese ADK-L vede ke zvýšení metylace DNA a ta

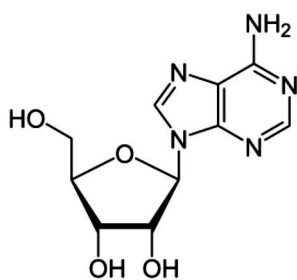
se rovněž může podílet na manifestaci epileptických záchvatů (Williams-Karnesky a kol., 2013). Jako slibný se jeví vývoj inhibitorů ADK s vysokou specificitou pro isoformu ADK-L pro potenciálně nižší riziko rozvoje nežádoucích účinků (Toti a kol., 2016). Nonselektivní inhibitor ADK 5-ITU, jehož účinek byl studován i v této disertační práci, vede k výrazné eliminaci rizika rozvoje epilepsie po iniciálním inzultu, konkrétně indukovaném SE (Sandau a kol., 2020). Nonselektivní inhibitory ADK tak mohou v budoucnosti hrát nezastupitelnou roli v prevenci rozvoje epileptických záchvatů.

5-iodotubercidin (5-ITU) je vysoce afinitní kompetitivní inhibitor ADK se střední inhibiční koncentrací IC<sub>50</sub> 26nM (Wotring a kol., 1979; Ugarkar a kol., 2000). Kromě inhibice ADK je popsán jeho inhibiční účinek na nukleosidový transportér, inzulinový receptor tyrozin kinázy, fosforylkinázy atd. (Ugarkar a kol. 2000). I přes mnohaletou znalost se v posledních letech 5-ITU stal terčem intenzivního výzkumu nejen v oblasti neurologie (Boison a kol., 2013), ale v budoucnosti by mohl nabídnout své uplatnění v oboru kardiologie (Peart a kol., 2005), dermatologie (Kim a kol., 2017), onkologie (Zhang a kol., 2013) a infektologie (Zhao a kol., 2022) (Obr. 3).

CCPA je vysoce selektivní lipofilní kompetitivní agonista adenosinových A1R. CCPA je doposud považován za jeden z nejvíce selektivních agonistů A1R (Capellaci a kol., 2005). Je prokázáno, že afinita CCPA (K<sub>i</sub> value of 1.8 nM) je 2166x větší než pro receptor A2A (Franchetti a kol., 1998). Proto je vhodným kandidátem ke studiu role adenosinových A1R v širokém spektru neurologických chorob včetně epileptologie (Hamil a kol., 2012; Shi a kol., 2021). Byl prokázán protektivní vliv CCPA, který výrazně snižoval riziko progresu opakovaných záchvatů do rozvoje epileptického statu (Hamil a kol., 2012) (Obr. 3).

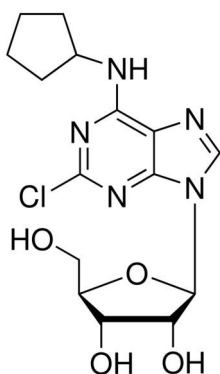
Antikonvulzivní účinek agonistů A1R a inhibitorů ADK v hipokampu byl demonstrován pouze u dospělých jedinců (Ault a Wang, 1986; Boison, 2008b), doposud jejich účinek nebyl studován v jakýchkoliv fázích vývoje mozku.

### Adenosin

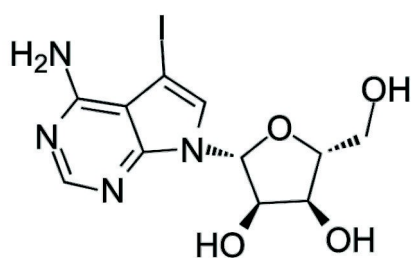


Obr. 3. Molekula adenosinu, 2-chloro-N6-cyclopentyladenosinu (CCPA) a 5-iodotubercidinu (5-ITU)

### CCPA



### 5-ITU



## 1. CÍLE A HYPOTÉZY

Následky SE prodělaného v časně fázi ontogenetického vývoje mozku na jeho excitabilitu (zejména excitabilitu hipokampu) a jeho podíl na rozvoj epilepsie v budoucnosti představují hlavní cíl této disertační práce. Nové poznatky o změnách excitability hipokampu po chemicky indukovaném iniciálním inzultu (LiCl-pilokarpinový SE) a bez jeho působení v průběhu ontogeneze, objasnění úlohy adenosinergního systému (zejména ADK a A1R) v průběhu jednotlivých stádiích ontogeneze by mohly přispět k podrobnějšímu vysvětlení procesů epileptogeneze. Přínosem práce by mohlo být stanovení a monitorace nových podkladových mechanismů (zejména zastoupení receptorů a funkce enzymů) epileptogeneze, které by vedlo k preventivním opatřením zabraňujícím budoucímu rozvoji epilepsie u pacientů po prodělaném SE.

Adenosin je modulátor neuronální excitability v experimentálních modelech i u lidí (Fredholm a kol., 2005a; Fredholm a kol., 2005b), vazbou na adenosinové receptory zajišťuje prokazatelný antikonvulzivní a neuroprotektivní účinek (Boison, 2005; Cunha, 2005). Vývojové změny A1R nebyly prozatím podrobně popsány, předchozí práce se zaměřovaly jen na měnící se zastoupení receptorů v průběhu ontogeneze, ale poznatky o jejich funkci doposud nejsou známy. Vývoj A1R a možnost jeho farmakologického ovlivnění jsou předmětem výzkumu této disertační práce.

Navození SE u nezralého, vyvíjejícího se mozku je doposud jen velmi okrajově objasněno. Řada studií a získaných dat o patofyziologických změnách vyvolaných SE je popsána jen u dospělé populace. Změny excitability mozku v průběhu přirozeného vývoje a po indukovaném SE a následné farmakologické ovlivnění užitím inhibitoru ADK by mohly být přínosem pro vývoj nových možností léčby epilepsie. Cílem plánovaných pokusů disertační práce bylo studovat změny ADK, které se odehrávají po iniciálním inzultu a farmakologickým zásahem cíleným na ADK ovlivnit excitabilitu hipokampu.

***Hypotéza 1: Role adenosinových receptorů A1 uplatňujících se v účincích adenosinu se v průběhu vývoje mozku mění a tím výrazně zasahuje do vývoje excitability hipokampu***

***Hypotéza 2: Cíleným farmakologickým ovlivněním A1R lze excitabilitu hipokampu modulovat, avšak účinek se v průběhu ontogenetického vývoje mozku mění***

***Hypotéza 3: Změny v zastoupení a funkci enzymu ADK a jeho isoform mohou být***



*jedním z mechanismů epileptogeneze v nezralém mozku po proběhlém SE*

*Hypotéza 4: Inhibice ADK může představovat účinnou léčbu zvýšené excitability hipokampu po vyvolaném SE v různých fázích ontogenetického vývoje mozku*

## 2. VLASTNÍ POZOROVÁNÍ

### 3.1. Vývojový profil adenosinového receptoru A1 a isoform ADK

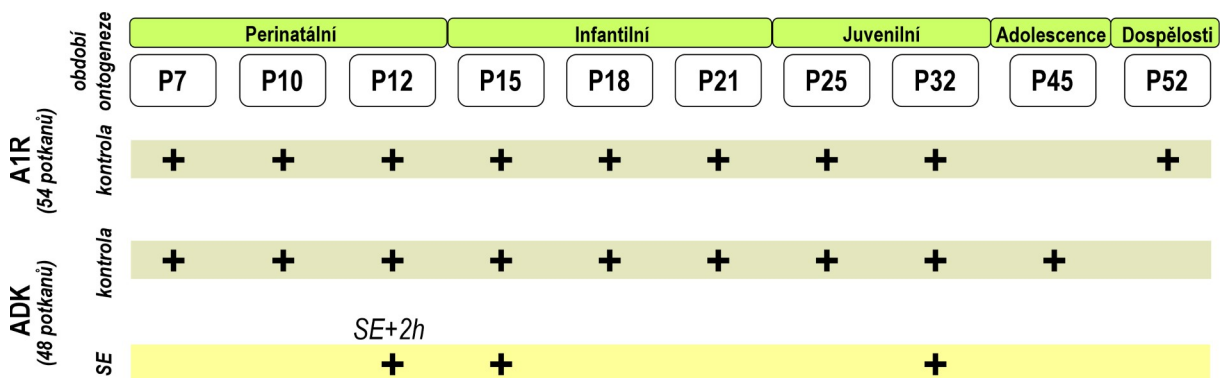
#### 3.1.1. Metodika

**Experimentální zvířata:** Veškeré procedury byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat (č. 246/1992 Sb., v pozdějším znění č. 501/2020 Sb.) a schváleny Etickou komisí Akademie Věd ČR. Pro účely tohoto experimentu bylo použito 102 samců potkana kmene Wistar v různém věkovém zastoupení odpovídající vývojovému profilu lidského mozku od novorozence po ranou dospělost. Jednalo se celkem o 4-6 zvířat pro každou věkovou skupinu – v postnatálních dnech P7, P10, P12, P15, P18, P25, P32, P45 a P52. Den narození je počítán jako P0. Odstavení zvířat od matky proběhlo 21. den. Laboratorní zvířata byla chována v podmínkách 12 hodinového cyklu světlo/tma, při pokojové teplotě 22 +/- 1 °C a s volným přístupem k vodě a potravě.

**Western blot:** Změny v zastoupení jednotlivých proteinů A1R (38 kDa) a obou isoform ADK – ADK-S (38,7 kDa) a ADK-L (40,5 kDa) byly analyzovány u naivních zvířat (kontrol) pomocí metody Western Blot (Obr. 4). Při dosažení příslušného věku byla zvířata usmrcena inhalační analgosedací v etherové komoře. Po navození respirační a oběhové zástavy byla zvířatům provedena okamžitá kraniektomie s následnou resekci obou dorzálních hipokampů, které byly zmrazeny při teplotě -80 °C. Kvůli nedostatečnému materiálu tkáně hipokampů z jednotlivých zvířat byly analyzovány směsné vzorky ze 4-6 potkanů. Vzorky hipokampů byly naředěny Laemmli pufrům v poměru 1:2 (0,125 M Tris pH 6,8, 20% glycerol, 10% β-merkaptoethanol, 4% SDS, 0,004% bromfenolová modř) a pro denaturaci zahřáty na teplotu 70 °C po dobu 20 min. Separace proběhla na 12% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE). Pro určení velikosti proteinů byl vedle vzorků přidán standard proteinu (Bio-Rad, Hercules, USA). Do jednotlivých jamek gelu byly nanášeny vzorky o objemu 20 μl a obsahu 10 μg proteinu. Poté, co proběhla elektroforéza (300 V, 270mA, 23 min), byly proteiny přeneseny pomocí aparátu Trans-Turbo (Bio-Rad, Hercules, USA) na nitrocelulózu membránu (Bio-Rad, Hercules, USA). Dále byly membrány blokovány po dobu 1 hod při pokojové teplotě 5% odtučněným mlékem v promývacím pufru TBS (Tris buffered saline). Přes noc byly membrány inkubovány s primární protilátkou anti-A1R (1:30000; PA1-041A, Thermo Fisher Scientific, Waltham,

USA) nebo anti-ADK (1:3000; PA5-27399, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) v 5% roztoku odtučněného mléka v promývacím pufrem při teplotě 6 °C. Poté byly 3 × 10 min promyty promývacím pufrem a inkubovány s odpovídající sekundární protilátkou (1:30000, #211-032-171, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) v 5% roztoku odtučněného mléka a promývacího pufrem při pokojové teplotě po dobu 1 hod. Po inkubaci byly membrány opět promyty 3 × 15 min promývacím pufrem. Jako nanášecí kontrola byla použita metoda Stain-free (Collela a kol., 2012). Detekce signálu probíhala pomocí chemiluminiscenčního substrátu (Supersignal WestFemto, #34096, Thermo Scientific) v přístroji ChemiDoc™ (Bio-Rad, Hercules, USA). Bloty byly kvantifikovány v normalizovaných jednotkách intenzity (NIU) pomocí programu ImageLab 6.1 (Bio-Rad, Hercules, USA). Poměry mezi isoformou ADK-L/-S byly kvantifikovány pomocí programu ImageJ software (verze 1.52, ImageJ, USA). Statistická analýza byla provedena minimálně z 2 opakování každého vzorku.

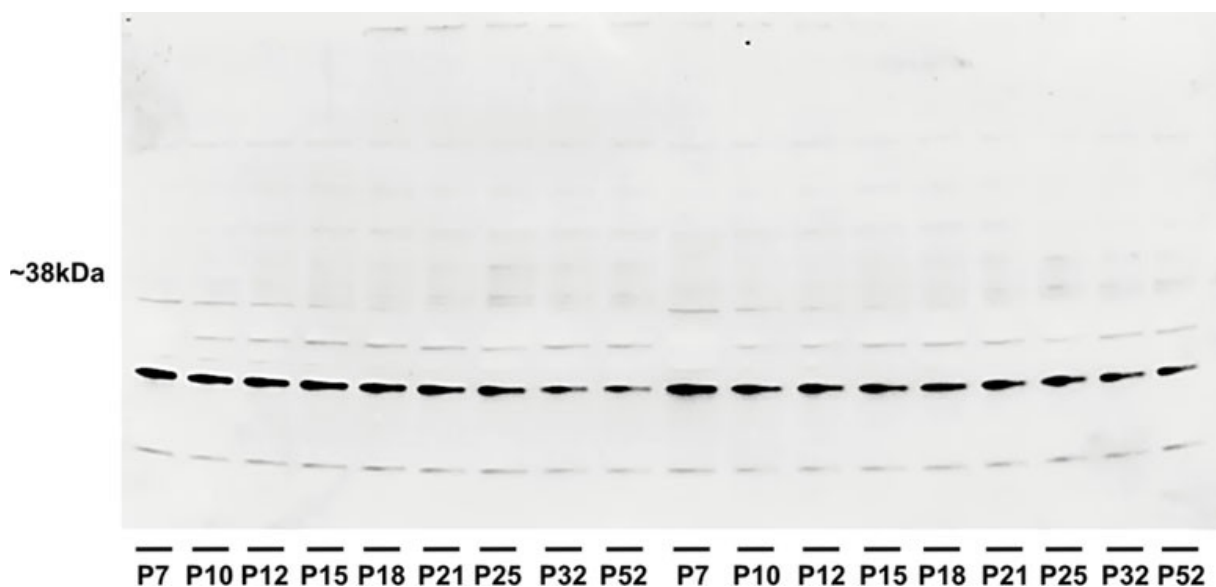
**Statistika:** Srovnání a grafická vizualizace NIU jednotlivých věkových skupin v zastoupení A1R a isoform ADK-L a ADK-S byla provedena programem Prism (verze 8.0, GraphPad, La Jolla, USA). Statistická analýza rozdílu mezi vývojovými skupinami byla provedena pomocí metody One-way ANOVA a následně mezi jednotlivými skupinami pomocí t-testu. Hladina významnosti byla vždy stanovena jako  $p < 0,05$  nebo  $p < 0,001$ .



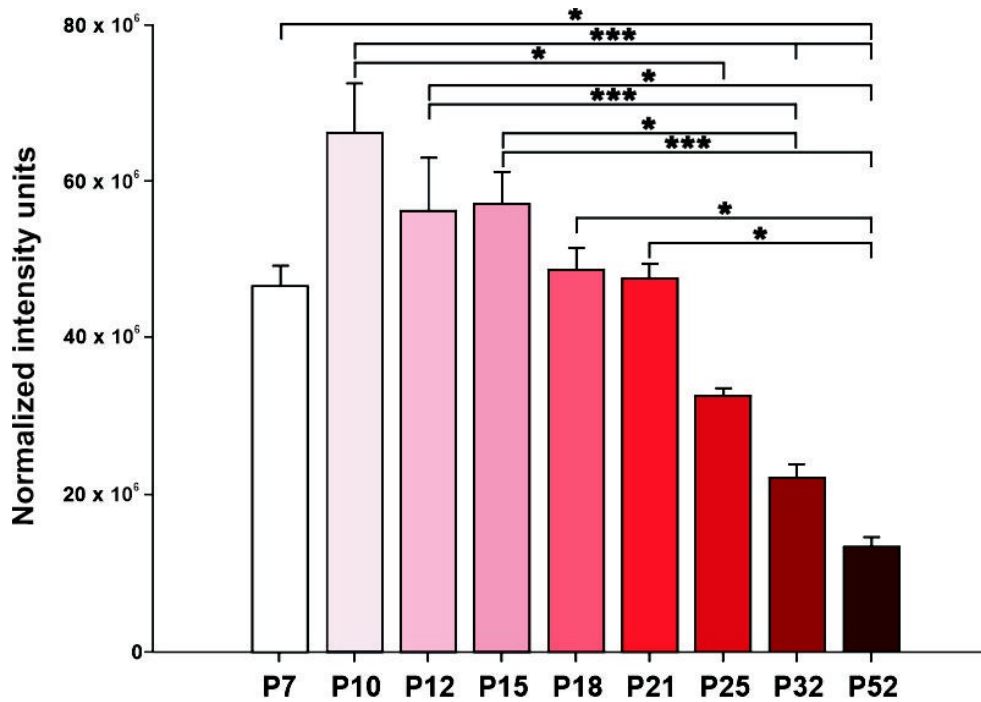
**Obr. 4. Western blot - schéma pokusu** | Zeshora dolů: období ontogeneze, Western blot (WB) A1R u kontrol, WB ADK u naivních kontrol a po epileptickém statu (SE). Detaily uvnitř obrázku.

### 3.1.2. Výsledky

Expresa A1R v hipokampu dosáhla svého maxima u 10-denních potkanů. V porovnání s 12-, 15- a 18-denními zvířaty došlo k poklesu exprese A1R, avšak signifikantního rozdílu v poklesu exprese bylo dosaženo u 25-denních ( $F = 8,9424$ ,  $p < 0,01$ ) a starších věkových skupin. Signifikantní snížení exprese bylo prokázáno i u 32-denních zvířat v porovnání s 12- a 15-denní věkovou skupinou ( $p < 0,01$ ) a u 52-denních zvířat v porovnání s 21-denní a mladšími skupinami ( $p < 0,01$ ) (Obr. 5 a 6).

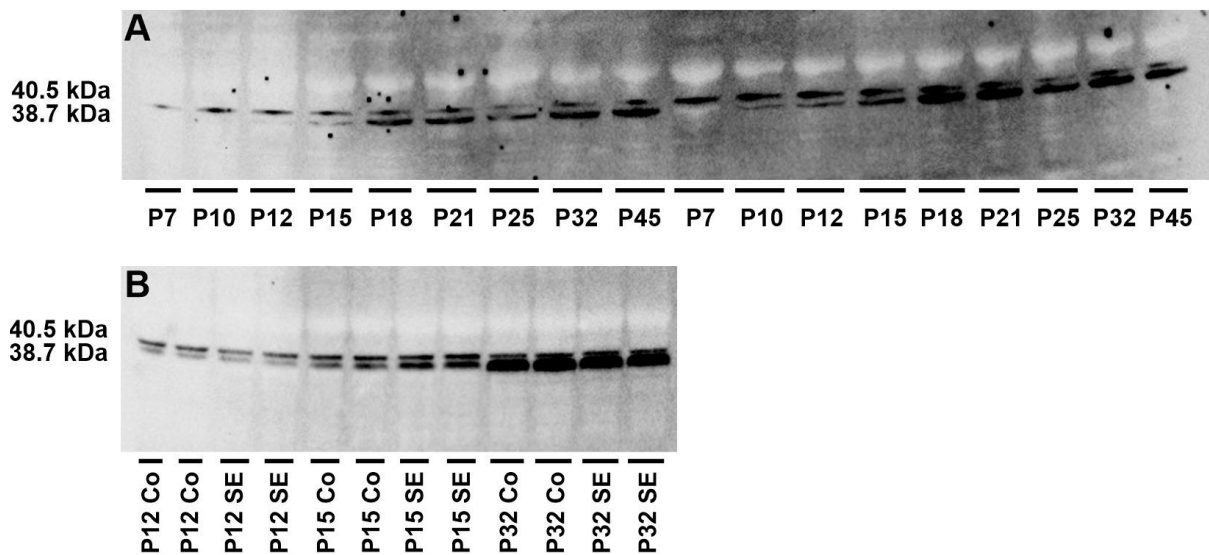


**Obr. 5. Western blot – A1R v průběhu ontogeneze** | Osa X: zleva doprava u 7-, 10-, 12-, 15-, 18-, 21-, 25-, 32- 52-denních potkanů v identických duplicitách měření. Detaily uvnitř obrázku.



