

UNIVERZITA KARLOVA
2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



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

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

Petr Fábera

Praha, 2022

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Fyziologie a patofyziologie člověka na Oddělení vývojové epileptologie Fyziologického ústavu Akademie Věd ČR.

Školitel: prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady
dne v odhod.

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA

Fyziologický ústav 1. LF UK

Albertov 5

128 00 Praha 2

Děkan fakulty: prof. MUDr. Marek Babjuk, CSc.

2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

V Úvalu 84

150 06 Praha 5

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

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. 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

Obsah

Úvod do problematiky

1. Status epilepticus	6
2. Temporální epilepsie	7
3. Pilocarpinový model epileptického statu	7
4. Adenosin a jeho role v epileptogenezi	7
4.1. Adenosinové receptory	8
4.2. Adenosinkináza	8
Hypotézy a cíle disertační práce	10

Materiál a metodika

1. Vyvolání iniciálního inzultu	11
2. Stereotaktická implantace elektrod a přímá kortikální stimulace	11
3. V-EEG monitorování	11
4. Farmakologické ovlivnění excitability agonisty A1R a inhibitory ADK	12
5. Western blot	12

Výsledky

1. Vliv agonisty A1R na změny excitability hipokampu v průběhu ontogeneze	13
2. Úloha ADK ve změně excitability hipokampu v průběhu intaktního vývoje mozku a po indukovaném SE	13
3. Vývojový profil adenosinového receptoru A1 a isoform ADK	14

Diskuze	15
----------------	----

Závěr	20
--------------	----

Literatura	21
-------------------	----

Souhrn	27
---------------	----

Přehled publikační činnosti autora	29
---	----

Úvod do problematiky

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. Působení inzultu v období perinatálního vývoje zvyšuje riziko vzniku epilepsie v dětství i v dospělosti (Chin a kol., 2004; Rosenow a kol., 2007). Neprovokované spontánní epileptické záchvaty se pak objevují zpravidla po různě dlouhé latentní době po působení vyvolávajícího inzultu.

Patofyziologické mechanismy, jež vedou k rozvoji spontánních neprovokovaných záchvatů u doposud zdravého mozku nejsou plně objasněné. Proces, při kterém se zcela funkčně normální mozek stává náchylným k epileptickým záchvatům neboli zvyšuje pravděpodobnost k vyvolání epileptického záchvatu, se označuje termínem epileptogeneze (Dudek a Staley, 2012). Současná epileptologie se proto zaměřuje na co nejdůkladnější poznání změn probíhajících v tomto období a jeho možné terapeutické ovlivnění.

1. 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). SE 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). SE, který proběhl v časném vývojovém období, má negativní důsledky na citlivost některých neurotransmiterových systémů (GABA, glutamát, acetylcholin, adenosin), vede ke změně propustnosti hematoencefalické bariéry, aktivaci zánětlivé odpovědi, gliových buněk a reparačních procesů (neurogeneze, angiogeneze) atd. Struktury mozku, které jsou nejvíce náchylné k rozvoji SE a mohou podléhat epileptogenezi, zahrnují zejména struktury temporálního laloku (Aroniadou-Anderjaska a kol., 2008). SE v období raného vývoje mozku proto představuje jeden s nejvýznamnějších rizikových faktorů k rozvoji temporální epilepsie (Gordon a kol., 2012; Patterson a kol., 2014).

2. Temporální epilepsie

Temporální epilepsie (TLE) je označením pro elektroklinický syndrom, pro který je charakteristická lokalizace zóny začátku záchvatu v temporálním laloku, zejména hipokampu, entorhinálním kortexu a amygdale (Bartolomei a kol., 2005). TLE je často asociována se strukturálním poškozením mozku, meziální temporální sklerózou, jejímuž rozvoji často předchází iniciální inzult – např. SE, febrilní záchvaty, infekce atd. (Mathern a kol., 2002). TLE může být vyvolána u animálních modelů různými typy poškození mozku včetně nejužívanějšího pilokarpinového SE.