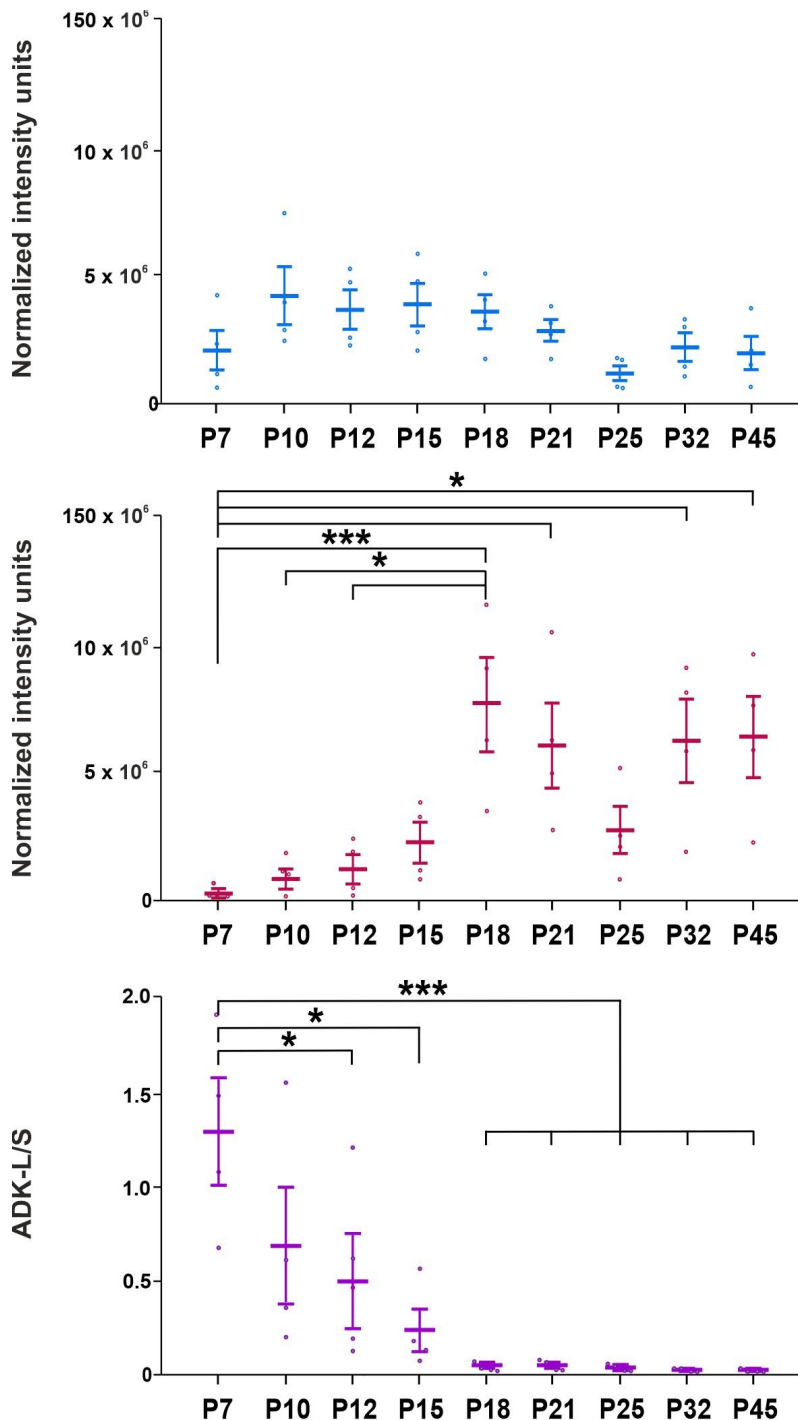
**Obr. 6. Expres A1 receptory v průběhu ontogeneze (mean gray value + SEM) | Osa X: zleva doprava u 7-, 10-, 12-, 15-, 18-, 21-, 25-, 32- a 52-denních potkanů v identických duplicitách měření. Osa Y: Normalizované jednotky intenzity (NIU). Detaily uvnitř obrázku.**

Expres ADK v hipokampu prokázala, že v porovnání s nejmladší 7-denní věkovou skupinou došlo ke zvýšení exprese isoformy ADK-L v průběhu následujících dvou týdnů (P10-P21). S dalším vývojem byl zaznamenán pozvolný pokles, avšak rozdíly nebyly signifikantní. V případě isoformy ADK-S došlo k postupnému zvyšování exprese v průběhu rané ontogeneze. Signifikantní rozdíly byly zaznamenány u 18- ( $F = 19,02$ ;  $p = 0,0047$ ), 21- ( $F = 14,92$ ;  $p = 0,0416$ ), 32- ( $F = 18,03$ ;  $p = 0,0342$ ) a 45-denních potkanů ( $F = 15,51$ ;  $p = 0,0280$ ) v porovnání s nejmladší skupinou. Nejvyšší exprese isoformy ADK-S byla prokázána u 18-denní skupiny potkanů, která dosáhla hladiny významnosti v porovnání se skupinami 7- ( $F = 16,69$ ;  $p = 0,0117$ ), 10- ( $F = 17,32$ ;  $p = 0,0114$ ) a 12-denních ( $F = 12,37$ ;  $p = 0,0199$ ) zvířat (Obr. 7 a 8).



**Obr. 7. Western blot – ADK isoformy ADK-S (38,7 kDa) a ADK-L (40,5 kDa) v průběhu ontogeneze u naivních kontrol a po SE | (A) U kontrol: Osa X - zleva doprava u 7-, 10-, 12-, 15-, 18-, 21-, 25-, 32- 45-denních potkanů v identických duplicitách měření. (B) Po SE: Osa Y - zleva doprava: u 12-, 15-, 32-denních potkanů v identických duplicitách měření. Detaily uvnitř obrázku.**

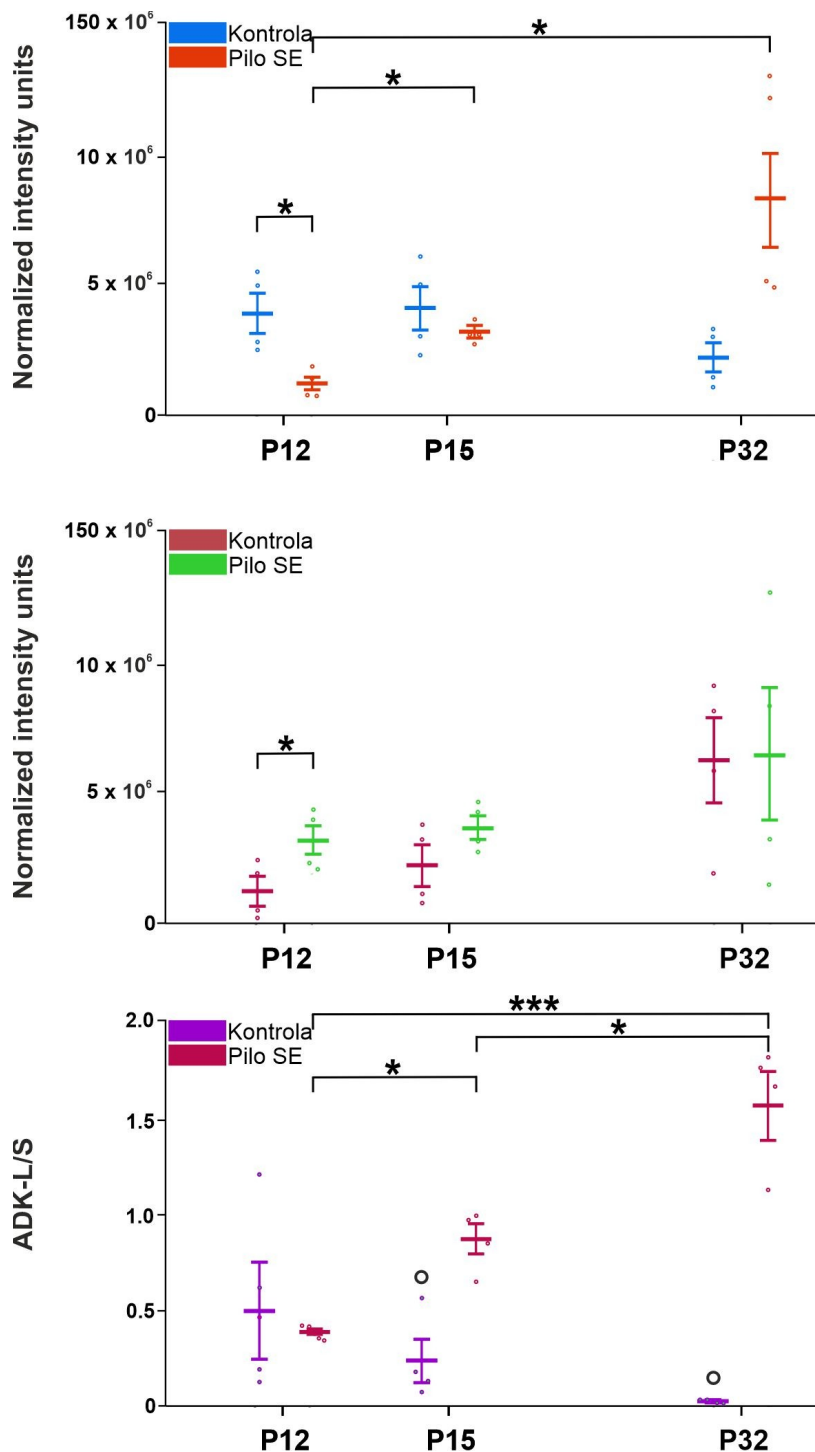
Poměr ADK-L/ADK-S, který názorněji reflektuje změny v zastoupení obou isoform ADK v průběhu vývoje, prokázal signifikantní pokles ve skupině 12- ( $F = 1,251$ ;  $p = 0,0474$ ), 15- ( $F = 6,869$ ;  $p = 0,0124$ ), 18- ( $F = 638,9$ ;  $p = 0,0043$ ), 21- ( $F = 716,7$ ;  $p = 0,0044$ ), 25- ( $F = 686,3$ ;  $p = 0,0046$ ), 32- ( $F = 2257$ ;  $p = 0,0041$ ) a 45-denních zvířat ( $F = 2064$ ;  $p = 0,004$ ) v porovnání s nejmladší skupinou 7-denních zvířat. Z těchto výsledků lze usuzovat, že v průběhu normálního ontogenetického vývoje hipokampu dochází k převaze exprese isoformy ADK-S nad isoformou ADK-L (Obr. 8).



**Obr. 8. Expres isoformem ADK-L a -S v průběhu ontogeneze u naivních kontrol (mean gray value + SEM + individual values) | Zeshora dolů: ADK-L u kontrol, ADK-S u kontrol, poměr ADK-L/ADK-S u kontrol. Osa X: zleva doprava u 7-, 10-, 12-, 15-, 18-, 21-, 25-, 32- a 45-denních potkanů v identických duplicitách měření. Osa Y: Normalizované jednotky intenzity (NIU) nebo poměr ADK-L/-S. Jedna nebo tři hvězdičky – signifikantní rozdíl s hladinou významnosti  $p < 0,05$ , respektive  $p < 0,001$ . Detaily uvnitř obrázku.**

U skupiny potkanů po SE byl pozorován výrazný pokles v expresi isoformy ADK-L v časovém odstupu 6 hodin po SE v porovnání s kontrolní skupinou 12-denních zvířat ( $F = 13,07$ ;  $p = 0,021$ ). Ve stejné věkové skupině byly výsledky u exprese isoformy ADK-S přesně opačné, došlo k signifikantnímu vzestupu exprese u zvířat po SE v porovnání s kontrolami ( $F = 1,174$ ;  $p = 0,0425$ ). V časovém odstupu 3 a 20 dnů byla zjištěna zvýšená exprese obou isoformem po SE i u kontrol v porovnání s mladšími skupinami, ale signifikantní rozdíl byl

zaznamenán pouze u isoformy ADK-L, u 15- ( $F = 538,9$ ;  $p < 0,0001$ ) a 32-denních zvířat ( $F = 174,72$ ;  $p = 0,0466$ ) v porovnání s 12-denní skupinou po SE. Poměr isoform ADK-L/-S po SE ukázal signifikantní nárůst u 32-denních zvířat v porovnání s 15- ( $F = 6,003$ ;  $p = 0,0103$ ) i 12-denní skupinou ( $F = 112,4$ ;  $p = 0,0005$ ) a mezi 15-denní skupinou v porovnání s 12-denními zvířaty ( $F = 18,75$ ;  $p = 0,0005$ ) (Obr. 9).



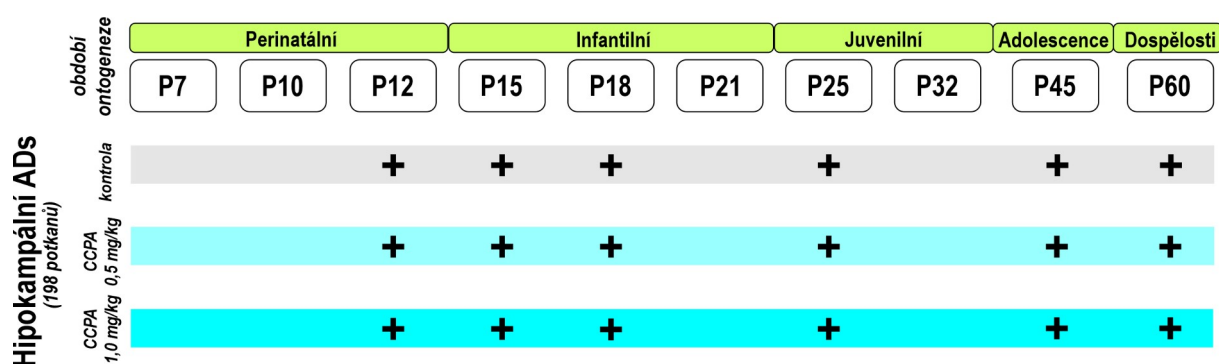
**Obr. 9. Expres**  
**isoform ADK-L a -**  
**S v průběhu**  
**ontogeneze po SE**  
**(mean gray value +**  
**SEM + individual**  
**values) | Zeshora**  
**dolů: ADK-L po SE,**  
**ADK-S po SE,**  
**poměr**  
**ADK-L/ADK-S u**  
**kontrola a po SE.**  
 Osa X: zleva  
 doprava u 12-, 15-,  
 32-denních potkanů  
 v identických  
 duplicitách měření.  
 Osa Y:  
 Normalizované  
 jednotky intenzity  
 (NIU) nebo poměr  
 ADK-L/-S. Jedna  
 nebo tři hvězdičky –  
 signifikantní rozdíl  
 s hladinou  
 významnosti  $p <$   
 $0,05$ , respektive  $p <$   
 $0,001$ . Kroužek –  
 signifikantní rozdíl  
 mezi skupinou  
 kontrol a věkově  
 korelující skupinou  
 po SE s hladinou  
 významnosti  $p <$   
 $0,05$ . Detaily uvnitř  
 obrázku.



### 3.2. Vliv agonisty A1R na změny excitability hipokampu v průběhu ontogeneze

#### 3.2.1. Metodika

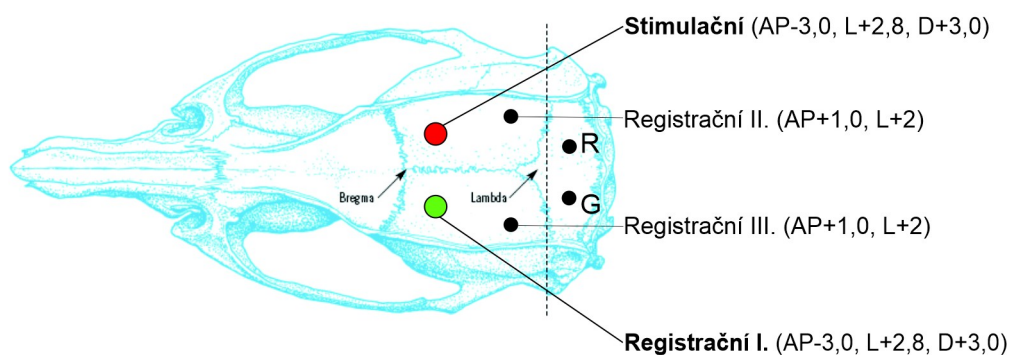
**Experimentální zvířata:** Veškeré procedury byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat (č. 246/1992 Sb., v pozdějším znění č. 501/2020 Sb.) a schváleny Etickou komisí Akademie Věd ČR. Pro účely tohoto experimentu bylo použito 198 samců potkana kmene Wistar v různém věkovém zastoupení odpovídající vývojovému profilu lidského mozku od novorozence pro ranou dospělost. Jednalo se celkem o 8-10 zvířat pro každou věkovou skupinu – v postnatálních dnech P12, P15, P18, P25, P45 a P60. Den narození je počítán jako P0. Odstavení zvířat od matky proběhlo 21. den. Laboratorní zvířata byla chována v podmínkách 12 hodinového cyklu světlo/tma, při pokojové teplotě 22 +/- 1 °C a s volným přístupem k vodě a potravě.



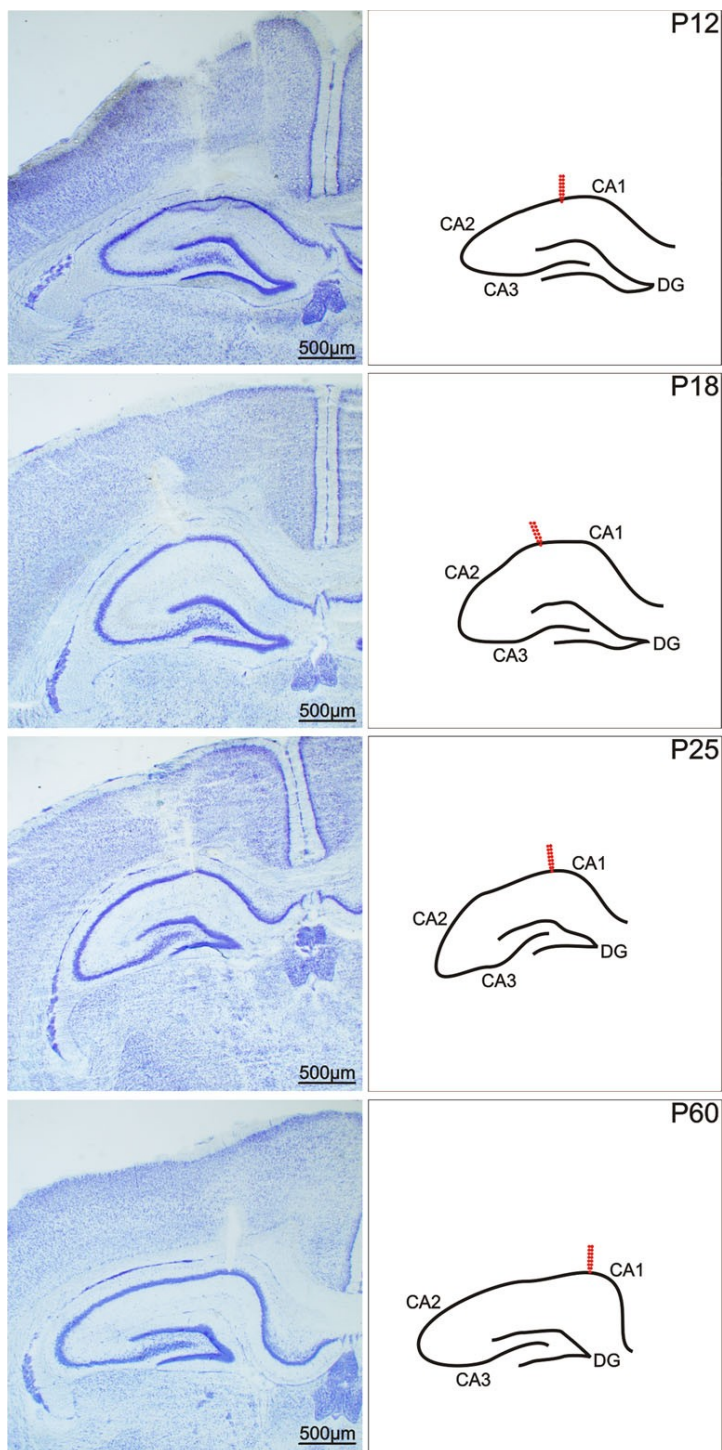
**Obr. 10. Vliv agonisty A1R na změny excitability hipokampu - schéma pokusu** | Zeshora dolů: období ontogeneze, hipokampální následné vývoje (ADS) u kontrol, po aplikaci CCPA v dávce 0,5mg/kg, po aplikaci CCPA v dávce 1,0mg/kg. Detaily uvnitř obrázku.

**Implantace elektrod:** Chirurgická implantace elektrod byla vedena v celkové inhalační anestezii 0,5-2% isofluranem. Hluboké stimulační elektrody (Plastics One, Roanoke, VA, USA) byly pomocí stereotaktického aparátu implantovány do dorzálního pravostranného hipokampu, registrační elektrody do levostranného dorzálního hipokampu (Obr. 11). Koordináty pro implantaci elektrod do dorzálních hipokampů byly odvozeny od výchozího schématu pro 30. postnatální den dle stereotaktického atlasu (Paxinos a kol., 1997) - anteroposteriorně (AP) -3,0 mm, laterálně (L) +2,8 mm, do hloubky (D) +3,0 mm)) a přepočítány dle skutečné vzdálenosti bregma-lambda. Po skončení elektrofyziologické části studie byla zvířata usmrcena pomocí předávkování inhalační analgosedace etherem. Správné

umístění elektrod bylo verifikováno na histologických vzorcích mozkové tkáně, konkrétně na řezech obarvených Nisslovou substancí (Obr. 12). Mimo stimulační a registrační elektrody v hipokampu jsme registrovali EEG signál ze sensorimotorického (SMA) kortexu pravé i levé hemisféry (AP + 1,0 mm, L + 2 mm). Referenční a zemní elektrody byly umístěny nad cerebellum. Jednotlivé elektrody byly umístěny do 6-pinového konektoru a fixovány na lebce pomocí dentální pryskyřice (Duracrol, Dental, Česká republika). Po ukončení implantace (cca 30-60 min) byla ukončena celková inhalační anestezie isofluranem. Po vigilizaci byla dodržena minimální lhůta 60 minut k zahájení vlastního experimentálního měření.



**Obr. 11. Schéma lokalizace elektrod** | Stereotaktické koordináty v závorkách:  
 AP = antero-posteriorní, L = laterální, D = do hloubky; R – referenční elektroda; G –  
 zemní elektroda



**Obr. 12.**  
**Histologická**  
**verifikace**  
**lokalizace elektrod |**  
 Koronární řezy  
 dorzálního  
 hipokampu po  
 elektrické stimulaci  
 CA1. Zleva doprava:  
 V řezech obarvených  
 Nisslovou substancí,  
 ve schematickém  
 zobrazení. Zeshora  
 dolů: 12-, 18-, 25- a  
 60-denních potkanů.  
 Šípky znázorňují  
 lokalizaci  
 registračních  
 elektrod. Detaily  
 uvnitř obrázku.

***Přímá kortikální stimulace, následné hipokampální výboje:*** Zvířata s implantovanými elektrodami byly s dostatečným odstupem od operace umístěny jednotlivě do plastových vyhřívaných boxů a propojeny pomocí kabelu se zesilovačem a stimátorem. Pro účely práce byl využit stimulátor Model 2100 (A-M Systems, Sequim, WA, USA). Stimulační protokol s nadprahovou intenzitou stimulace byl uplatněn pro vyvolání prvního ADs u každého zvířete (0,2 – 2,0 mA), tato intenzita byla použita opakovaně pro další stimulace (celkem 6x).

Jednotlivá stimulace byla aplikována v trvání 2 sek a s frekvencí 60 Hz, mezi jednotlivými stimulacemi byl dodržen rozestup 20 minut. Délka trvání ADs a práh intenzity k jejich vyvolání byly základními studovanými charakteristikami. Každé zvíře bylo připojeno a monitorováno 20 minut před zahájením vlastního měření, aby bylo odhaleno případné ovlivnění výsledků rozvojem spontánních epileptických záchvatů. Analogový registrovaný EEG signál byl zpočátku upraven zesilovačem (Pentusa Base Station, Tucker-Davies Technologies, Alachua, FL, USA), následně digitalizován a zpracován pomocí programu TDT Open Project (Tucker-Davies Technologies, Alachua, FL, USA).

**Farmakologické ovlivnění A1R:** Agonista A1R CCPA (Tocris Biosciences, Bristol, UK) byl injekčně intraperitonálně aplikován laboratorním potkanům v dávkách 0,5 mg/kg a 1,0 mg/kg. Dávkování bylo stanoveno podle předchozích prací z naší laboratoře (Mares a kol., 2014). Účinek agonisty A1R CCPA byl studován pouze u naivních zvířat. Každá experimentální věková skupina se skládala z 9-14 zvířat. CCPA byl před aplikací smíchán s roztokem Tween 80 k zajištění suspenze a naředěn fyziologickým roztokem do finální koncentrace 1 mg/ml. U kontrolních věkových skupin bylo místo CCPA aplikováno adekvátní množství fyziologického roztoku intraperitoneálně. K aplikacím došlo 10 minut před první stimulací.

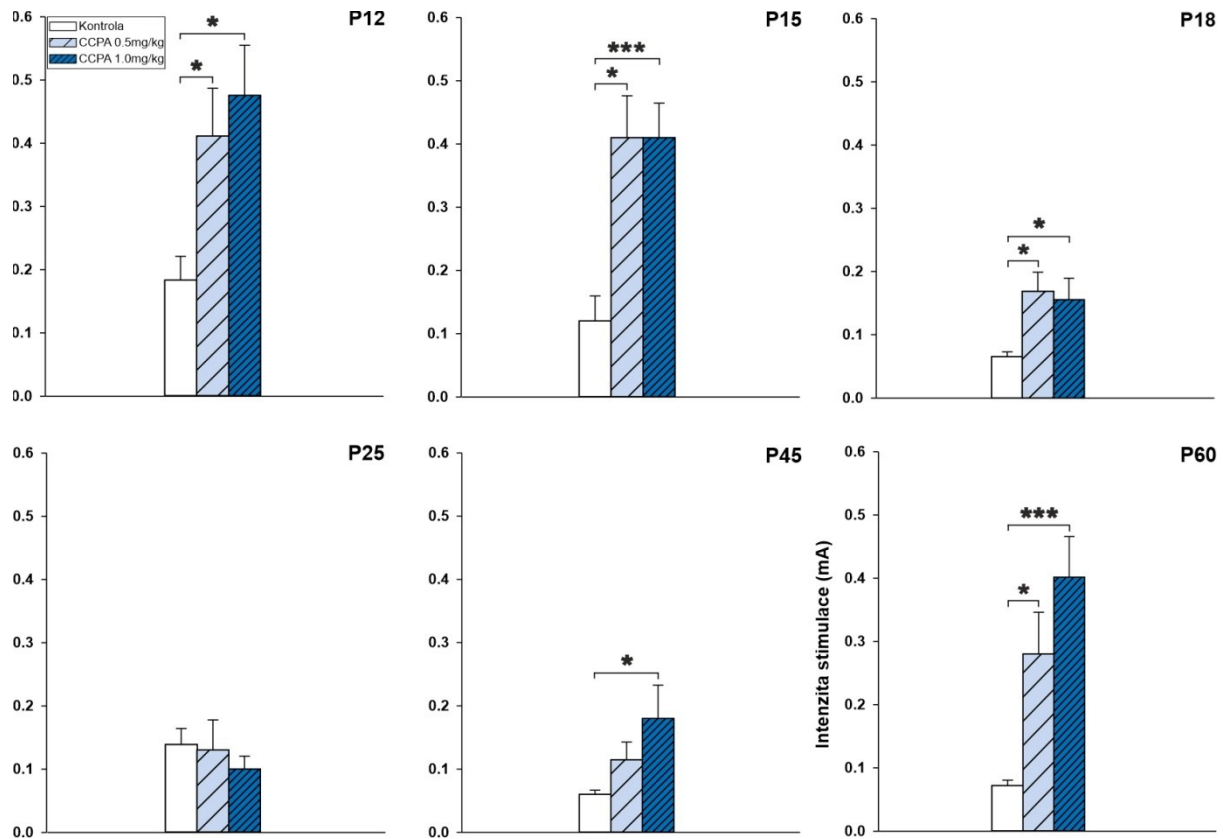
**Statistika:** Analýza elektrofyziologických dat byla provedena pomocí programu SigmaStat (SYSTAT Inc., San Jose, USA). Délka trvání ADs v rámci jednotlivých věkových skupin a pro jednotlivé dávky agonisty CCPA byla zhodnocena metodou One-way ANOVA a Repeated-measures analysis of variance (RM ANOVA). Prah k vyvolání ADs u kontrolních zvířat a dvou dávkách CCPA byl analyzován metodou One-way ANOVA a Holm-Sidak testem. Hladina významnosti byla vždy stanovena jako  $p < 0.05$ .

### 3.2.2. Výsledky

#### 3.2.2.1. Prah intenzity stimulace

Prah intenzity je nejnižší hodnota intenzity elektrického proudu nutná při stimulaci hipokampu k vyvolání ADs. Věkově vázané rozdíly v hodnotě prahu intenzity byly pozorovány u kontrolních zvířat i po aplikaci A1R agonisty CCPA. K vyvolání ADs po aplikaci obou dávek CCPA bylo potřeba signifikantně vyšší intenzity stimulace u 12-, 15-, 18- a 60-denních zvířat v porovnání s věkově korespondujícími kontrolními skupinami. Podobný

výsledek byl zaznamenán u 45-denní skupiny zvířat, ale pouze u vyšší dávky CCPA (1,0 mg/kg). V případě 25-denní skupiny nedošlo k žádným signifikantním změnám (Obr. 13).

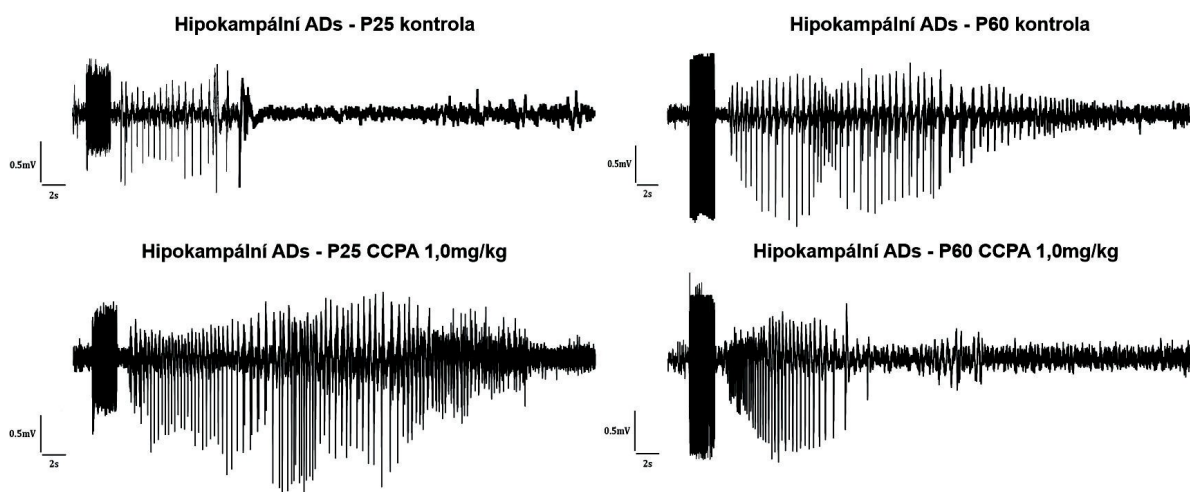


**Obr. 13. Efekt agonisty A1R 2-chloro-N6-cyclopentyladenosinu (CCPA) na práh intezity k vyvolání hipokampálního následného výboje (ADs) (mean +SEM) | Zeshora dolů: u 12-, 15-, 18-, 25-, 45- a 60-denních potkanů. Osa Y: intenzita stimulace (mA). Bílý sloupec – kontrola, světle modrá – CCPA 0,5 mg/kg, tmavě modrá – CCPA 1,0mg/kg. Jedna nebo tři hvězdičky – signifikantní rozdíl v porovnání s věkově korespondující skupinou s hladinou významosti  $p < 0,05$ , respektive  $p < 0,001$ .**

### 3.2.2.2. Následné hipokampální výboje

Délka trvání ADs byla předmětem měření této části pokusu. Prahovou intenzitou elektrické stimulace došlo k vyvolání ADs. V případě elektrické stimulace hipokampu mají ADs u potkana typickou morfologii. Krátce po stimulaci dochází k rozvoji repetitivních vysokofrekvenčních ( $> 14$  Hz) polyspikes (PS), s postupným zpomalením vln do pásma delta střední až vyšší amplitudy a/nebo theta vln ostrého tvaru (Kotloski a kol., 2002) obvykle

následované vzorcem nízkovoltážních vysokofrekvenčních oscilací ( $> 80$  Hz) (Bragin a kol., 1997) (Obr. 14). Rozvoj ADs je v hipokampu často doprovázen behaviorálními projevy podobnými semiologii automotorického záchvatu z oblasti meziálních limbických struktur – oroalimentární automatismy (olizování, žvýkání, polykání, kousání atd.). Ke konci elektroklínického nebo elektrografického záchvatu jsou často pozorovány tzv. „wet dog shakes“ (WDS). Zachycení WDS je považováno za průkaz epileptiformní aktivity hipokampu (Frush a McNamara, 1986). U mláďat potkana jsou WDS pozorovány až po dosažení 2. týdnu věku v důsledku dokončování dozrávání mozkových drah (Veliskova a kol., 1988).

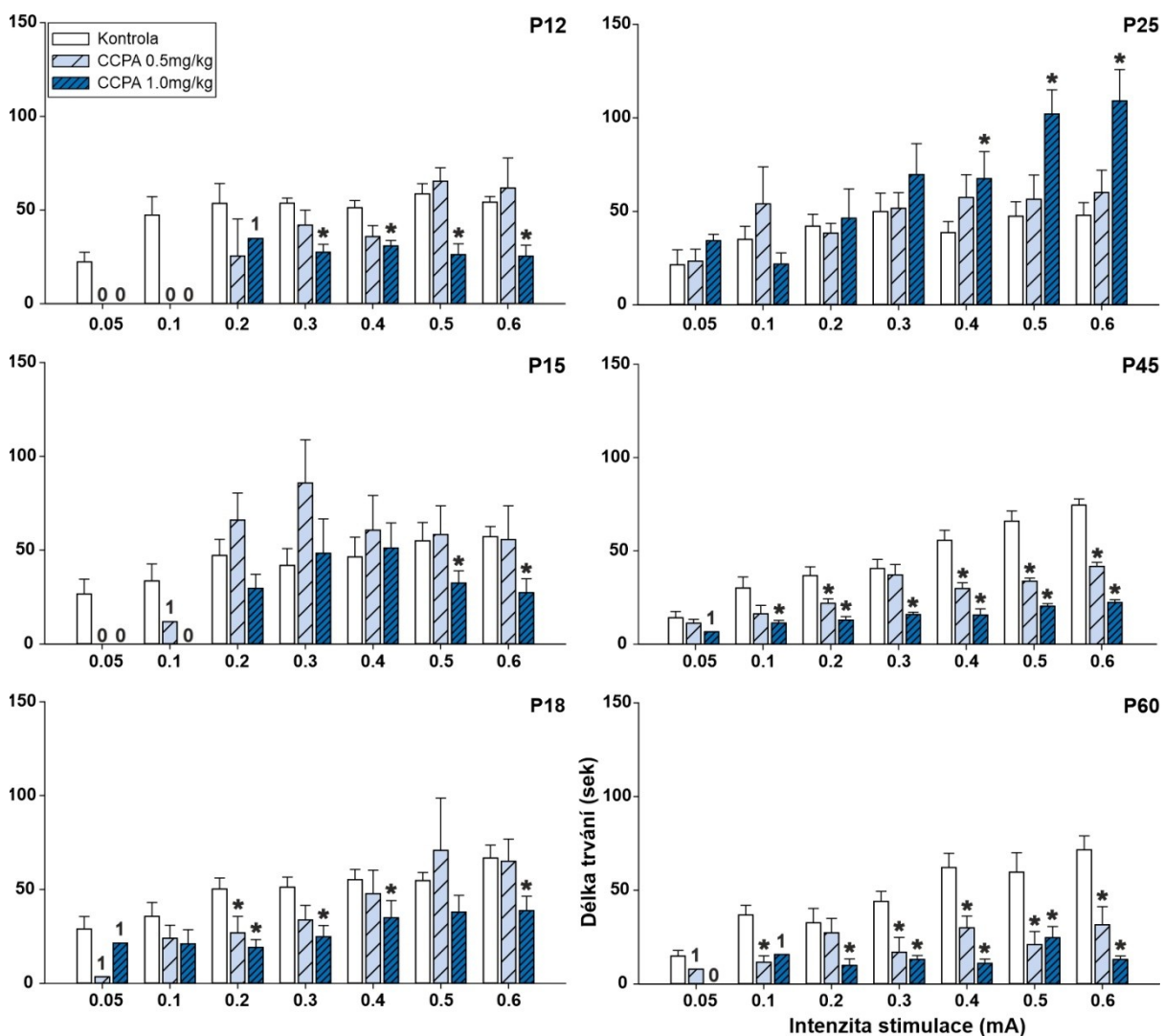


**Obr. 14. Hipokampální následné výboje (ADs) u 25- a 60-denního potkana | Zeshora dolů: u kontrol, po aplikaci CCPA v dávce 1,0 mg/kg. Zleva doprava: u 25- a 60-denních zvířat.**

U nejmladších skupin 12- a 15-denních zvířat nebyl zaznamenán žádný rozdíl v délce trvání ADs po aplikaci CCPA v dávce 0,5 mg/kg v porovnání s kontrolními zvířaty stejné věkové skupiny. Ve stejné dávce CCPA bylo prokázáno signifikantní zkrácení ADs u 18-denních zvířat a to pouze po stimulaci 0,2 mA ( $F = 15,413$ ;  $p = 0,002$ ). Narozdíl od nižší dávky CCPA došlo po aplikaci dávky 1,0 mg/kg ke zkrácení délky ADs u 12- ( $F = 0,653-20,626$ ;  $p = 0,014-0,459$ ), 15- ( $F = 1,883-20,508$ ;  $p = 0,017-0,203$ ) a 18-denních potkanů ( $F = 1,553-6,368$ ;  $p = 0,023-0,232$ ). U 12-denních zvířat bylo signifikantní zkrácení od intenzity 0,3-0,6 mA, u 15-denních pouze u posledních 2 stimulacích. CCPA v dávce 1,0mg/kg vedl u 18-denní skupiny zvířat ke zkrácení délky ADs od intenzity 0,2-0,6 mA s výjimkou 0,5 mA



( $F = 2,950-6,368$ ;  $p = 0,023-0,101$ ). Opačný efekt po aplikaci CCPA v dávce 1,0 mg/kg byl zaznamenán u 25-denní skupiny zvířat. U této věkové skupiny došlo k prodloužení ADs při intenzitě 0,4-0,6 mA ( $F = 4,474-8,284$ ;  $p = 0,009-0,047$ ). Zkrácení délky ADs bylo následkem u 45-denních potkanů u obou dávek CCPA ve srovnání s kontrolami ( $F = 3,458-16,007$ ;  $p = 0,021-0,035$  a  $F = 4,332-13,561$ ;  $p = 0,004-0,039$ ) s výjimkou dávky 0,5 mg/kg u nejnižších intenzit od 0,05-0,3 mA. I nejstarší skupina 60-denních potkanů prokázala zkrácení ADs u obou dávek CCPA v porovnání s kontrolami u všech intenzit ( $F = 2,224-13,236$ ;  $p = 0,005-0,019$  a  $F = 7,877-16,431$ ;  $p = 0,007-0,023$ ) mimo 0,05 a 0,2 mA, kde nižší dávka nevedla k signifikantní změně (Obr. 15).



**Obr. 15. Efekt agonisty A1R 2-chloro-N6-cyclopentyladenosinu (CCPA) na délku trvání hipokampálních následných výbojů (ADs) (mean +SEM) | Zeshora dolů: u 12-, 15-, 18-, 25-, 45- a 60-denních potkanů. Osa Y: Délka trvání ADs (sek), Osa X: intenzita stimulace (mA). Bílý sloupec – kontrola, světle modrý sloupec – CCPA 0,5 mg/kg, tmavě modrý sloupec – CCPA 1,0mg/kg. Hvězdička – signifikantní rozdíl v porovnání s věkově korespondující skupinou s hladinou významosti  $p < 0,05$ . Čísla 0 nebo 1 znamenají žádné, respektive jedno zvíře ve skupině s vyvoláním ADs.**

### 3.3. Úloha ADK ve změně excitability hipokampu v průběhu intaktního vývoje mozku a po indukovaném SE

#### 3.3.1. Metodika

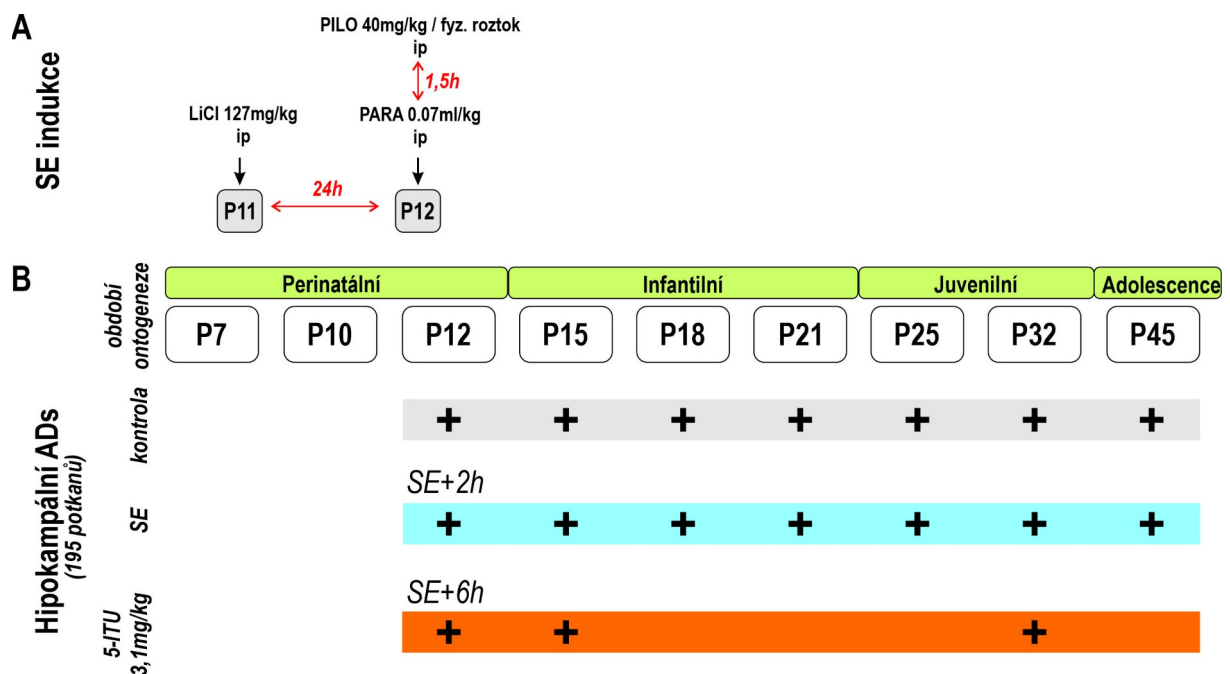
**Experimentální zvířata:** Veškeré procedury byly prováděny v souladu se Zákonem na ochranu zvířat (č. 246/1992 Sb., v pozdějším znění č. 501/2020 Sb.) a schváleny Etickou komisí Akademie Věd ČR. Pro účely tohoto experimentu bylo použito 285 samců potkana kmene Wistar v různém věkovém zastoupení odpovídající vývojovému profilu lidského mozku od novorozence po ranou dospělost. Jednalo se celkem o 8-10 zvířat pro každou věkovou skupinu – v postnatálních dnech P12, P15, P18, P25, P32 a P45. Den narození je počítán jako P0. Odstavení zvířat od matky proběhlo 21. den. Laboratorní zvířata byla chována v podmínkách 12 hodinového cyklu světlo/tma, při pokojové teplotě 22 +/- 1 °C a s volným přístupem k vodě a potravě.

**Status epilepticus:** 24 hodin před vyvoláním epileptického statu (SE), tedy 11. den postnatálního vývoje (P11), byl všem zvířatům aplikován roztok lithium chloridu (LiCl) v dávce 127 mg/kg intraperitoneálně. LiCl umožňuje snížit dávku pilokarpinu nutného k vyvolání SE a tím snižuje významně morbiditu a mortalitu zvířat. 12. den postnatálního vývoje (P12) došlo k aplikaci pilokarpinu v dávce 40 mg/kg intraperitoneálně. Z každého vrhu byl pilokarpin aplikován přibližně polovině zvířat, ostatním zvířatům byl aplikován fyziologický roztok (4 ml/kg) intraperitoneálně (Obr. 17). U experimentálních zvířat po aplikaci pilokarpinu byly v průběhu dalších 2 hodin sledovány behaviorální a motorické projevy zvířat, které byly klasifikovány pomocí modifikované Racinovy škály. Mezi semiologické projevy SE byla zahrnuta stádia 4-6 modifikované Racinovy škály (Obr. 16). Pro naši studii bylo zahrnuto celkem 100 zvířat po indukovaném SE, která dle škály odpovídala stadiu 6. Po uplynutí 90 minut po aplikaci pilokarpinu (nebo fyziologického roztoku) byl zvířatům aplikován paraldehyd intraperitoneálně v dávce 0,07 ml/kg za účelem zastavení konvulzivního záchvatu a tím snížení mortality. Další 2 hodiny byla zvířata ponechána v izolaci a teprve poté vrácena k jejich matce. V důsledku izolace od matky byla všechna zvířata umístěna ve vyhřívaných boxech na teplotu 34 °C.