3. Pilokarpinový model epileptického statu

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., 2006). Charakter změn a poškození mozkové tkáně u pacientů s TLE a pilokarpinového modelu SE (Margerison a Corsellis, 1966) nasvědčují, že patofyziologické změny v obou případech jsou velmi podobné.

4. Adenosin a jeho role v epileptogenezi

Disertační práce se věnuje objasnění úlohy adenosinergního systému v patofyziologii TLE s ohledem na vývojové aspekty.

Adenosin je endogenní neuromodulátor synaptické transmise uplatňující se v řadě fyziologických i patofyziologických procesů. Svoji funkci zprostředkovává prostřednictvím vazby na adenosinové receptory.

4.1. Adenosinové receptory

Inhibiční účinek adenosinu v CNS je zprostředkován vysokoafinitními A1 receptory (A1R). A1R mají ubikviterní zastoupení v CNS s nejvyšší koncentrací v hipokampu a neokortexu (Rivkees a kol., 1995b). A1R jsou lokalizovány jak pre- i postsynapticky. A1R patří do skupiny receptorů spřažených s G proteiny – inhibičními Gi a Go. Aktivací presynaptických A1R dochází k inhibici uvolňování excitační aminokyseliny glutamátu. Výsledkem aktivace nesynaptických A1R je antikonvulzivní účinek projevující se potlačením záchvatové aktivity (Boison, 2007). 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).

Postnatální změny v expresi adenosinových receptorů byly doposud popsány jen v několika studiích. Zvyšující se exprese A1R koreluje s progresivní maturací mozkové tkáně v průběhu vývoje (Rivkees, 1995a). Densita A1R je nejvyšší od 10. do 40. dne vývoje a poté postupně klesá (Daval a kol., 1991a; Daval a kol., 1991b).

A1R selektivní agonisté jako např. 2-chloro-N6-cyclopentyladenosin (CCPA) působí antikonvulzivně neboli vede k potlačení záchvatové aktivity (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).

4.2. Adenosinkináza

ATP uvolněné z astrocytů a nervových buněk a jeho následná konverze na adenosin je hlavním zdrojem extracelulárního adenosinu. Adenosinkináza (ADK) je klíčový enzym, který fosforyluje adenosin na 5-adenosinmonofosfát (AMP), tím ovlivňuje a reguluje extracelulární koncentraci adenosinu v mozku (Boison, 2006). Vyskytuje se ve 2 isoformách - ADK-L (long = 40,5 kDa) a ADK-S (short = 38,7 kDa) (McNally a kol., 1997).

Jako akutní odpověď na inzult (např. SE) podléhá ADK rychlému poklesu exprese vedoucí ke zvýšení koncentrace adenosinu, tím se zesiluje i antikonvulzivní účinek adenosinu působícího přes A1R. V případě probíhajícího prolongovaného záchvatu či SE dochází k poklesu exprese ADK (Gouder a kol., 2004), k úplné obnově exprese ADK dochází až s odstupem (Pignataro a kol., 2007). V případě opakovaného vystavení vyvolávajícího faktoru (např. recidivující epileptické záchvaty) dochází naopak dlouhodobě ke zvyšování exprese ADK (Gouder a kol., 2003). Tyto poznatky nasvědčují, že upregulace ADK v epileptickém mozku je součástí komplexního procesu epileptogeneze, při kterém dochází ke snížení působení adenosinu na A1R.

V postnatálním období je ADK exprimována pouze nervovými buňkami, avšak v průběhu další maturace dochází k zastavení exprese v nervových buňkách a k převzetí exprese ADK výhradně astrocyty. V mozku laboratorního potkana dochází k této změně v průběhu prvních 3 týdnů vývoje (Studer a kol., 1996). Exprese ADK se v důsledku působení stresových faktorů (např. epileptického záchvatu) může měnit. Zvýšení exprese ADK prokazatelně vedlo v experimentálních podmínkách ke spuštění epileptických záchvatů (Theofilas a kol., 2011).