Racinova modifikovaná škála	Typ behaviorálních projevů
Skóre 0	beze změny chování
Skóre 1	orofaciální pohyby
Skóre 2	kývání hlavou
Skóre 3	jednostranný klonus horní končetiny
Skóre 4	oboustranný klonus horních končetin s tahem vzad
Skóre 5	tah vzad se ztrátou stability s pádem
Skóre 6	hyperkinetické projevy (skoky, útěk), vokalizace

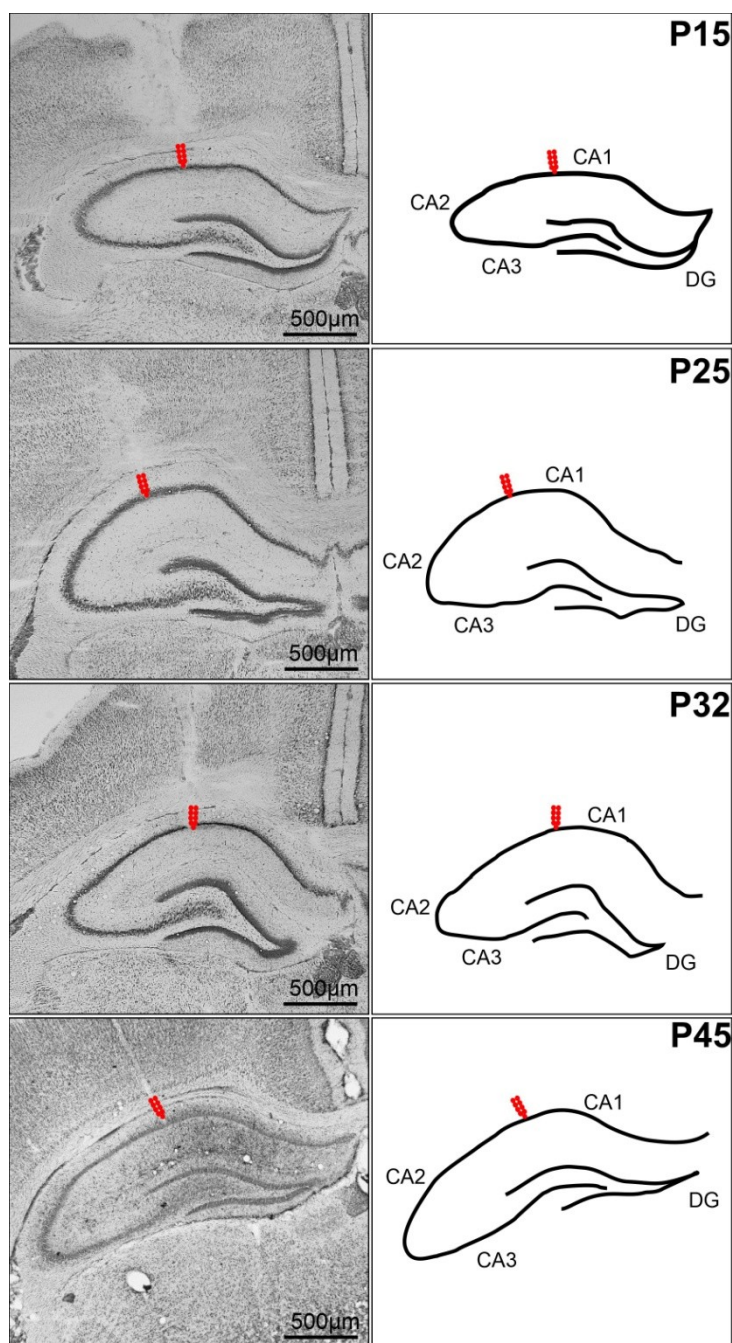
Obr. 16. Racinova modifikovaná škála



Obr. 17. Úloha ADK ve změně excitability hipokampu v průběhu intaktního vývoje mozku a po indukovaném SE- schéma pokusu | (A) Indukce SE. (B) Zeshora dolů: období ontogeneze, hipokampální následné vývoje (ADS) u kontrol, po SE, po aplikaci 5-ITU u kontrol i SE. Detaily uvnitř obrázku. ADS = následné vývoje; PILO = pilokarpin; PARA = paraldehyd, SE = status epilepticus; 5-ITU = 5-iodotubercidin

**Implantace elektrod:** Chirurgická implantace elektrod byla vedena v celkové inhalační anestezii 0,5-2% isofluranem. Hluboké stimulační elektrody (Plastics One, Roanoke, VA, USA) byly pomocí stereotaktického aparátu implantovány do dorzálního pravostranného hipokampu, registrační elektrody do levostranného dorzálního hipokampu (Obr.11). Koordináty pro implantaci elektrod do dorzálních hipokampů byly odvozeny od výchozího

schématu pro 30. postnatální den dle stereotaktického atlasu (Paxinos a kol., 1997) - anteroposteriorně (AP) -3,0 mm, laterálně (L) +2,8 mm, do hloubky (D) +3,0 mm) a přepočítány dle skutečné vzdálenosti bregma-lambda. Po skončení elektrofyziologické části studie byla zvířata usmrcena pomocí předávkování inhalační analgosedace etherem. Správné umístění elektrod bylo verifikováno na histologických vzorcích mozkové tkáně, konkrétně na řezech obarvených Nisslovou substancí (Obr. 18). Mimo stimulační a registrační elektrody v hipokampu jsme registrovali EEG signál ze sensorimotorického arey (SMA) pravé i levé hemisféry (AP + 1,0 mm, L + 2 mm). Referenční a zemní elektrody byly umístěny nad cerebellum (Obr. 11). Jednotlivé elektrody byly umístěny do 6-pinového konektoru a fixovány na lebce pomocí dentální pryskyřice (Duracrol, Dental, Česká republika). Po ukončení implantace (cca 30-60 min) byla ukončena celková inhalační anestezie isofluranem. Po vigilizaci byla dodržena minimální lhůta 60 minut k zahájení vlastního experimentálního měření. U zvířat s indukovaným SE byl dodržen odstup minimálně 6 hodin od ukončení motorických projevů SE. V průběhu implantace elektrod byla zvířatům zajištěna stabilní tělesná teplota pomocí nahřívacích destiček vyhřívaných na 34 °C.



**Obr. 18. Histologická verifikace lokalizace elektrod |** Koronální řezy dorzálního hipokampu po implantaci registračních elektrod do CA1. Zleva doprava: V řezech obarvených Nisslovou substancí, ve schematickém zobrazení. Zeshora dolů: 15-, 25-, 32- a 45-denních potkanů. Šipky znázorňují lokalizaci registračních elektrod. Detaily uvnitř obrázku.

**Přímá kortikální stimulace, následné hipokampální výboje:** Zvířata s implantovanými elektrodami byly s dostatečným odstupem od operace umístěny jednotlivě do plastových vyhřívaných boxů a propojeny pomocí kabelu se zesilovačem a stimulátorem. Pro účely naší práce byl využit stimulátor Model 2100 (A-M Systems, Sequim, WA, USA). Oproti předchozím pokusům byl použit stimulační protokol s pevně stanovenou vzrůstající intenzitou stimulace od 0,05 do 6 mA (celkem 7 stimulací). Jednotlivá stimulace byla aplikována v trvání 2 sek a s frekvencí 60 Hz, mezi jednotlivými stimulacemi byl dodržen rozestup 20 minut. Délka trvání ADs a práh intenzity k jejich vyvolání byly základními studovanými

charakteristikami. Každé zvíře bylo připojeno a monitorováno 20 minut před zahájením vlatního měření, aby byl vyloučen vliv spontánních epileptických záchvatů na výsledky stimulace. Analogový registrovaný EEG signál byl zpočátku upraven zesilovačem (Pentusa Base Station, Tucker-Davies Technologies, Alachua, FL, USA), následně digitalizován a zpracován pomocí programu TDT Open Project (Tucker-Davies Technologies, Alachua, FL, USA).

**Video-EEG monitorování:** Z věkové skupiny P15, P32 a P45 bylo 10 kontrolních zvířat a 10 zvířat po SE bez předchozí aplikace inhibitoru ADK připojeno na 24hodinový V-EEG monitoring za účelem detekce spontánních epileptických záchvatů. Dalších 10 zvířat po SE v každé studované skupině podstoupilo intraperitoneální aplikaci inhibitoru 5-ITU (viz farmakologické ovlivnění ADK) (Obr. 19). Zvířata byla umístěna jednotlivě do vyhřívaných boxů s podestýlkou a s neomezeným přístupem k vodě a potravě. Postup implantace elektrod, jejich umístění a fixace byl totožný jako v předchozí části pokusu s kortikální stimulací. Výjimkou byla implantace registrační elektrody namísto stimulační i do pravého dorzálního hipokampu.

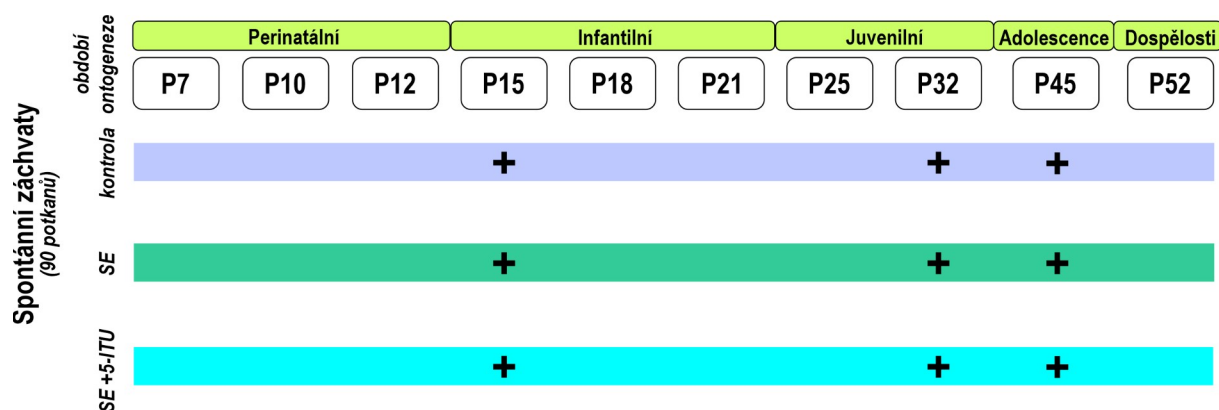
**Western blot:** Změny v zastoupení isoform ADK – ADK-S (38,7 kDa) a ADK-L (40,5 kDa) byly zjištěny u 3 věkových skupin zvířat – P12, P15 a P32 po SE (Obr. 9). Metodický postup analýzy Wester Blot byl totožný s postupem uvedeným v části 1.1.

**Farmakologické ovlivnění ADK:** Inhibitor ADK 5-ITU (Tocris Biosciences, Bristol, UK) byl aplikován potkanům injekčně v dávce 3,1 mg/kg intraperitoneálně. 5-ITU byl použit pouze v jedné dávce, shodné s tou, která byla zkoumána na dospělých potkanech v jiných pracích (Gorter a kol., 2006). Účinek 5-ITU byl studován ve skupině kontrolních zvířat i zvířat po SE. Konkrétně z výsledků části studie na hipokampálních výbojích byly vybrány 3 věkové skupiny zvířat – P12, P25 a P32 reprezentující perinatální, infantilní a juvenilní období. 5-ITU byl opět připraven formou suspenze s kapkou Tween 80 a naředěn fyziologickým roztokem do výsledné koncentrace 3,1mg/l. 5-ITU byl aplikován 10 minut před zahájením přímé kortikální stimulace. Aplikace 5-ITU předcházela V-EEG monitorování u 15-, 32- a 45-denní skupiny zvířat po SE. K intraperitoneální aplikaci 5-ITU došlo ve dvou dávkách, první aplikace byla provedena 2 hodiny po ukončení LiCl-pilokarpinového SE a druhá s odstupem 24 hodin, aplikovaná dávka byla v obou případech 3,1 mg/kg (Obr. 19).

**Statistika:** Analýza elektrofyziologických dat byla provedena pomocí programu Prism (verze 8.0, GraphPad, La Jolla, USA). Délka trvání ADs a prahy k vyvolání ADs vzájemně mezi jednotlivými věkovými skupinami mezi kontrolami a SE byla zhodnocena metodou Two-way

RM ANOVA (nebo mixed model). V rámci konkrétní věkové skupiny mezi kontrolním zvířetem a po SE pomocí t-testu. Počet spontánních epileptických záchvatů byl analyzován metodou Two-way RM ANOVA (nebo mixed model). Hladina významnosti byla vždy stanovena jako  $p < 0,05$  a  $p < 0,001$ .

Srovnání a grafická vizualizace NIU metodou Wester Blot v zastoupení isoforem ADK-L a ADK-S byla provedena programem Prism (verze 8.0, GraphPad, La Jolla, USA). Statistická analýza rozdílů mezi vývojovými skupinami byla provedena pomocí metody One-way ANOVA a následně mezi jednotlivými skupinami pomocí t-testu. Hladina významnosti byla stanovena jako  $p < 0,05$  nebo  $p < 0,001$ .



**Obr. 19. Video-EEG za účelem detekce spontánních záchvatů po LiCl-pilokarpinovém SE - schéma pokusu** | Zeshora dolů: období ontogeneze, spontánní záchvaty u kontrol, po SE, po SE s aplikací 5-ITU v dávce 3,1mg/kg. Detaily uvnitř obrázku.

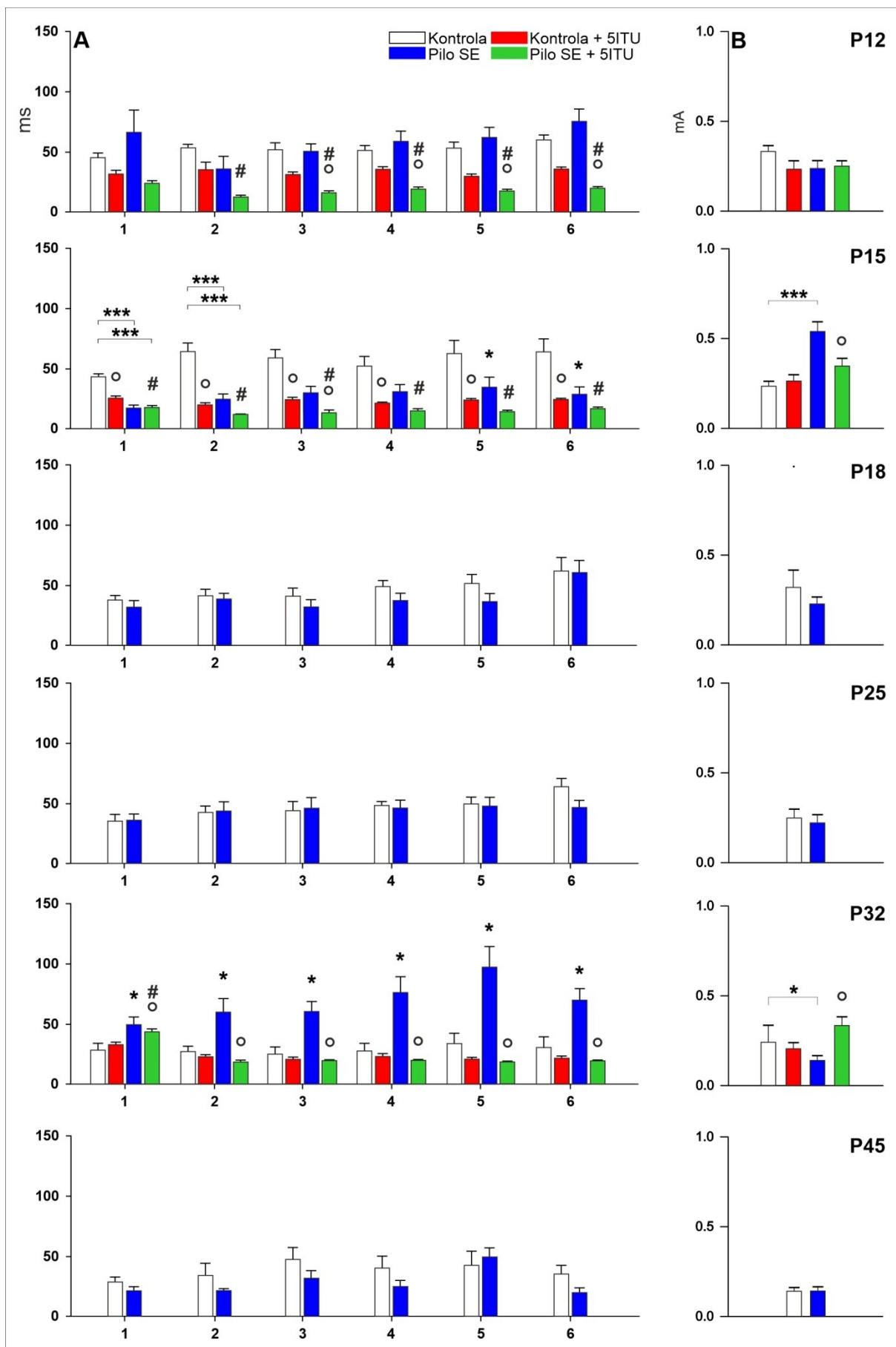
### 3.3.2. Výsledky

#### 3.3.2.1. Práh intenzity stimulace

Práh intenzity je nejnižší hodnota intenzity elektrického proudu nutná při stimulaci hipokampu k vyvolání ADs. Rozdíly v hodnotě prahu intenzity byly pozorovány u kontrolních zvířat, po SE i po aplikaci ADK inhibitoru 5-ITU. Intenzita nezbytná k vyvolání ADs u 15-denních potkanů po SE byla signifikantně vyšší oproti věkově korelující kontrolní skupině zvířat ( $F = 17,50$ ;  $p = 0,0017$ ). Protichůdný výsledek byl pozorován u skupiny 32-

denních potkanů po SE ( $F = 15,42$ ;  $p = 0,047$ ). Výsledky u 12-, 18-, 25- a 45-denních zvířat neprokázaly žádné signifikantní rozdíly mezi kontrolami a zvířaty po SE.

Aplikace ADK inhibitoru 5-ITU nevedla k žádným rozdílům u 12-denní skupiny zvířat mezi kontrolní a skupinou po SE. U 15-denní skupiny po SE s aplikací 5-ITU bylo zjištěno snížení prahu intenzity ADs oproti kontrolám ( $F = 19,74$ ;  $p = 0,0081$ ). 32-denní skupina po SE naopak měla práh po aplikaci 5-ITU prokazatelně zvýšený v porovnání s kontrolami ( $F = 7,997$ ;  $p = 0,0057$ ) (Obr. 20).



**Obr. 20. Efekt inhibitoru ADK 5-iodotubercidinu (5-ITU) na hipokampální následné výboje (ADs) (mean +SEM) |** Zeshora dolů: u 12-, 15-, 18-, 25-, 45- a 45-denních potkanů. Zleva doprava: **(A)** Délka trvání ADs, **(B)** Práh intenzity ADs. Bílý sloupec – kontrola, červený sloupec – kontrola + 5-ITU, modrý sloupec – LiCl-pilokarpinový SE, zelený sloupec - LiCl-pilokarpinový SE + 5-ITU.

(A) Osa X: číslo stimulace. Osa Y: délka trvání ADs (sek). (B) Osa Y: intenzita stimulace (mA).

Jedna nebo tři hvězdičky – signifikantní rozdíl v porovnání s věkově korespondující skupinou s hladinou významnosti  $p < 0,05$ , respektive  $p < 0,001$ . Kroužek – signifikantní rozdíl mezi skupinou kontrol nebo SE po aplikaci 5-ITU a věkově korelující skupinou kontrol nebo skupinou po SE bez 5-ITU s hladinou významnosti  $p < 0,05$ . Hashtag – signifikantní rozdíl mezi skupinou po SE s aplikací 5-ITU a příslušnou věkovou kontrolou s hladinou významnosti  $p < 0,05$ .

### 3.3.2.2. Následné hipokampální výboje

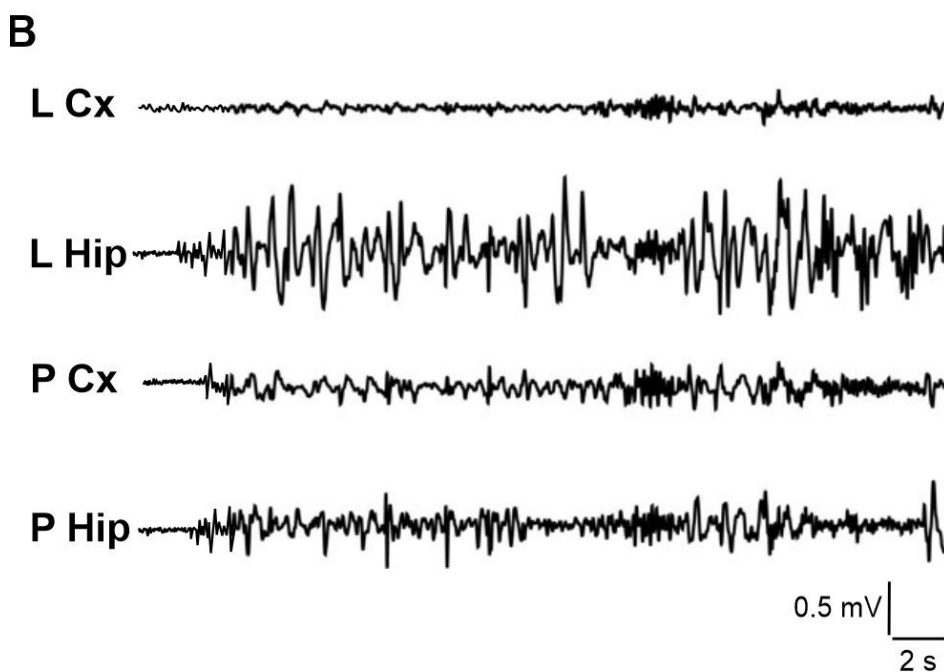
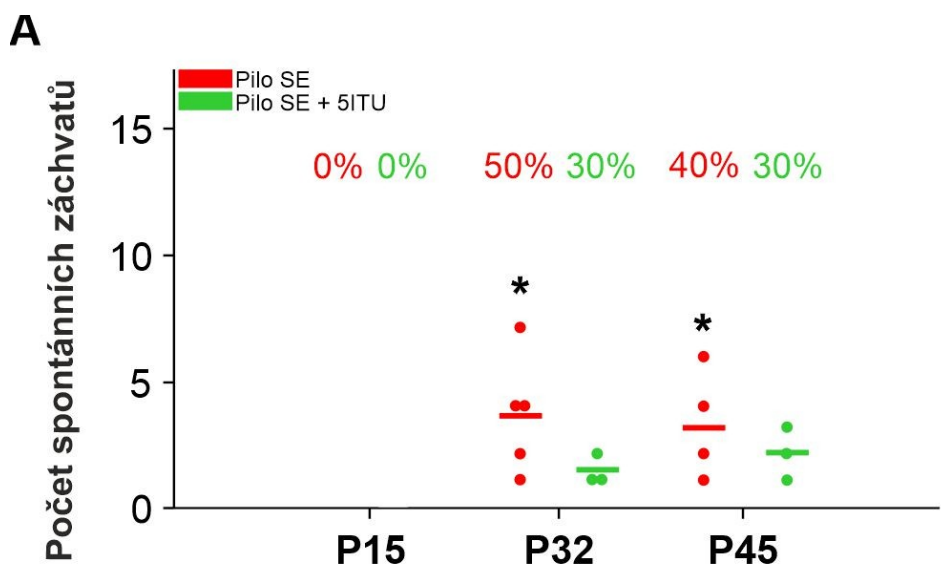
Délka trvání ADs byla předmětem měření této části pokusu. Prahovou intenzitou elektrické stimulace došlo k vývolání ADs. V případě elektrické stimulace hipokampu mají ADs u potkana typickou morfologii, která je podrobně popsána v předchozím pokusu (viz 2.2.2). LiCl-pilokarpinový SE prokazatelně zkrátil délku ADs u 15-denní skupiny zvířat po prvních třech stimulacích v porovnání se stejně starými kontrolními zvířaty ( $F = 15,77-25,94$ ;  $p = 0,0001-0,0381$ ). Ve skupině 12-, 18-, 25- a 45-denních zvířat po SE nebyl prokázán žádný rozdíl v délce ADs v porovnání s kontrolami. Naopak u 32-denních potkanů bylo výsledkem výrazné prodloužení ADs v porovnání s věkově korelující skupinou po všech stimulacích ( $F = 18,09-26,99$ ;  $p = 0,0104-0,0350$ ) (Obr. 20).

Aplikace 5-ITU vedla k rozdílům v délce ADs u kontrolních zvířat i po SE. Mezi kontrolami se prokázalo zkrácení délky ADs u 12- ( $F = 11,31-18,96$ ;  $p = 0,0014-0,0354$ ) a 15-denních zvířat ( $F = 8,824-16,98$ ;  $p = 0,0008-0,0389$ ) po aplikaci 5-ITU. Podobné změny byly zaznamenány po aplikaci 5-ITU u 12- ( $F = 9,273-12,88$ ;  $p = 0,0019-0,0055$ ) i 15-denních kontrol ( $F = 7,056-11,99$ ;  $p = 0,0008-0,0126$ ) v porovnání se stejně starou skupinou zvířat po SE s aplikací 5-ITU. Mezi statovanými zvířaty s aplikací 5-ITU došlo ke zkrácení délky ADs u 12- ( $F = 7,213-10,24$ ;  $p = 0,001-0,0202$ ), 15- ( $F = 18,93$ ;  $p = 0,00419$ ) i 32-denní skupiny zvířat ( $F = 13,80-15,34$ ;  $p = 0,007-0,0014$ ) v porovnání s věkově korelující skupinou bez aplikace 5-ITU (Obr. 20).



### 3.3.2.3. Spontánní epileptické záchvaty

Validita LiCl-pilokarpinového modelu SE pro jeho vztah k manifestaci epilepsie byla prokázána přítomností spontánních epileptických záchvatů u 3 vybranných skupin zvířat po SE reprezentující infantilní, juvenilní období a adolescenci – 15-, 32- a 45-denní zvířata. U kontrolních zvířat všech skupin nebyl zachycen žádný záchvat po dobu 24 hodinového V-EEG monitorování. Rovněž v odstupu 3 dnů po LiCl-pilokarpinovém SE nebyla u 15-denních zvířat zaznamenána spontánní epileptiformní aktivita. Spontánní epileptické záchvaty byly pozorovány až v delším odstupu po SE. Spontánní epileptická aktivita byla prokázána u 50% 32-denních zvířat a 40% 45-denních zvířat po SE. Zvířata se spontánní epileptiformní aktivitou vykazovala signifikantní rozdíly v průměrném množství 3,6 záchvatu u 32-denních zvířat a 3,25 záchvatu u 45-denní skupiny po SE (Obr. 21). Semiologicky záchvaty u 32- a 45-denních zvířat odpovídaly typickému fokálnímu automotorickému záchvatu – oroalimentární automatismy a zárazy v chování. Ani v jednom případě nebyl pozorován záchvat s přechodem do bilaterálně tonicko-klonického záchvatu.



**Obr. 21. (A) Počet spontánních epileptických záchvatů po navození LiCl-pilokarpinového SE (průměr + individuální hodnoty) |**

Osa X: zleva doprava – u 15-, 32- a 45-denních potkanů po SE. Osa Y: počet spontánních záchvatů. Jedna hvězdička - signifikantní rozdíl v porovnání s 15-denní skupinou po SE s hladinou významosti  $p < 0,05$ . Detaily uvnitř obrázku.

**(B) Ukázka elektrografického záchvatu u 32-denního potkana po SE | Zeshora dolů: EEG signál z levého sensorimotorického kortexu, levého dorzálního hipokampu, pravého sensorimotorického kortexu, pravého dorzálního hipokampu. Detaily uvnitř obrázku.**

U zvířat, kterým předcházela aplikace inhibitoru 5-ITU 2 hodiny po ukončení SE a s odstupem 24 hodin, byla prokázána nejen redukce incidence spontánních záchvatů ale i celkového počtu spontánních epileptických záchvatů u 32- a 45-denní skupiny zvířat. V obou skupinách po SE došlo k rozvoji spontánních záchvatů pouze u 30% zvířat. Průměrné množství spontánních záchvatů u 32-denní skupiny bylo 2 záchvaty, u 45-denní skupiny 1,3 záchvatu na jednotlivé zvíře se spontánními záchvaty (Obr. 21). Změnám v semiologii záchvatů nedošlo v porovnání se skupinou bez aplikace 5-ITU. Zmíněné změny však nedosáhly v porovnání s věkově korelujícími skupinami bez aplikace 5-ITU statistické významnosti, rovněž i s ohledem na nízký počet zvířat ve skupině.

#### 4. SOUHRNNÁ DISKUZE

##### ***Hypotéza 1: Role adenosinových receptorů A1 uplatňujících se v metabolismu adenosinu se v průběhu vývoje mozku mění a tím výrazně zasahuje do vývoje excitability hipokampu***

Adenosin zajišťuje svůj antikonvulzivní účinek prostřednictvím aktivace A1R (Dunwiddie a Masino, 2001). Adenosin zastává roli tzv. homeostatického regulátoru, který hraje významnou úlohu v řadě signálních drah a mechanismech podílejících se na patogenezi TLE (Boison a Aronica, 2015). TLE představuje nejčastější typ farmakorezistentní fokální epilepsie, u níž funkční i morfologické změny hipokampu jsou zásadním podkladem tohoto onemocnění.

Postnatální změny exprese adenosinových receptorů v CNS laboratorních potkanů a myší byly doposud studovány pouze okrajově (Geiger a kol., 1984; Johansson a kol., 1997). Exprese A1R rapidně stoupá v průběhu progresivní maturace neuronů a myelinizace (Rivkees a kol., 1995a), navíc v období od 10. až 15. dne po 25. až 40. den postnatálního vývoje dochází u A1R k výraznému zvýšení hustoty zastoupení a současně k dokončování funkční zralosti (Daval a kol., 1991; Descombes a kol., 1998). V disertační práci byl zdokumentován počáteční nesignifikantní nárůst exprese A1R od 7. po 10. den postnatálního vývoje, ve kterém dosáhl svého maxima. V průběhu další ontogeneze hipokampu následoval postupný pokles exprese A1R. Exprese A1R u 25-denních a starších zvířat byla signifikantně nižší v porovnání s 10- a 12-denní skupinou zvířat. Srovnání našich výsledků je možné jen se studii prováděnými *in vitro* (*in situ hybridizace*), které v minulosti poodhalily významné rozdíly v expresi A1R v průběhu vývoje. Dle těchto studií je již při narození zastoupen A1R v neokortexu a subkortikálních strukturách (Marangos a kol., 1982; Geiger a kol., 1984), v porovnání s dospělými jedinci ale dosahuje přibližně 10% jejich celkového zastoupení. Od narození dochází k prudkému nárůstu exprese A1R, svého maxima dosahuje v průběhu 2. postnatálního týdne (Marangos a kol. 1982; Rivkees a kol., 1995a; Descombes a kol., 1998). Konkrétní údaje o expresi A1R v hipokampu u nezralého mozku ale nebyly doposud popsány.

A1R jsou široce zastoupené napříč různými typy buněk včetně buněk vaskulárního endotelu. S vývojem a růstem endotelových buněk v procesu tzv. angiogeneze dochází ke zvýšení exprese A1R (Clark a kol., 2007; Mills a kol., 2011). Angiogeneze dosahuje v mozku laboratorního potkana svého maxima v průběhu prvních 4 týdnů postnatálního vývoje (Ogunshola a kol., 2000). Předpokládáme, že pokles exprese u 25-, 32- a 52- denních potkanů

ve srovnání s dosavadní literaturou by mohl být ovlivněn právě zastoupením endotelových buněk v hipokampech. Jednalo by se o možné vysvětlení rozdílu ve výsledcích této disertační práce a předchozích publikací, které se zabývaly zastoupením A1R v hipokampu *in vitro* (Marangos a kol., 1982; Rivkees a kol., 1995b; Decombes a kol., 1998). Změny v expresi A1R v hipokampu v průběhu přirozeného vývoje jsou předpokladem pro studium farmakologických účinků jednotlivých analog A1R za účelem vývoje nových možností terapie neurologických onemocnění včetně epilepsie.

***Hypotéza 2: Cíleným farmakologickým ovlivněním A1R lze excitabilitu hipokampu modulovat, avšak účinek se v průběhu ontogenetického vývoje mozku mění***

Cílená aktivace A1R byla již dříve spojena s potlačením epileptiformních výbojů studovaných na hipokampálních řezech u nedospělých jedinců potkana (Tancredi a kol., 1998), avšak podrobnosti o roli a možnosti ovlivnění A1R *in vivo* v jednotlivých fázích vývoje mozku nebyly doposud popsány. Vůbec poprvé se prostřednictvím této práce studoval účinek A1R agonisty CCPA na excitabilitu hipokampu v průběhu jeho ontogeneze. A1R agonisté působí nejen na postsynaptické receptory, ale rovněž na presynaptické receptory (Cechova a kol., 2010). Inhibiční účinek adenosinu a jeho selektivních agonistů je zajištěn vazbou na presynaptické A1R, kdy dochází k ovlivnění napěťově řízených  $Ca^{++}$  kanálů a tím se tlumí uvolňování glutamátu. Současně nárůstem koncentrace adenosinu nebo působením selektivních agonistů A1R dochází k ovlivnění napěťově řízených  $K^{+}$  kanálů na postsynaptické membráně a dochází k hyperpolarizaci (Klishin a kol., 1995; de Mendonca a Ribeiro, 1993; Greene a Haas, 1991). Mimo mechanismy na úrovni synaptické membrány se adenosin uplatňuje i v nonsynaptickém přenosu vzruchu. Právě nesynaptické děje se mohou uplatňovat v synchronizaci epileptiformní aktivity (Taylor a Dudek, 1982). Agonisté A1R se tak mohou výrazně podílet i na zvýšení nonsynaptického přenosu.

Excitabilita hipokampu byla v disertační práci zkoumána pomocí modelu hipokampálních ADs, který patří mezi nejužívanější modely pro studium TLE (Gorter a kol., 2016). V průběhu přirozeného vývoje mozku byl popsán antikonvulzivní účinek agonisty A1R s výjimkou 25-denních potkanů, kde byl pozorován přesně opačný efekt. Dominující antikonvulzivní účinek CCPA byl sledován i v případě prací s využitím modelu kortikálních ADs u mláďat (Pometlova a kol., 2010; Mares, 2014). U 25-denní skupiny zvířat nedošlo po aplikaci CCPA ke změně délky trvání kortikálních ADs (Mares, 2014). V této práci bylo u hipokampálních ADs zaznamenáno dokonce prodloužení, tedy prokonvulzivní účinek CCPA.

Změny v expresi A1R ve vztahu s prokázaným účinkem agonisty A1R na hipokampální ADs mohou být vysvětleny nejen změnou celkového počtu A1R v hipokampu, ale i změnou vazebné kapacity a afinity těchto receptorů. A1R snižují svoji afinitu a vazebnou kapacitu s dospíváním (Cunha a kol., 1995). Aplikací agonistů A1R bylo prokázáno sekundární zvýšení koncentrace extracelulárního adenosinu (Boison, 2005), který společně s klesající afinitou a vazebnou kapacitou A1R v průběhu vývoje vede k jeho dalšímu nárůstu.

Rychlý nárůst koncentrace adenosinu byl rovněž pozorován jako následek přímé kortikální stimulace (Schultz a Lewenstein 1978; Lewin a Bleck, 1981). Vyrůstající koncentrace adenosinu navozená i repetitivní stimulací zvyšuje práh k vyvolání záchvatu (Huber a kol., 2001). Současně byly pozorovány změny samotných A1R v důsledku opakovaných epileptických záchvatů, ale i indukovanou repetitivní stimulací. V literatuře byly popsány u dospělých zvířat v návaznosti na proběhlou epileptickou aktivitu současně změny v densitě A1R. V některých pracích bylo prokázáno snížení density A1R (Ekonomou a kol. 2000; Rebola a kol., 2003a), tak zvýšení (Daval a Werck, 1991a) nebo nevedlo k žádným změnám (Simonato a kol., 1994). Po opakované epileptické aktivitě, spontánní nebo indukované, byly navíc popsány změny v metabolismu adenosinu – např. zvýšení uvolňování ATP (Wieraszko a Seyfried, 1989), zvýšení aktivity ecto-5-nucleosidás (Rebola a kol., 2003b), snížení hustoty nukleosidových transporterů (Pagonopoulou a Angelatou, 1992). Tyto změny vedou k další tvorbě a navýšení dostupnosti adenosinu (Rebola a kol., 2003a).

Adenosin preferenčně aktivuje dominantně prokonvulzivní A2R místo A1R (Cunha a kol., 1996). Vývojové studie A2AR odhalily jejich nízkou vazebnou kapacitu krátce po narození, ovšem krátce po narození dochází k rapidnímu nárůstu vazeb, navýšení koncentrace adenosinu může navíc tento proces v CNS akcentovat (Cunha a kol., 1995; Doriát a kol., 1996). Konkrétně v hipokampu byly v minulosti popsány i vývojové změny na úrovni A1R a A2R. Vazebná kapacita, tedy hustota vazeb pro adenosin a jeho ligandy, se s vývojem hipokampu u A1R snižuje, u A2AR je situace opačná (Cunha a kol., 1995). Výsledky disertační práce podporují, že s klesající afinitou A1R a aplikací agonisty A1R v různých fázích vývoje je aktivace A2AR akcentována.

Aktivací A2AR dominují zejména prokonvulzivní účinky, nicméně byly popsány i účinky antikonvulzivní (Huber a kol., 2002). V závislosti na užití agonistů A1R u konkrétních modelů epileptických záchvatů byly pozorovány oba dva protichůdné účinky v důsledku aktivace A2AR (Klitgaard a kol., 1993). Současně nelze vyloučit i interakci agonistů A1R s jinými neurotransmitery (např. glutamát, GABA) podílejících se významně na excitabilitě

mozku, které rovněž podléhají změnám v průběhu vývoje. Např. GABAergní systém se stává dominantním inhibičním systémem v CNS až v průběhu 3. týdne postnatálního vývoje (Sanchez a Jensen, 2001). Ve zralém dospělém mozku zajišťuje aktivace ionotropních GABAA receptorů selektivní proudění  $\text{Cl}^-$  iontů dovnitř buňky a tím navozuje hyperpolarizaci. Hyperpolarizace působí inhibiční účinek na přenos nervových vzruchů a tím snižuje šanci na úspěšné vedení akčního potenciálu. Ovšem v situaci jako je opakovaná spontánní epileptická záchvatovitá aktivita nebo navození epileptiformních výbojů stimulací dochází k nadměrné kumulaci iontů  $\text{Cl}^-$  intracelulárně. Tím začnou  $\text{Cl}^-$  proudit v opačném směru a dojde tím ke změně hyperpolarizace na depolarizaci, výsledkem je excitační účinek (Isomura a kol., 2003; Viitanen a kol., 2010).

Důležitým aspektem v našich výsledcích je upozornění na roli poločasu rozpadu adenosinových analog. V případě exogenních analog je výrazně vyšší v porovnání s endogenním adenosinem (Layland a kol., 2014). Poločas rozpadu adenosinu se pohybuje okolo 1-2 sekund (Camm a Garrat, 1991). Analoga adenosinu zvyšují svůj poločas rozpadu zejména díky rezistenci k jeho metabolisujícím enzymům (Pavan a Ijzerman, 1998). Bohužel ale nejsou známy přesné údaje ohledně poločasu rozpadu agonisty A1R CCPA. Nicméně strukturálně blízký A1R analog N6-cyclopentyladenosin (CPA) dosahuje poločasu rozpadu v krvi laboratorního potkana okolo 25 minut (Mathot a kol., 1993; Pavan a Ijzerman, 1998). V současnosti máme obecně jen velmi málo informací o metabolismu analog A1R (Bier a kol., 2006), o CCPA údaje v literatuře zcela chybí. Ovšem lze předpokládat, že adenosinová analoga budou využívat k transportu přes HEB rovněž systém adenosinových transportérů (Comford a Oldendorf, 1975). Podrobnější a doplňující studium metabolismu agonistů A1R s ohledem na komplexní vývojové aspekty by mohlo vést k lepšímu porozumění mechanismu jejich účinku a využití v klinické praxi.

### ***Hypotéza 3: Změny v zastoupení a funkci enzymu ADK a jeho isoform mohou být jedním z mechanismů epileptogeneze v nezralém mozku po proběhlém SE***

Časový profil rozvoje elektroencefalografického a/nebo záchvatu s behaviorálním korelátem v návaznosti na indukovaný SE v rané fázi vývoje mozku je předmětem intenzivního výzkumu včetně této disertační práce. LiCl-pilokarpinový model SE patří mezi nejčastější a široce rozšířené animální modely ke studiu TLE (Curia a kol., 2008). U TLE je zvýšená excitabilita hipokampu předpokladem rozvoje epilepsie, charakterizované opakovanými spontánními epileptickými záchvaty (Sloviter, 1994). Navození či spontánní

rozvoj SE vede k širokému spektru strukturálních, metabolických, buněčných i molekulárních změn (Dudek a Staley, 2011; Löscher a kol., 2015). V této disertační práci byl použit model LiCl-pilokarpinového SE navozený 12. den postnatálního vývoje laboratorního potkana.

LiCl-pilokarpinový SE má za následek zejména úbytek neuronů hipokampu (Dinocourt a kol., 2003; Nairismägi a kol., 2006; Scholl a kol., 2013). Souvislost ztráty neuronů v hipokampu a jeho zvýšenou excitabilitou u zralého mozku je dlouhodobě známá (Furtado a kol., 2011). Nicméně alterace hipokampu v LiCl-pilocarpinovém modelu u mláďat byla opakovaně prezentována s často rozdílnými výsledky excitability (Cavalheiro a kol., 1987; Ekstrand a kol., 2011; Lynch a kol., 2000). Tato disertační práce kombinuje model iniciálního inzultu (LiCl-pilokarpinový model SE) a model ke studiu excitability *in vivo* (model hipokampálních ADs).

Model hipokampálních ADs je jedním z modelů přímé kortikální stimulace, který slouží ke simulaci fokálních temporálních záchvatů (Kandratavicius a kol., 2014). Behaviorálním projevem epileptiformní aktivity, která je generována v hipokampu nebo je projevem šíření, jsou typické mimovolní automatismy charakteru „wet dog shakes“ (WDS) (Frush a kol., 1986). WDS nejsou zpravidla pozorovány v raných fázích vývoje mozku laboratorního potkana, konkrétně do 2 týdnů postnatálního vývoje (Veliskova a kol., 1988). V případě stimulace hipokampu v tomto věku se spoléháme na typickou morfologii hipokampálních ADs. Začátek iktální aktivity představuje iniciální vysokofrekvenční aktivita s epileptiformními hroty následovaná pomalou delta vyšší amplitudy, která postupně zrychluje do pásma theta až alfa se současně klesající amplitudou. Základní morfologie hipokampálních ADs u pacientů s TLE je obdobně charakterizována iniciálními vysokofrekvenčními repetitivními výboji, tzv. polyspikes (Gollwitzer a kol., 2018).

Hipokampální ADs byly v této disertační práci podrobeny hlubšímu zkoumání. Charakteristiky hipokampálních ADs, zejména délka trvání a práh k vyvolání ADs, patří mezi běžně studované parametry v klinické praxi a byly zásadními sledovanými parametry v této disertační práci. Prodloužení délky a snížení prahu ADs patří mezi základní projevy zvýšené excitability mozkových struktur u přímé kortikální stimulace implantovaných pacientů s epilepsií (Gollwitzer a kol., 2018).

V rámci přirozeného vývoje mozku nebyly v disertační práci prokázány žádné signifikantní rozdíly v délce trvání hipokampálních ADs (tedy mezi kontrolními skupinami). Výsledky však odhalily věkové rozdíly v délce trvání ADs po iniciálním inzultu, tedy v návaznosti na LiCl-pilokarpinový SE.



Vyvolání LiCl-pilokarpinového SE u 12-denního potkana prokazatelně vedlo ke změnám excitability hipokampu. LiCl-pilokarpinový SE vedl ke snížení excitability této struktury po 3 dnech od jeho vyvolání. Oproti tomu v odstupu 20 dnů po SE byla excitabilita výrazně vyšší. Tyto poznatky jsou v souladu s předchozími publikovanými pracemi (Sankar a kol., 1998; dos Santos, 2000). Současně s časovým odstupem od vyvolaného SE u 32-denních a 45-denních potkanů byl prokázán rozvoj spontánních epileptických záchvatů a manifestace TLE. Tyto výsledky potvrzující validitu modelu jsou podpořeny řadou původních prací včetně našeho pracoviště (Kubova a kol., 2004). Manifestace spontánních epileptických záchvatů a rozvoj TLE nemusí být nutně podložena atrofií hipokampu danou úbytkem nervových buněk (Baram a kol., 2011). Proto potlačení nekrózy buněk a tím atrofie hipokampu nemusí být dostatečná k prevenci rozvoje epilepsie (Brandt a kol., 2003). Mechanismy, které se působením LiCl-pilokarpinového SE podílejí na zvýšení excitability hipokampu a rozvoji TLE zahrnují dále např. ovlivnění receptorů excitačních AMK a jejich transportérů (Zhang a kol., 2004), synaptické reorganizace (Sankar a kol., 2000), navození oxidativního stresu a mitochondriální dysfunkce (Folbergova a kol., 2016). Inzulaty CNS včetně SE vedou k aktivaci astrocytů a navození astrogliózy (Klein a kol., 2018). Astroglióza je spektrum změn astrocytů charakterizované jejich abnormální proliferací, růstem i změnou funkce na podkladě poškození CNS (Vizuite a kol., 2017). Astroglióza se významným podílem uplatňuje ve změnách excitability mozku a rozvoji epilepsie nejen v dospělosti, ale i v rámci raného vývoje mozku (Klein a kol., 2018; Rizzi a kol., 2003; Sofroniew a kol., 2010; Vezzani a kol., 2008; Vizuite a kol., 2017). Řada klinických a experimentálních studií odhalila vztah mezi hladinou inhibičních mediátorů v extracelulárním prostředí mozku a vznikem epileptického záchvatu (Anschel a kol., 2004; Miranda a kol., 2014; Soukupova a kol., 2014). Jedním z přirozených obranných mechanismů po záchvatu je narůstání koncentrace extracelulárního adenosinu (Ilie a kol., 2012), který působí jako endogenní neuromodulátor excitability mozku (Dunwiddie, 1980; Dunwiddie a Masino, 1981). Zejména astrocyty jsou úzce zapojeny do metabolismu adenosinu (Boison a kol., 2018).

Recentní poznatky ukazují, že posílení účinku adenosinergního systému by mohlo být účinnou strategií k potlačení vnímavosti hipokampu v rozvoji spontánních epileptických záchvatů (Boison, 2005). Antikonvulzivní účinek adenosinu byl již v minulosti popsán u několika modelů SE včetně modelu LiCl-pilokarpinového SE (George a kol., 1997; Khan a kol., 2000). Adenosin kvůli svým farmakokinetickým vlastnostem se svým krátkým poločasem rozpadu okolo 1-2 sekund (Camm a Garrat, 1991) však není vhodným kandidátem

k ovlivnění excitability hipokampu ve farmakologickém užití a výhledově v klinické praxi. Největšího pokroku a slibných výsledků doposud dosáhlo ovlivnění adenosinergního systému pomocí inhibice ADK (Boison, 2008b; Boison, 2013).

Enzym ADK zásadním způsobem reguluje koncentraci adenosinu v extracelulární tekutině (ECT) v mozku (Etherington a kol., 2009; Boison a kol., 2006). Upregulace tohoto enzymu souvisí se zvýšením excitability nervových buněk v důsledku snížení koncentrace adenosinu (Li a kol., 2007; Theofilas a kol., 2011). Recentní vědecké práce odhalily existenci dvou isoform ADK – ADK-S a ADK-L (Cui a kol., 2009). Isoforma ADK-S se významně podílí na modulaci hladiny adenosinu v ECT (Boison, 2013). Oproti tomu se isoforma ADK-L uplatňuje jako epigenetický modulátor, zejména v metylaci DNA (Williams a Karnesky, 2013).

Doposud existuje velmi málo údajů o úloze jednotlivých isoform ADK v průběhu vývoje mozku. Bylo prokázáno, že v průběhu raného vývoje mozku dochází ke změně exprese ADK z neuronů směrem k dominující expresi v astrocytech (Studer a kol., 2006). Podobně se mění exprese jednotlivých isoform, od narození dominuje exprese isoformy ADK-L, postupem času ovšem exprese ADK-L klesá a začíná se zvyšovat exprese ADK-S (Ciu a kol., 2009). ADK-S isoforma dominuje po dokončeném 3. týdnu postnatálního vývoje (Ciu a kol., 2009). V hipokampu dochází k zásadní změně neuronální exprese ADK ve prospěch astrocytů na přelomu 1. a 2. postnatálního týdne, současně se mění zastoupení isoformy ADK-L ve prospěch isoformy ADK-S (Kiese a kol., 2016).

Disertační práce byla zaměřena na podrobnější studium změn v expresi obou isoform ADK (ADK-L i ADK-S) v průběhu přirozeného vývoje hipokampu a vůbec poprvé v návaznosti na LiCl-pilokarpinový SE. Výsledky poukázaly na postupné zvýšení exprese isoformy ADK-S v průběhu vývoje hipokampu v zastoupených reprezentativních věkových skupinách. S výjimkou 25-denní skupiny zvířat byly prokázány signifikantní rozdíly u 18-denních a starších jedinců v porovnání s nejmladší sledovanou skupinou zvířat. V případě isoformy ADK-L žádné rozdíly v expresi v průběhu přirozeného vývoje mozku zaznamenány nebyly. Snižující se poměr ADK-L/-S reflektoval postupně dominující expresi isoformy ADK-S v průběhu vývoje. Tyto poznatky jsou v souladu s výsledky velmi aktuálních prací, kde je prokázána dominující exprese isoformy ADK-S nad ADK-L isoformou (Gebriel a kol., 2020; Gebriel a kol., 2021). Jednalo se však o údaje 7-, 15- a 21-denních zvířat, navíc pouze ze somatomotorického kortexu a mozečku (Gebriel a kol., 2021). V disertační práci byla stanovena exprese isoform ADK v hipokampu ve stejných věkových skupinách, současně

však i ve skupině odpovídající perinatálnímu (10- a 12-denní), infantilnímu (18-denní), juvenilnímu (25- a 32-denní) období a adolescenci (45-denní zvířata). Výsledky z hipokampu byly v souladu s profilem vývoje poměru ADK-L/-S v hipokampu (Kiese a kol., 2016), tyto poznatky disertační práce prohlubuje o znalost dalších věkových skupin.

Vůbec poprvé byly prezentovány výsledky exprese ADK v návaznosti na LiCl-pilokarpinový SE indukovaný 12. postnatální den. Původní práce popisují nárůst exprese ADK v návaznosti na akutní inzulty různé etiologie (např. hypertermie, traumatické poškození, kainátový SE) (Aronica a kol., 2011; Boison a kol., 2010). V bezprostřední návaznosti na vyvolání SE navíc dochází k rapidní downregulaci ADK (Gorter a kol., 2006; Sandau a kol., 2019). Pokles exprese ADK v hipokampu byl pozorován u modelu kainátového SE u myši v dospělosti (Williams a Karnesky, 2013; Sandau a kol., 2019). Downregulace ADK v návaznosti na jakýkoliv inzult vede ke zvýšení koncentrace adenosinu a představuje tím významný endogenní obranný mechanismus k potlačení záchvatové aktivity mozku (Pignataro a kol., 2008). Zastoupení jednotlivých isoform ADK po inzultu však nebylo nikdy doposud publikováno.

V této práci byl prokázán pokles ADK v krátkém odstupu (2 hodiny) po skončení SE pouze u isoformy ADK-L oproti kontrolní skupině. Tento výsledek je v souladu s dříve publikovanými výsledky pro ADK (Pignataro a kol., 2008). Naopak ve stejném intervalu došlo k signifikantnímu nárůstu isoformy ADK-S oproti kontrolám. S delším časovým odstupem po ukončení SE byl zaznamenán statisticky významný rozdíl v expresi isoformy ADK-L u 15- a 32-denních zvířat v porovnání s 12-denní skupinou zvířat po SE. U 15- a 32-denní skupiny po SE vůči stejně starým kontrolám signifikantní rozdíly v případě isoformy ADK-L zaznamenány nebyly. Obě starší skupiny zvířat, kontroly i po SE, nevykazovaly žádný rozdíl v expresi u isoformy ADK-S vůči věkově odpovídajícím skupinám. Výběr věkové skupiny 15- i 32-denní skupiny zvířat pro stanovení exprese isoform ADK byl zvolen na základě předchozích výsledků stimulační části experimentu.

Narůstající poměr ADK-L/-S u zvířat po SE reflektuje narůstající expresi isoformy ADK-L oproti ADK-S, v porovnání s přirozeným vývojem je tedy výsledek opačný. Výsledky disertační práce podporují hypotézu, že změny excitability hipokampu po indukovaném LiCl-pilokarpinovém SE mohou souviset s dysregulací obou isoform ADK. Lze usuzovat, že isoforma ADK-L je více zodpovědná za změny excitability hipokampu a uplatňuje se významněji v rozvoji epilepsie než isoforma ADK-S (Kobow a kol., 2011; Miler-Delaney a kol., 2012).

#### ***Hypotéza 4: Inhibice ADK může představovat účinnou léčbu zvýšené excitability hipokampu po vyvolaném SE v různých fázích ontogenetického vývoje mozku***

Farmakologická inhibice ADK vede k rapidnímu poklesu koncentrace adenosinu v ECT (Gouder a kol., 2004; Wiesner a kol., 1999). Obdobně i vysoce selektivní inhibitor ADK 5-ITU (Ugarkar a kol., 2000), který byl použit v disertační práci, má prokázaný efekt na redukcii uvolnění glutamátu prostřednictvím zvýšení koncentrace adenosinu (Pak a kol., 1994; Pazzagli a kol., 1995). Pokles frekvence, délky trvání a incidence záchvatů byl v návaznosti na inhibici ADK prokázán u řady experimentálních modelů (Ugarkar a kol., 2000; Sandau a kol., 2019; Wiesner a kol., 1999). Po aplikaci 5-ITU došlo k významné redukci epileptiformní aktivity v modelu indukovaných záchvatů po aplikaci bikukulinu (Zang a kol., 1993) a modelu SE navozeného kainátem (Gouder a kol., 2004). Doposud však nebyl efekt 5-ITU zkoumán v průběhu vývoje mozku.

Jedním z cílů disertační práce bylo zkoumat účinek 5-ITU na excitabilitu hipokampu ve vývojových stadiích mozku laboratorního potkana korelujících s lidským perinatálním, předškolním (infantilním) a školním (juvenilním) obdobím. Hipokampální ADs byly potlačeny u 32-denní skupiny po LiCl-pilokarpinovém SE v obou sledovaných parametrech – délce trvání ADs i prahu k jejich vyvolání. Prodloužení hipokampálních ADs a snížení prahu u stejné věkové skupiny po SE nasvědčují tomu, že zásadní úlohu v regulaci excitability hipokampu v návaznosti na SE zastává ADK. Pokles incidence a celkového počtu spontánních epileptických záchvatů po brzké aplikaci 5-ITU po inzultu v podobě SE podporuje tuto domněnku. Výsledky však musí být potvrzeny na větší skupině zvířat.

Bohužel přesné mechanismy účinku inhibitoru ADK 5-ITU nejsou touto prací kompletně vysvětleny, částečně i v důsledku technických limitací. Zcela zásadní je velmi obtížná přímá detekce adenosinu v průběhu ADs, který by naši hypotézu podporoval. Zmiňovaný velmi krátký poločas rozpadu endogenního adenosinu (Camm a Garrat, 1991; Jarvis a kol., 2019), konstantní obnova a degradace adenosinu (Lietsche a kol., 2016) představují pro běžné metody detekce *in vivo* (např. mikrodialýza) vysoké riziko chyby měření. Metody jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) a kapilární elektroforéza nejsou vhodné pro detekci *in vivo* v reálném čase (Gaudin a kol., 2015). Další limitací v interpretaci našich výsledků je nemožnost dlouhodobé monitorace spontánních záchvatů u mláďat laboratorního potkana. V důsledku nedokončené osifikace lebky by dlouhodobá fixace elektrod pomocí duracrolu na lebce vedla k předčasné synostóze lebečních

švů (Fritz a kol., 1970). Výsledkem by byla deformita lebky s vysokým rizikem poškození mozku. Rovněž rapidní nárůst mozkové tkáně, dozrávání myelinizace atd. by v důsledku dlouhodobé implantace elektrod vedlo k ovlivnění těchto procesů. Při dlouhodobé implantaci by rovněž docházelo ke změně požadované lokalizace elektrod. Semiologie záchvatů by mohla být negativně ovlivněna zhoršenou mobilitou v důsledku duracrolové čepice s připojovacím kabelem. Využití bezdrátového připojení by bylo limitováno vysokou pořizovací cenou a výrazným zatížením okolními artefakty.

## 5. ZÁVĚRY

Bližší pochopení podkladových mechanismů epileptogeneze včetně uplatnění adenosinergního systému je klíčem k vytvoření teoretických základů preklinických studií pro nové možnosti terapie epilepsie. Disertační práce demonstrovala několik zásadních výsledků s vysokým potenciálem k využití v klinické praxi epileptologa.

**Hypotéza 1 - POTVRZENA:** V první části disertační práce byl studován vývojový profil A1 receptorů (A1R), který se zásadním způsobem uplatňuje v patogenezi epilepsie (Boison a Aronica, 2015). Změny v expresi A1R v hipokampu v různých fázích vývoje se výrazně podílí na změnách excitability této struktury. Zvýšená exprese A1R v hipokampu v raných fázích jeho vývoje je spojena se snížením excitability.

**Hypotéza 2 - POTVRZENA:** Byl prokázán měnlivý antikonvulzivní účinek agonisty A1R CCPA v závislosti na fázích vývoje hipokampu. Z výsledků disertační práce lze usuzovat, že užití A1R agonisty CCPA v odpovídající fázi vývoje by mohlo vést k dosažení antikonvulzivního účinku. Posílení antikonvulzivního účinku adenosinu užitím agonistů A1R kvůli rezistenci k adenosin metabolisujícím enzymům by mohlo představovat budoucí terapeutickou možnost ovlivnění délky a frekvence epileptických záchvatů.

**Hypotéza 3 - POTVRZENA:** Disertační práce objasnila vývojový profil isoform ADK v nezralém mozku v průběhu přirozeného vývoje a v návaznosti na LiCl-pilocarpinový SE. Výsledky nasvědčují, že změny v expresi isoform ADK po prodělaném inzultu hrají významnou roli v excitabilitě vyvíjejícího se hipokampu.

**Hypotéza 4 - POTVRZENA:** Zejména zvýšení exprese isoformy ADK-L v návaznosti na SE může vysvětlit zvýšení excitability hipokampu. Užitím selektivního inhibitoru ADK 5-ITU bylo dosaženo výrazného poklesu excitability hipokampu po SE. Navíc jeho užitím krátce po indukci SE bylo dosaženo snížení incidence spontánních záchvatů. Došlo tedy ke snížení rizika rozvoje epilepsie po tomto konkrétním iniciálním inzultu. Inhibitory ADK by na základě těchto dat mohly představovat nový mechanismus léčby epilepsie. V budoucnu by mohly najít uplatnění v prevenci, tedy zabránění manifestace epilepsie po určitých typech rizikových inzultů mozku. Navzdory velmi pokrokovému a intenzivnímu výzkumu ve snaze o vývoj nových preparátů antiepileptické medikace, neexistuje doposud žádná možnost

farmakologické prevence, která by výrazně snížila či dokonce zamezila rozvoji spontánních epileptických záchvatů a epilepsie. Inhibitory ADK by mohly představovat jednoho ze slibných kandidátů dalšího výzkumu s vysokým potenciálem uplatnění v klinické praxi.

## 6. PUBLIKACE AUTORA

### Publikace s impakt faktorem vztahující se k disertační práci

**Fabera, P.**, Uttl, L., Kubova, H., Tsenov, G., Mares, P. (2022). Adenosine kinase isoforms in the developing rat hippocampus after LiCl/Pilocarpine status epilepticus. *Int J Mol Sci.* 24;23(5):2510. doi: 10.3390/ijms23052510. PMID: 35269653; PMCID: PMC8910300.

**IF = 5,924 (2022)**

**Fabera, P.**, Parizkova, M., Uttl, L., Vondrakova, K., Kubova, H., Tsenov, G., Mares, P. (2019). Adenosine A1 Receptor Agonist 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine and Hippocampal Excitability During Brain Development in Rats. *Front Pharmacol.* 14; 10:656. doi: 10.3389/fphar.2019.00656. PMID: 31258477; PMCID: PMC6587156.

**IF = 4,22 (2019)**

**Fabera, P.**, Mares, P. (2014). Effect of GABA(B) receptor agonist SKF97541 on cortical and hippocampal epileptic afterdischarges. *Physiol Res.* 63(4):529-34. doi: 10.33549/physiolres.932699. Epub 2014 Apr 3. PMID: 24702499.

**IF = 1,293 (2014)**

### Publikace s impakt faktorem bez vztahu k tématu disertace

**Fabera, P.**, Krijtova, H., Tomasek, M., Krysl, D., Zamecnik, J., Mohapl, M., Jiruska, P., Marusic, P. (2015). Familial temporal lobe epilepsy due to focal cortical dysplasia type IIIa. *Seizure.* 31:120-123. doi: 10.1016/j.seizure.2015.07.014. Epub 2015 Jul 26. PMID: 26362388.

**IF = 2,536 (2015)**

### Publikace bez impakt faktoru bez vztahu k tématu disertace

Ono, T., Wagenaar, J., Giorgi, F.S., **Fabera, P.**, Hanaya, R., Jefferys, J., Moyer, J.T., Harte-Hargrove, L.C., Galanopoulou, A.S. (2018). A companion to the preclinical common data elements and case report forms for rodent EEG studies. A report of the TASK3 EEG Working



Group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. *Epilepsia Open*. 24; 3 (Suppl 1):90-103. doi: 10.1002/epi4.12260. PMID: 30450486; PMCID: PMC6210053

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Abdelmalik, P. A., Burnham, W. M., Carlen, P. L. (2005). Increased seizure susceptibility of the hippocampus compared with the neocortex of the immature mouse brain in vitro. *Epilepsia* 46(3): 356-366.
- Annegers, J.F., Hauser, W.A., Coan, S.P., Rocca, W.A. (1998). A populationbased study of seizures after traumatic brain injuries. *N Engl J Med.* 338: 20-24.
- Anschel, D.J., Ortega, E.L., Kraus, A.C., Fisher, R.S. (2004): Focally injected adenosine prevents seizures in the rat. *Exp. Neurol.* 190:544-547.
- Aroniadou-Anderjaska, V., Fritsch, B., Qashu, F., Braga, M.F. (2008). Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res.* 78(2-3): 102-16.
- Aronica, E., Zurolo, E., Iver A, de Groot, M., Anink, J., Carbonell, C., van Vliet, E.A., Baaven, J.C., Boison, D., Gorter. J.A. (2011). Upregulation of adenosine kinase in astrocytes in experimental and human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52(9): 1645-55.
- Ault, B., Wang, C. M. (1986). Adenosine inhibits epileptiform activity arising in hippocampal area CA3. *Br. J. Pharmacol.* 87(4): 695-703.
- Baram, T.Z.; Jensen, F.E.; Brooks-Kayal, A. (2011) Does acquired epileptogenesis in the immature brain require neuronal death? *Epilepsy Curr* 11: 21-26.
- Bartolomei, F., Khalil, M., Wendling, F., Sontheimer, A., Régis, J., Ranjeva, J. P., Guye, M., Chauvel, P. (2005). Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia* 46(5): 677-687.
- Bertram, E.H., Cornett, J. (1993). The ontogeny of seizures in a rat model of limbic epilepsy: Evidence for a kindling process in the development of chronic spontaneous seizures. *Brain Res* 625: 295-300.
- Biagini, G., D'Antuono, M., Benini, R., Guzman, P., Longo, D., Avoli, M. (2013). Perirhinal cortex and temporal lobe epilepsy. *Front. Cell. Neurosci.* 7:130.
- Bier, D., Holschbach, M. H., Wutz, W., Olsson, R. A., & Coenen, H. H. (2006). Metabolism of the A(1)1 adenosine receptor positron emission tomography ligand [18F]8-cyclopentyl-3-(3-fluoropropyl)-1-propylxanthine ([18F]CPFPX) in rodents and humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34(4): 570-576.
- Boison, D. (2006). Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. *Trends Pharmacol Sci.* 27: 652-658.
- Boison, D. (2007). Adenosine-based cell therapy approaches for pharmaco-resistant epilepsies. *Neurodegener Dis.* 4: 28-33.
- Boison, D. (2005). Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist* 11: 25-36.
- Boison, D. (2006). Adenosine kinase, epilepsy and stroke: mechanisms and therapies. *Trends Pharmacol Sci* 27: 652-658.
- Boison, D. Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev* (2013) 65, 906-943.
- Boison, D. The adenosine kinase hypothesis of epileptogenesis. *Prog Neurobiol* (2008) 84, 249-262.
- Boison, D., Aronica, E. (2015). Comorbidities in Neurology: Is adenosine the common link? *Neuropharmacology* 97: 18-34.

- Boison, D., Steinhauser, C. (2018). Epilepsy and astrocyte energy metabolism. *Glia* 66: 1235-1243.
- Boison, D., Chen, J.F., Fredholm, B.B. (2010). Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* 17: 1071-1082.
- Bragin, A., Penttonen, M., Buzsáki, G. (1997). Termination of epileptic afterdischarge in the hippocampus. *J. Neurosci.* 17(7): 2567-2579.
- Brandt, C., Potschka, H., Loscher, W., Ebert, U. (2003). N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 118: 727-740.
- Camm, A. J., Garratt, C. J. (1991). Adenosine and supraventricular tachycardia. *N. Engl. J. Med.* 325, 1621-1629.
- Cappellacci, L., Franchetti, P., Pasqualini, M., Petrelli, R., Vita, P., Lavecchia, A., Novellino, E., Costa, B., Martini, C., Klotz, K.N., Grifantini, M. (2005). Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling of ribose-modified adenosine analogues as adenosine receptor agonists. *J Med Chem.* Mar 10;48(5): 1550-1562.
- Carman, A.J., Mills, J.H., Krenz, A., Kim, D.G., Bynoe, M.S. (2011). Adenosine receptor signaling modulates permeability of the blood-brain barrier. *J Neurosci.* 31(37): 13272-13280.
- Cass, C.E., Young, J.D., Baldwin, S.A., Cabrita, M.A., Graham, K.A., Griffiths, M., Jennings, L.L., Mackey, J.R., Ng, A.M., Ritzel, M.W., Vickers, M.F., Yao, S.Y. (1999). Nucleoside transporters of mammalian cells. *Pharm Biotechnol.* 1999;12: 313-352.
- Cavalheiro, E.A., Mello, M.L., Leite, J.P. (2006). The pilocarpine model of seizures. In: Pitkanen, A., Schwartzkroin, P.A., Moshe, S.L. editors. *Models of seizures and epilepsy.* Elsevier; 433-448.
- Cavalheiro, E.A., Silva, D.F., Turski, W.A., Calderazzo-Filho, L.S., Bortolotto, Z.A., Turski L. (1987). The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Brain Res.* 465(1-2): 43-58.
- Cechova, S., Elsobky, A.M., Venton, B.J. (2010). A1 receptors self-regulate adenosine release in the striatum: evidence of autoreceptor characteristics. *Neuroscience* 171(4): 1006-1015.
- Clark, A. N., Youkey, R., Liu, X., Jia, L., Blatt, R., Day, Y. J., Sullivan, G. W., Linden, J., Tucker, A. L. (2007). A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circulation research*, 101(11): 1130–1138.
- Clifford, D.B., Olney, J.W., Maniotis, A., Collins, R.C., Zorumski, C.F. (1987). The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23: 953-968.
- Colella, A.D., Chegenii, N., Tea, M.N., Gibbins, I.L., Williams, K.A., Chataway, T.K. (2012). Comparison of stain-free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal. Biochem.* 430: 108-110.
- Cornford, E. M., Oldendorf, W. H. (1975). Independent blood-brain barrier transport systems for nucleic acid precursors. *Biochimica et biophysica acta* 394(2): 211-219.
- Cowan, L.D. (2002). The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 8:171-181.
- Cui, X.A., Singh, B., Park, J., Gupta, R.S. (2009). Subcellular localization of adenosine kinase in mammalian cells: The long isoform of AdK is localized in the nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 46-50.
- Cunha, R. A., Ribeiro, J. A. (2000). Purinergic modulation of [(3)H]GABA release from rat hippocampal nerve terminals. *Neuropharmacology* 39(7): 1156-1167.
- Cunha, R.A. (2001). Regulation of the ecto-nucleotidase pathway in rat hippocampal nerve terminals. *Neurochem Res.* 26: 979-991.

- Cunha, R.A. (2005). Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signaling* 1: 111-134.
- Cunha, R. A., Constantino, M. C., Sebastião, A. M., Ribeiro, J. A. (1995). Modification of A1 and A2a adenosine receptor binding in aged striatum, hippocampus and cortex of the rat. *Neuroreport* 6(11): 1583-1588.
- Cunha, R.A., Correia-de-Sa, P., Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A. (1996). Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br J Pharmacol.* 119: 253-260.
- Cunha-Reis, D., Fontinha, B.M., Ribeiro, J.A., Sebastiao, A.M. (2007). Tonic adenosine A1 and A2A receptor activation is required for the excitatory action of VIP on synaptic transmission in the CA1 area of the hippocampus. *Neuropharmacology* 52: 313-320.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R.S., Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172: 143-157.
- D'Adamo, M.C., Catacuzzeno, L., Di Giovanni, G., Franciolini, F., Pessia, M. (2013). K(+) channelopathy: progress in the neurobiology of potassium channels and epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 13:7: 134.
- Daval, J., Werck, M. (1991a). Autoradiographic changes in brain adenosine A1 receptors and their coupling to G proteins following seizures in the developing rat. *Brain Res Dev.* 59(2): 237-247.
- Daval, J.L., Werck, M.C., Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. (1991b). Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of adenosine A1 receptors and their coupling to G proteins in the rat brain. *Neuroscience* 40(3): 841-851.
- De Mendonça, A., Ribeiro, J. A. (1993). Adenosine inhibits the NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic potential in the hippocampus. *Brain research* 606(2): 351-356.
- De Sarro, G., De Sarro, A., Di Paola, E.D., Bertorelli, R. (1999). Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on audiogenic seizure-sensible DBA/2 mice. *Eur J Pharmacol* 371: 137-145.
- Descombes, S., Avoli, M., Psarropoulou, C. (1998). A comparison of the adenosine-mediated synaptic inhibition in the CA3 area of immature and adult rat hippocampus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 110(1): 51-59.
- Dinocourt, C.; Petanjek, Z.; Freund, T.F.; Ben-Ari, Y.; Esclapez, M. (2003). Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. *J Comp Neurol* 459: 407-425.
- Doriat, J. F., Humbert, A. C., and Daval, J. L. (1996). Brain maturation of high affinity adenosine A2 receptors and their coupling to G-proteins. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 93(1-2):1-9.
- dos Santos, N.F.; Arida, R.M.; Filho, E.M.; Priel, M.R.; Cavalheiro, E.A. Epileptogenesis in immature rats following recurrent status epilepticus. *Brain Res Rev.* (2000) 32(1), 269-276. DOI: 10.1016/s0165-0173(99)00089-2.
- Dudek, F.E., Staley, K.J. (2012). The time course and circuit mechanisms of acquired epileptogenesis. In Jasper's basic mechanisms of the epilepsies. National Center for Biotechnology Information, Bethesda.
- Dudek, F.E., Staley, K.J. (2011). Seizure probability in animal models of acquired epilepsy: a perspective on the concept of the preictal state. *Epilepsy Res* 97: 324-331.
- Duffy, S., MacVicar, B.A. (1999). Modulation of neuronal excitability by astrocytes. *Adv Neurol.* 79: 573-581.
- Dunwiddie, T.V. (1980). Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia* 21(5): 541-548.

- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24: 31-55.
- Ekonomou A., Sperk, G., Kostopoulos, G., Angelatou, F. (2000). Reduction of A1 adenosine receptors in rat hippocampus after kainic acid-induced limbic seizures. *Neurosci Lett.* 284: 49-52.
- Ekstrand, J.J., Pouliot, W., Scheerlinck, P., Dudek, F.E. (2011). Lithium pilocarpine-induced status epilepticus in postnatal day 20 rats results in greater neuronal injury in ventral versus dorsal hippocampus. *Neuroscience* 192: 699-707.
- Etherington, L.A., Frenguelli, B.G. (2004). Endogenous adenosine modulates epileptiform activity in rat hippocampus in a receptor subtype-dependent manner. *Eur J Neurosci.* 19: 2539-2550.
- Etherington, L.A., Patterson, G.E., Meechan, L., Boison, D., Irving, A.J., Dale, N., Frenguelli, B.G. (2009). Astrocytic adenosine kinase regulates basal synaptic adenosine levels and seizure activity but not activity-dependent adenosine release in the hippocampus. *Neuropharmacology* 56: 429-437.
- Fedele, D.E., Gouder, N., Güttinger, M., Gabernet, L., Scheurer, L., Rulicke, T., Crestani, F., Boison, D. (2005). Astroglial gliosis in epilepsy leads to overexpression of adenosine kinase resulting in seizure aggravation. *Brain* 128: 2383-2395.
- Fedele, D.E., Koch, P., Brüstle, O., Scheurer, L., Simpson, E.M., Mohler, H., Boison, D. (2004). Engineering embryonic stem cell derived glia for adenosine delivery. *Neurosci Lett.* 370: 160-165.
- Fedele, D.E., Li, T., Lan, J.Q., Fredholm, B.B., Boison, D. (2006). Adenosine A1 receptors are crucial in keeping an epileptic focus localized. *Exp Neurol.* 200: 184-190.
- Ferre, S., Borycz, J., Goldberg, S.R., Hope, B.T., Morales, M., Lluís, C., Franco, R., Ciruela, F., Cunha, R. (2005). Role of adenosine in the control of homosynaptic plasticity in striatal excitatory synapses. *J Integr Neurosci.* 4: 445-464.
- Fisher, R.S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J.H., Elger, C.E., Engel, J. Jr., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, M., Hesdorffer, D.C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55: 475-482.
- Folbergrova, J., Jesina, P., Kubova, H., Druga, R., Otahal, J. (2016). Status epilepticus in immature rats is associated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Front Cell Neurosci* 10: 136.
- Franchetti, P., Cappellacci, L., Marchetti, S., Trincavelli, L., Martini, C., Mazzoni, M.R., Lucacchini, A., Grifantini, M. (1998). 2'-C-Methyl analogues of selective adenosine receptor agonists: synthesis and binding studies. *J Med Chem.* 7;41(10): 1708-1715.
- Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., Vaugeois, J.M. (2005a). Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol.* 63:191-270.
- Fredholm, B.B., Chen, J.F., Masino, S.A., Vaugeois, J.M. (2005b). Actions of adenosine at its receptors in the CNS: Insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 45: 385-412.
- Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J. (2001). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 53: 527-552.
- Fritz, H.; Hess, R. (1970). Ossification of the rat and mouse skeleton in the perinatal period. *Teratology* 3(4): 331-338.
- Frush, D.P., McNamara, J.O. (1986). Evidence implicating dentate granule cells in wet dog shakes produced by kindling stimulations of entorhinal cortex. *Exp. Neurol.* 92: 102-113.
- Furtado, M.A., Castro, O.W., Del Vecchio, F., de Oliveira, J.A., Garcia-Cairasco, N. (2011). Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status

- epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy Behav* 20: 257-266.
- Garcia, N., Priego, M., Obis, T., Santafe, M.M., Tomas M., Besalduch, N., Lanuze M.A., Tomas, J. (2013). Adenosine A1 and A2A receptor-mediated modulation of acetylcholine release in the mice neuromuscular junction. *Eur J Neurosci*. 38: 2229-2241.
- Gaudin, A., Lepetre-Mouelhi, S., Mouglin, J., Parrod, M., Pieters, G., Garcia-Argote, S., Loreau, O., Goncalves, J., Chacun, H., Courbebaisse, Y., Clayette, P., Desmaele, D., Rousseau, B., Andrieux, K., Couvreur, P. (2015). Pharmacokinetics, biodistribution and metabolism of squalenoyl adenosine nanoparticles in mice using dual radio-labeling and radio-HPLC analysis. *J Control Release*. 28; 212: 50-58.
- Gebril, H.M.; Rose, R.M.; Gesese, R.; Emond, M.P.; Huo, Y.; Aronica, E.; Boison, D. (2020). Adenosine kinase inhibition promotes proliferation of neural stem cells after traumatic brain injury. *Brain Commun*. 2(1): fcaa017.
- Gebril, H.M., Wahba, A., Zhou, X., Lai, T., Alharfoush, E., DiCicco-Bloom, E., Boison, D. (2021). Developmental role of adenosine kinase in the cerebellum. *eNeuro* 8(3):ENEURO.0011-21.2021.
- Geiger, J.D., LaBella, F.S., Nagy, J.I. (1984). Ontogenesis of adenosine receptors in the central nervous system of the rat. *Brain Res*. 315(1): 97-104.
- George, B.; Kulkarni, S.K. (1997). Modulation of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus by adenosinergic agents. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19: 329-333.
- Glass, M., Faull, R.L., Bullock, J.Y., Jansen, K., Mee, E.W., Walker, E.B., Synek, B.J., Dragunow M. (1996). Loss of A1 adenosine receptors in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res*. 710: 56-68.
- Gollwitzer, S., Hopfengartner, R., Rossler, K., Muller, T., Olmes, D.G., Lang, J., Kohn, J., Onugoren, M.D., Heyne, J., Schwab, S., Hamer, H.M. (2018). Afterdischarges elicited by cortical electric stimulation in humans: When do they occur and what do they mean? *Epilepsy Behav* 87: 173-179.
- Gordon, B. J., Debicki, D. B., Young, G. B. (2012). Temporal lobe epilepsy after refractory status epilepticus: an illustrative case and review of the literature. *Epilepsy research and treatment*, 2012, 209701.
- Gorter, J.A., van Vliet, E.A., Lopes da Silva, F.H. (2016). Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *J. Neurosci. Methods* 260:96-108.
- Gorter, J.A., van Vliet, E.A., Aronica, E., Breit, T., Rauwerda, H., Lopes da Silva, F.H., Wadman, W.J. (2006). Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 26: 11083-11110.
- Gouder, N., Fritschy, J.M., Boison, D. (2003). Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 44: 877-885.
- Gouder, N., Scheurer, L., Fritschy, J.M., Boison, D. (2004). Overexpression of adenosine kinase in epileptic hippocampus contributes to epileptogenesis. *J Neurosci*. 24: 692-701.
- Greene, R.W., Haas, H.L. (1991). The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol*. 36(4): 329-341.
- Güttinger, M., Fedele, D., Koch, P., Padrun, V., Pralong, W.F., Brustle, O., Boison, D. (2005). Suppression of kindled seizures by paracrine adenosine release from stem cell-derived brain implants. *Epilepsia* 46: 1162-1169.
- Haberg, A., Qu, H., Haraldseth, O., Unsgard, G., Sonnewald, U. (2000). In vivo effects of adenosine A1 receptor agonist and antagonist on neuronal and astrocytic intermediary metabolism studied with ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *J Neurochem*. 74: 327-333.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G. (2007). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 13: 54-63.

- Hamil, N.E., Cock, H.R., Walker, M.C. (2012). Acute down-regulation of adenosine A(1) receptor activity in status epilepticus. *Epilepsia* 53(1): 177-188.
- Hauser, W.A., Annegers, J.F. (1991). Risk factors for epilepsy. *Epilepsy Res Suppl.* 4: 45-52.
- Hauser, W.A., Annegers, J.F., Kurland, L.T. (1991). Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940–1980. *Epilepsia* 32: 429-445.
- Hellier, J.L., Patrylo, P.R., Buckmaster, P.S., Dudek, F.E. (1998). Recurrent spontaneous motor seizures after repeated low-dose systemic treatment with kainate: Assessment of a rat model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 31: 73-84.
- Hesdorffer, D.C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J.F., Hauser, W.A. (1998). Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: Effect of status epilepticus. *Ann Neurol.* 44: 908-912.
- Hoffmann, K., Gastens, A.M., Volk, H.A., Loscher, W. (2006). Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barrier after pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsy Res.* 69(1): 1-14.
- Huber, A., Güttinger, M., Möhler, H., Boison, D. (2002). Seizure suppression by adenosine A2A receptor activation in a rat model of audiogenic brainstem epilepsy. *Neurosci Lett.* 329: 289-292.
- Huber, A., Padrun, V., Déglon, N., Aebischer, P., Möhler, H., Boison, D. (2001). Grafts of adenosine-releasing cells suppress seizures in kindling epilepsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 7611-7616.
- Chin, R.F., Neville, B.G., Scott, R.C. (2004). A systematic review of the epidemiology of status epilepticus. *Eur J Neurol.* 11: 800-810.
- Choi, H., Sell, R. L., Lenert, L., Muennig, P., Goodman, R. R., Gilliam, F. G., Wong, J. B. (2008). Epilepsy surgery for pharmacoresistant temporal lobe epilepsy: a decision analysis. *Jama* 300(21): 2497-2505.
- Ilie, A., Raimondo, J.V., Akermam, C.J. (2012). Adenosine release during seizures attenuates GABAA receptor-mediated depolarization. *J Neurosci.* 32: 5321-5332.
- Isomura, Y., Sugimoto, M., Fujiwara-Tsukamoto, Y., Yamamoto-Muraki, S., Yamada, J., Fukuda, A. (2003). Synaptically activated Cl<sup>-</sup> accumulation responsible for depolarizing GABAergic responses in mature hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* 90(4): 2752-2756.
- Jarvis, M.F. (2019). Therapeutic potential of adenosine kinase inhibition-Revisited. *Pharmacol Res Perspect.* 22; 7(4):e00506.
- Johansson, B., Georgiev, V., Fredholm, B.B. (1997). Distribution and postnatal ontogeny of adenosine A2A receptors in rat brain: comparison with dopamine receptors. *Neuroscience* 80: 1187-1207.
- Kandratavicius, L., Balista, P.A., Lopes-Aguiar, C., Ruggiero, R.N., Umeoka, E.H., Garcia-Cairasco, N., Bueno-Junior, L.S., Leite, J.P. (2014). Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiat. Dis. Treat.* 10: 1693-1705.
- Khan, G.M., Smolders, I., Ebinger, G., Michotte, Y. (2000). Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. *Neuropharmacology* 39: 2418-2432.
- Kiese, K., Jablonski, J., Boison, D., Kobow, K. (2016). Dynamic regulation of the adenosine kinase gene during early postnatal brain development and maturation. *Front Mol Neurosci* 9: 99.
- Kim, K.I., Jeong, H.B., Ro, H., Lee, J.H., Kim, C.D., Yoon, T.J. (2017). Inhibitory effect of 5-iodotubercidin on pigmentation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2;490(4): 1282-1286.
- Klein, P., Dingledine, R., Aronica, E., Bernard, C., Blümcke, I., Boison, D., Brodie, M.J., Brooks-Kayal, A.R., Engel, J.Jr., Forcelli, P.A., Hirsch, L.J., Kaminski, R.M., Klitgaard, H., Kobow, K., Lowenstein, D.H., Pearl, P.L., Pitkänen, A., Puhakka, N., Rogawski,

- M.A., Schmidt, D., Sillanpää, M., Sloviter, R.S., Steinhäuser, C., Vezzani, A., Walker, M.C., Löscher, W. (2018). Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: Do they translate? *Epilepsia* 59(1): 37-66.
- Klishin, A., Lozovaya, N., Krishtal, O. (1995). A1 adenosine receptors differentially regulate the N-methyl-D-aspartate and non-N-methyl-D-aspartate receptor-mediated components of hippocampal excitatory postsynaptic current in a Ca<sup>2+</sup>/Mg(2+)-dependent manner. *Neuroscience* 65(4): 947-953.
- Klitgaard, H., Knutsen, L.J., Thomsen, C. (1993). Contrasting effects of adenosine A1 and A2 receptor ligands in different chemoconvulsive rodent models. *Eur.J.Pharmacol.*242(3): 221-228.
- Knopp, A., Kivi, A., Wozny, C., Heinemann, U., Behr, J. (2005). Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of comparative neurology*, 483(4), 476–488.
- Kobow, K., Blümcke, I. (2011). The methylation hypothesis: do epigenetic chromatin modifications play a role in epileptogenesis? *Epilepsia* 52(suppl 4): 15-19.
- Kochanek, P.M., Vagni, V.A., Janesko, K.L., Washington, C.B., Crumrine, P.K., Garman, R.H., Jenkins, L.W., Clark, R.S., Homanics, G.E., Dixon, C.E., Schnermann, J., Jackson, E.K. (2006). Adenosine A1 receptor knockout mice develop lethal status epilepticus after experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26: 565-575.
- Kotloski, R., Lynch, M., Lauersdorf, S., Sutula, T. (2002). Repeated brief seizures induce progressive hippocampal neuron loss and memory deficits. *Prog. Brain Res.* 135: 95-110.
- Kowaluk, E. A., Jarvis, M. F. (2000). Therapeutic potential of adenosine kinase inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs* 9(3): 551–564.
- Kubova, H., Mares, P., Suchomelova, L., Brozek, G., Druga, R., Pitkanen, A. (2004). Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 19: 3255-3265.
- Kumaria, A., Tolia, C., Burnstock, G. (2008). ATP signalling in epilepsy. *Purinergic Signalling* 4: 339-346.
- Layland, J., Carrick, D., Lee, M., Oldroyd, K., Berry, C. (2014). Adenosine: physiology, pharmacology, and clinical applications. *JACC Cardiovasc.Interv.* 7(6): 581-591.
- Lehmann, T. N., Gabriel, S., Eilers, A., Njunting, M., Kovacs, R., Schulze, K., Lanksch, W. R., Heinemann, U. (2001). Fluorescent tracer in pilocarpine-treated rats shows widespread aberrant hippocampal neuronal connectivity. *The European journal of neuroscience* 14(1): 83-95.
- Lemos, T., Cavalheiro, E. A. (1995). Suppression of pilocarpine-induced status epilepticus and the late development of epilepsy in rats. *Experimental brain research* 102(3): 423-428.
- Lewin, E., Bleck, V. (1981). Electroshock seizures in mice: effect on brain adenosine and its metabolites. *Epilepsia* 22(5): 577-581.
- Li, T., Quan Lan, J., Fredholm, B.B., Simon, R.P., Boison, D. (2007). Adenosine dysfunction in astroglia: cause for seizure generation? *Neuron Glia Biol* 3: 353-366.
- Lietsche, J., Imran, I., Klein, J. (2016). Extracellular levels of ATP and acetylcholine during lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rats. *Neurosci Lett.* 12; 611:69-73.
- Liu, C., Yu, T., Ren, Z.W., Xu, C.P., Wang, X.Y., Qiao, L., Ni, D.Y., Zhang, G.J., Li, Y.J. (2017). Properties of afterdischarges from electrical stimulation in patients with epilepsy. *Epilepsy research* 137: 39-44.
- Lopes, L.V., Cunha, R.A., Ribeiro, J.A. (1999). Cross talk between A(1) and A(2A) adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and old rats. *J Neurophysiol.* 82: 3196-3203.
- Lopes, L.V., Rebola, N., Pinheiro, P.C., Richardson, P.J., Oliveira, C.R., Cunha, R.A., (2003).



- Adenosine A<sub>3</sub> receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *NeuroReport* 14: 1645-1648.
- Löscher, W., Hirsch, L.J., Schmidt, D. (2015). The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy-traditional view versus new concepts. *Epilepsy Behav.* 52: 78-92.
- Lothman, E.W., Bertram, E.H. (1993). III. Epileptogenic effects of status epilepticus. *Epilepsia* 34(s1)(suppl 1): 59-70.
- Lynch, M., Sayin, U., Bownds, J., Janumpalli, S., Sutula, T. (2000). Long-term consequence of early postnatal seizures on hippocampal learning and plasticity. *Eur. J. Neurosci.* 12: 2252-2264.
- Malhotra, J., Gupta, Y.K. (1997). Effect of adenosine receptor modulation on pentylenetetrazole-induced seizures in rats. *Brit J Pharmacol.* 120: 282-288.
- Manzoni, O.J., Manabe, T., Nicoll, R.A. (1994). Release of adenosine by activation of NMDA receptors in the hippocampus. *Science.* 265: 2098-2101.
- Marangos, P. J., Patel, J., and Stivers, J. (1982). Ontogeny of adenosine binding sites in rat forebrain and cerebellum. *J. Neurochem.* 39 (1): 267-270.
- Mares, P. (2014). A1 not A2A adenosine receptors play a role in cortical epileptic afterdischarges in immature rats. *J. Neural Transm.* 121(11): 1329-1336.
- Maresova, D., Mares, P. (1987). Hippocampo-cortical after-discharges during ontogenesis in rats. In: *Ontogenesis of the Brain* (4). S. Trojan, F. Stastny (eds), Univ. Carolina Press, Prague, 1987, 279-283.
- Margerison, J.H., Corsellis, J.A. (1966). Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 89: 499-530.
- Mathern, G. W., Adelson, P. D., Cahan, L. D., Leite, J. P. (2002). Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Progress in brain research* 135: 237-251.
- Mathôt, R. A., Appel, S., van Schaick, E. A., Soudijn, W., IJzerman, A. P., Danhof, M. (1993). High-performance liquid chromatography of the adenosine A1 agonist N6-cyclopentyladenosine and the A1 antagonist 8-cyclopentyltheophylline and its application in a pharmacokinetic study in rats. *Journal of chromatography* 620(1): 113-120.
- McGaraughty, S., Cowart, M., Jarvis, M. F., Berman, R. F. (2005). Anticonvulsant and antinociceptive actions of novel adenosine kinase inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry* 5(1): 43-58.
- McNally, T., Helfrich, R. J., Cowart, M., Dorwin, S. A., Meuth, J. L., Idler, K. B., Klute, K. A., Simmer, R. L., Kowaluk, E. A., Halbert, D. N. (1997). Cloning and expression of the adenosine kinase gene from rat and human tissues. *Biochemical and biophysical research communications* 231(3): 645-650.
- McNamara, J.O. (1999). Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature.* 399: 15-22.
- McNamara, J.O., Huang, Y.Z., Leonard, A.S. (2006). Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. *Sci STKE.* (356):re12.
- Miller, M.A., Conley, Y., Scanlon, J.M., Ren, D., Ilyas, K.M., Niyonkuru, C., Wagner, A.K. (2010). APOE genetic associations with seizure development after severe traumatic brain injury. *Brain Inj.* 24: 1468-1477.
- Miller-Delaney, S.F., Das, S., Sano, T., Jimenez-Mateos, E.M., Bryan, K., Buckley, P.G., Stallings, R.L., Henshall, D.C. (2012). Differential DNA methylation patterns define status epilepticus and epileptic tolerance. *J Neurosci.* 32(5): 1577-88.
- Mills, J. H., Alabanza, L., Weksler, B. B., Couraud, P. O., Romero, I. A., Bynoe, M. S. (2011). Human brain endothelial cells are responsive to adenosine receptor activation. *Purinergic signalling* 7(2): 265-273.

- Miranda, M.F., Hamani, C., de Almeida, A.C., Amorim, B.O., Macedo, C.E., Fernandes, M.J., Nobrega, J.N., Aarão, M.C., Madureira, A.P., Rodrigues, A.M., Andersen, M.L., Tufik, S., Mello, L.E., Covolan, L. (2014). Role of adenosine in the antiepileptic effects of deep brain stimulation. *Front Cell Neurosci.* 8: 312-318.
- Monopoli, A., Conti, A., Dionisotti, S., Casati, C., Camaioni, E., Cristalli, G., Ongini, E. (1994). Pharmacology of the highly selective A1 adenosine receptor agonist 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine. *Arzneimittelforschung.* 44: 1305-1312.
- Moshe, S. L. (2010). Seizures early in life. *Neurology.* 55: 15-20.
- Muller, C.J., Bankstahl, M., Groticke, I., Loscher, W. (2009). Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *Eur J Pharmacol* 619: 15-24.
- Nairismägi, J., Pitkänen, A., Kettunen, M.I., Kauppinen, R.A., Kubova, H. (2006). Status epilepticus in 12-day-old rats leads to temporal lobe neurodegeneration and volume reduction: A histologic and MRI study. *Epilepsia* 47: 479-488.
- Newby, A. C., Worku, Y., Holmquist, C. A. (1985). Adenosine formation. Evidence for a direct biochemical link with energy metabolism. *Advances in myocardiology* 6: 273-284.
- O'Brien, T. J., Kilpatrick, C., Murrie, V., Vogrin, S., Morris, K., Cook, M. J. (1996). Temporal lobe epilepsy caused by mesial temporal sclerosis and temporal neocortical lesions: a clinical and electroencephalographic study of 46 pathologically proven cases. *Brain* 119(6): 2133-2141.
- Ogunshola, O. O., Stewart, W. B., Mihalcik, V., Solli, T., Madri, J. A., Ment, L. R. (2000). Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain. *Brain research. Developmental brain research* 119(1): 139-153.
- Pagonopoulou, O., Angelatou, F. (1992). Reduction of A1 adenosine receptors in cortex, hippocampus and cerebellum in ageing mouse brain. *Neuroreport* 3(9): 735-737.
- Pak, M.A., Haas, H.L., Decking, U.K., Schrader, J. (1994). Inhibition of adenosine kinase increases endogenous adenosine and depresses neuronal activity in hippocampal slices. *Neuropharmacol.* 33: 1049-1053.
- Pascual, O., Casper, K.B., Kubera, C., Zhang, J., Revilla-Sanchez, R., Sul, J.Y., Takano, H., Moss, S.J., McCarthy, K., Haydon, P.G. (2005). Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 310: 113-116.
- Patterson, K. P., Baram, T. Z., Shinnar, S. (2014). Origins of temporal lobe epilepsy: febrile seizures and febrile status epilepticus. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 11(2): 242-250.
- Pavan, B., Ijzerman, A. P. (1998). Processing of adenosine receptor agonists in rat and human whole blood. *Biochemical pharmacology* 56(12): 1625-1632.
- Paxinos, G., Watson, C. (1997). *The rat brain, in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press, 1997.
- Pazzagli, M., Corsi, C., Fratti, S., Pedata, F., Pepeu, G. (1995). Regulation of extracellular adenosine levels in the striatum of aging rats. *Brain Res* 684: 103-106.
- Peart, J.N., Gross, G.J. (2005). Cardioprotection following adenosine kinase inhibition in rat hearts. *Basic Res Cardiol.* 100(4): 328-336.
- Pignataro, G., Maysami, S., Studer, F.E., Wilz, A., Simon, R.P., Boison, D. (2007). Downregulation of hippocampal adenosine kinase after focal ischemia as potential endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab.* 28(1): 17-23.
- Pometlova, M., Kubova, H., Mares, P. (2010). Effects of 2-chloroadenosine on cortical epileptic afterdischarges in immature rats. *Pharmacol.Rep.* 62: 62-67.
- Poulsen, S.A., Quinn, R.J. (1998). Adenosine receptors: new opportunities for future drugs. *Bioorg Med Chem.* 6(6): 619-41.

- Racine, R.J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 32: 281-294.
- Raspall-Chaure, M., Chin, R.F., Neville, B.G., Scott, R.C. (2006). Outcome of paediatric convulsive status epilepticus: a systematic review. *Lancet Neurol.* 5(9): 769-779.
- Rebola, N., Canas, P.M., Oliveira, C.R., Cunha, R.A. (2005a). Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience.* 132: 893-903.
- Rebola, N., Coelho, J. E., Costenla, A. R., Lopes, L. V., Parada, A., Oliveira, C. R., Soares-da-Silva, P., de Mendonça, A., Cunha, R. A. (2003a). Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *The European journal of neuroscience* 18(4): 820–828.
- Rebola, N., Porciuncula, L.O., Lopes, L.V., Oliveira, C.R., Soares-da-Silva, P., Cunha, R.A. (2005b). Long-term effect of convulsive behavior on the density of adenosine A1 and A2A receptors in the rat cerebral cortex. *Epilepsia* 46:159-165.
- Rebola, N., Sebastião, A.M., de Mendonça, A., Oliveira, C.R., Ribeiro, J.A., Cunha, R.A. (2003b). Enhanced adenosine A2A receptor facilitation of synaptic transmission in the hippocampus of aged rats. *J. Neurophysiol.* 90(2): 1295-1303.
- Rees, D.A., Scanlon, M.F., Ham, J. (2003). Adenosine signalling pathways in the pituitary gland: one ligand, multiple receptors. *J Endocrinol.* 177(3): 357-364.
- Rivkees, S. A. (1995a). The ontogeny of cardiac and neural A1 adenosine receptor expression in rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 89(2): 202-213.
- Rivkees, S.A., Price, S.L., Zhou, F.C. (1995b). Immunohistochemical detection of A1 adenosine receptors in rat brain with emphasis on localization in the hippocampal formation, cerebral cortex, cerebellum, and basal ganglia. *Brain Res.* 677(2): 193-203.
- Rizzi, M., Perego, C., Aliprandi, M., Richichi, C., Ravizza, T., Colella, D., Veliskova, J., Moshe, S.L., De Simoni, M.G., Vezzani, A. (2003). Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. *Neurobiol Dis.* 14(3): 494-503.
- Rosenow, F., Hamer, H.M., Knake, S. (2007). The epidemiology of convulsive and nonconvulsive status epilepticus. *Epilepsia* 48 Suppl 8: 82-84.
- Sahin, B., Kansy, J. W., Nairn, A. C., Spsychala, J., Ealick, S. E., Fienberg, A. A., Greene, R. W., Bibb, J. A. (2004). Molecular characterization of recombinant mouse adenosine kinase and evaluation as a target for protein phosphorylation. *European journal of biochemistry* 271(17): 3547-3555.
- Sakowicz, M., Grdeń, M., Pawełczyk, T. (2001). Expression level of adenosine kinase in rat tissues. Lack of phosphate effect on the enzyme activity. *Acta biochimica Polonica* 48(3): 745-754.
- Sandau, U.S., Yahya, M., Bigej, R., Friedman, J.L., Saleumvong, B., Boison, D. (2019). Transient use of a systemic adenosine kinase inhibitor attenuates epilepsy development in mice. *Epilepsia* 60(4): 615-625.
- Sanchez, R.M., Jensen, F. (2001). Maturation aspects of epilepsy mechanisms and consequences for the immature brain. *Epilepsia* 42(5): 577-585.
- Sankar, R., Shin, D., Liu, H., Katsumori, H., Wasterlain, C.G. (2000). Granule cell neurogenesis after status epilepticus in the immature rat brain. *Epilepsia Suppl* 6: 53-56.
- Sankar, R., Shin, D.H., Liu, H., Mazarati, A., Pereira de Vasconcelos, A., Wasterlain, C.G. (1998). Patterns of status epilepticus-induced neuronal injury during development and long-term consequences. *J Neurosci.* 18(20): 8382-8393.
- Sebastiao, A.M., Ribeiro, J.A. (2000). Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci.* 21: 341-346.

- Shi, Y., Dai, Q., Ji, B., Huang, L., Zhuang, X., Mo, Y., Wang, J. (2021). Electroacupuncture Pretreatment Prevents Cognitive Impairment Induced by Cerebral Ischemia-Reperfusion via Adenosine A1 Receptors in Rats. *Front Aging Neurosci.* 13: 680706.
- Scharfman, H. E., Sollas, A. E., Berger, R. E., Goodman, J. H., Pierce, J. P. (2003). Perforant path activation of ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. *Neuroscience* 121(4): 1017-1029.
- Scholl, E.A.; Dudek, F.E.; Ekstrand, J.J. (2013). Neuronal degeneration is observed in multiple regions outside the hippocampus after lithium pilocarpine-induced status epilepticus in the immature rat. *Neuroscience* 252: 45-59.
- Schultz, V., Lowenstein, J. M. (1978). The purine nucleotide cycle. Studies of ammonia production and interconversions of adenine and hypoxanthine nucleotides and nucleosides by rat brain in situ. *J. Biol. Chem.* 253: 1938-1943.
- Silva, C.G., Porciuncula, L.O., Canas, P.M., Oliveira, C.R., Cunha, R.A. (2007). Blockade of adenosine A(2A) receptors prevents staurosporine-induced apoptosis of rat hippocampal neurons. *Neurobiol Dis.* 27(2): 182-189.
- Simonato, M., Varani, K., Muzzolini, A., Bianchi, C., Beani, L., Borea, P. A. (1994). Adenosine A1 receptors in the rat brain in the kindling model of epilepsy. *European journal of pharmacology* 265(3): 121-124.
- Sloviter, R.S. (1994). The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy. *Annals of neurology* 35(6): 640-654.
- Sofroniew, M.V.; Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35.
- Soukupova, M., Binaschi, A., Falcicchia, C., Zucchini, S., Roncon, P., Palma, E., Magri, E., Grandi, E., Simonato, M. (2014). Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 257: 39-49.
- Spychala, J., Datta, N. S., Takabayashi, K., Datta, M., Fox, I. H., Gribbin, T., Mitchell, B. S. (1996). Cloning of human adenosine kinase cDNA: sequence similarity to microbial ribokinases and fructokinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(3): 1232–1237.
- Studer, F.E., Fedele, D.E., Marowsky, A., Schwerdel, C., Wernli, K., Vogt, K., Fritschy, J.M., Boison, D. (2006). Shift of adenosine kinase expression from neurons to astrocytes during postnatal development suggests dual functionality of the enzyme. *Neuroscience.* 142: 125-137.
- Tancredi, V., D'Antuono, M., Nehlig, A., Avoli, M. (1998). Modulation of epileptiform activity by adenosine A1 receptor-mediated mechanisms in the juvenile rat hippocampus. *J.Pharmacol. Exp.Ther.* 286(3): 1412-1419.
- Taylor, C.P., Dudek, F.E. (1982). Synchronous neural afterdischarges in rat hippocampal slices without active chemical synapses. *Science* 218 (4574): 810-812.
- Theofilas, P., Brar, S., Stewart, K.A., Shen, H.Y., Sandau, U.S., Poulsen, D., Boison, D. (2011) Adenosine kinase as a target for therapeutic antisense strategies in epilepsy. *Epilepsia* 52: 589-601.
- Tian, G.F., Azmi, H., Takano, T., Xu, Q.W., Peng, W.G., Lin, J., Oberheim, N., Lou, N.H., Wang X.H., Zielke, H.R., Kang, J., Nedergaard, M. (2005): An astrocytic basis of epilepsy. *Nat. Med.* 11(9): 973-981.
- Toader, O., Forte, N., Orlando, M., Ferrea, E., Raimondi, A., Baldelli, P., Benfenati, F., Medrihan L. (2013). Dentate gyrus network dysfunctions precede the symptomatic phase in a genetic mouse model of seizures. *Front Cell Neurosci.* 7: 138.
- Toti, K. S., Osborne, D., Ciancetta, A., Boison, D., Jacobson, K. A. (2016). South (S)- and

- North (N)-Methanocarba-7-Deazaadenosine Analogues as Inhibitors of Human Adenosine Kinase. *Journal of medicinal chemistry* 59(14): 6860–6877.
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rosetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H. (2015). A definition and classification of the ILAE Task Force on classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56(10): 1515-23.
- Turski, W.A., Cavalheiro, E.A., Schwarz, M., Czuczwar, S.J., Kleinrok, Z., Turski, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain Res.* 9: 315-335.
- Ugarkar, B.G., DaRe, J.M., Kopcho, J.J., Browne, C.E., Schanzer, J.M., Wiesner, J.B., Erion, M.D. (2000). Adenosine kinase inhibitors. 1. Synthesis, enzyme inhibition, and antiseizure activity of 5-iodotubercidin analogues. *J Med Chem* 43: 2883-2893.
- Van Calker, D., Biber, K. (2005). The role of glial adenosine receptors in neural resilience and the neurobiology of mood disorders. *Neurochem. Res.* 30: 1205-1217.
- Van Gompel, J.J., Bower, M.R., Worrell, G.A., Stead, M., Chang, S.Y., Goerss, S.J., Kim, I., Bennet, K.E., Meyer, F.B., Marsh, W.R. (2014). Increased cortical extracellular adenosine correlates with seizure termination. *Epilepsia* 55: 233-244.
- Velisek, L., Mares, P. (2004). Hippocampal afterdischarges in rats. I. Effects of antiepileptics. *Physiological research* 53(4): 453-461.
- Veliskova, J., Velisek, L., Mares, P. (1988). Epileptic phenomena produced by kainic acid in laboratory rats during ontogenesis. *Physiol.Bohemoslov.* 37(5): 395-405.
- Vezzani, A. (2008). Epileptogenic role of astrocyte dysfunction. *Epilepsy Curr* 8: 46-47.
- Viitanen, T., Ruusuvoori, E., Kaila, K., Voipio, J. (2010). The K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 promotes GABAergic excitation in the mature rat hippocampus. *The Journal of physiology* 588(Pt 9): 1527-1540.
- Vizuete, A.F.K.; Hennemann, M.M.; Gonçalves, C.A.; de Oliveira, D.L. (2017). Phase-dependent astroglial alterations in Li-pilocarpine-induced status epilepticus in young rats. *Neurochem Res.* 42(10): 2730-2742.
- Wagner, A.K., Miller, M.A., Scanlon, J., Ren, D., Kochanek, P.M., Conley, Y.P. (2010). Adenosine A1 receptor gene variants associated with post-traumatic seizures after severe TBI. *Epilepsy Res.* 90: 259-272.
- Wieraszko, A., Seyfried, T. N. (1989). ATP-induced synaptic potentiation in hippocampal slices. *Brain research* 491(2): 356–359.
- Wiesner, J.B., Ugarkar, B.G., Castellino, A.J., Barankiewicz, J., Dumas, D.P., Gruber, H.E., Foster, A.C., Erion, M.D. (1999). Adenosine kinase inhibitors as a novel approach to anticonvulsant therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1669-1677.
- Williams-Karnesky, R.L.; Sandau, U.S.; Lusardi, T.A.; Lytle, N.K.; Farrell, J.M.; Pritchard, E.M.; Kaplan, D.L.; Boison, D. (2013). Epigenetic changes induced by adenosine augmentation therapy prevent epileptogenesis. *The J Clin Invest* 123: 3552-3563.
- Wotring, L.L., Townsend LB. (1979). Study of the Cytotoxicity and Metabolism of 4-Amino-3-carboxamido-1 (fl-Dribofuranosyl) pyrazolo (3, 4- d] pyrimidine Using Inhibitors of Adenosine Kinase and Adenosine Deaminase. *Cancer Res.* 39(8): 3018-3023.
- Wozny, C., Gabriel, S., Jandova, K., Schulze, K., Heinemann, U., Behr, J. (2005). Entorhinal cortex entrains epileptiform activity in CA1 in pilocarpine-treated rats. *Neurobiology of disease* 19(3): 451–460.
- Yu, W.H., Kimura, M., Walczewska, A., Porter, J.C., McCann, S.M. (1998). Adenosine acts by A1 receptors to stimulate release of prolactin from anterior-pituitaries in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(13): 7795-7798.

- Zang, G., Franklin, P.H., Murray, T.F. (1993). Manipulation of endogenous adenosine in the rat prepiriform cortex modulates seizure susceptibility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264: 1415-1424.
- Zhang, X., Jia, D., Liu, H., Zhu, N., Zhang, W., Feng, J., Yin, J., Hao, B., Cui, D., Deng, Y., Xie, D., He, L., Li, B. (2013). Identification of 5-Iodotubercidin as a genotoxic drug with anti-cancer potential. *PLoS One.* 7;8(5): e62527.
- Zhang, G.; Raol, Y.S.; Hsu, F.C.; Brooks-Kayal, A.R. (2004). Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. *J Neurochem* 88: 91-101.
- Zhao, J., Liu, Q., Yi, D., Li, Q., Guo, S., Ma, L., Zhang, Y., Dong, D., Guo, F., Liu, Z., Wei, T., Li, X., Cen, S. (2022). 5-Iodotubercidin inhibits SARS-CoV-2 RNA synthesis. *Antiviral Res.* 198: 105254.
- Zhou, Q. Y., Li, C., and Olah, M. E. (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (16): 7432-7437.
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362: 299-309.

## **Přílohy:**

**Příloha č. 1: Fabera, P.,** Uttl, L., Kubova, H., Tsenov, G., Mares, P. (2022). Adenosine kinase isoforms in the developing rat hippocampus after LiCl/Pilocarpine status epilepticus. *Int J Mol Sci.* 24;23(5):2510. doi: 10.3390/ijms23052510. PMID: 35269653; PMCID: PMC8910300.

**IF = 5,924 (2022)**

**Příloha č. 2: Fabera, P.,** Parizkova, M., Uttl, L., Vondrakova, K., Kubova, H., Tsenov, G., Mares, P. (2019). Adenosine A1 Receptor Agonist 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine and Hippocampal Excitability During Brain Development in Rats. *Front Pharmacol.* 14; 10:656. doi: 10.3389/fphar.2019.00656. PMID: 31258477; PMCID: PMC6587156.

**IF = 4,22 (2019)**

**Příloha č. 23: Fabera, P.,** Mares, P. (2014). Effect of GABA(B) receptor agonist SKF97541 on cortical and hippocampal epileptic afterdischarges. *Physiol Res.* 63(4):529-34. doi: 10.33549/physiolres.932699. Epub 2014 Apr 3. PMID: 24702499.

**IF = 1,293 (2014)**