Farmakologická inhibice ADK zvyšuje koncentraci adenosinu a tím snižuje

nervovou excitabilitu prostřednictvím působení na A1R v hipokampu (Pak a kol., 1994).

Hypotézy a cíle disertační práce

Následky SE prodělaného v časně fázi ontogeneze 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 iniciálním inzultu (LiCl-pilokarpinovém 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.

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

Materiál a metodika

1. Vyvolání iniciálního inzultu

U samců laboratorního potkana kmene Wistar byl vyvolán SE intraperitoneální aplikací pilokarpinu v dávce 40 mg/kg 12. den po narození k vyvolání perinatálního poškození mozku. 24 hodin před podáním pilokarpinu jsme aplikovali všem zvířatům LiCl v dávce 3 mmol/kg intraperitoneálně za účelem snížení dávky pilokarpinu a tím periferních cholinomimetických účinků. Pro snížení mortality bylo všem zvířatům 1,5 hodiny po rozvoji SE podáno 0,07 ml/kg paraldehydu. U kontrolní skupiny zvířat byla aplikace pilokarpinu nahrazena adekvátní dávkou fyziologického roztoku.

2. Stereotaktická implantace elektrod a přímá kortikální stimulace

V různých fázích ontogeneze a časovém odstupu po indukovaném SE (12-, 15-, 18-, 21-, 25-, 32-, 45- a 60-denní zvířata) byly zvířatům stereotakticky implantovány stimulační a registrační elektrody do dorzálního hipokampu. Operace byly provedeny v celkové anestezii isofluranem. Každá kontrolní i experimentální skupina daného věku obsahovala 8 až 14 zvířat (celkem 393 zvířat). 60 minut po operaci byl hipokampus stimulován bifazickými elektrickými pulsy (trvání 1 ms) o frekvenci 60 Hz a intenzitě (0,05 až 2,0 mA) dostatečné pro vyvolání hipokampálních následných výbojů (ADs) nebo pomocí vzrůstající intenzity stimulace (0,05-0,6 mA). Registrované intrakraniální EEG se podrobilo další analýze. Parametry ADs (prahová intenzita, délka trvání ADs) byly statisticky

hodnoceny analýzou rozptylu – jednoduchou pro srovnání odpovídajících následných výbojů, repeated measure ANOVA pro srovnání ADs.

3. Video-EEG monitorování

V určených časových odstupech po prodělaném SE (3, 20 a 33 dnů) byly celkem 90 zvířatům stereotakticky implantovány pouze registrační elektrody do dorzálního pravého hipokampu a neokortexu a zvířata byla následně napojena na kontinuální 24 hodinové V-EEG monitorování za účelem zachycení spontánních epileptických záchvatů. Postup implantace elektrod, jejich umístění a fixace byl totožný jako v předchozí části pokusu s kortikální stimulací. Výsledky byly srovnány s kontrolními skupinami.

4. Farmakologické ovlivnění excitability agonisty A1R a inhibitory ADK

V této části práce byl zvířatům aplikován selektivní agonista A1R 2-chloro-N6-cyclopentyladenosin (CCPA) v dávce 0,5mg/kg a 1 mg/kg intraperitoneálně, u zvířat po SE antagonistu ADK 5-iodotubercidin (5-ITU) v dávce 3,1mg/kg. Kontrolním zvířatům byl aplikován fyziologický roztok v dávce 1,0 ml/kg. Aplikace 5-ITU předcházela V-EEG monitorování u 15-, 32- a 45-denní skupiny zvířat po SE. K intraperitoneální aplikaci 5-ITU u monitorovaných zvířat došlo ve dvou dávkách, první aplikace byla provedena 2 hodiny po ukončení LiCl-pilocarpinového SE a druhá s odstupem 24 hodin, aplikovaná dávka byla v obou případech 3,1 mg/kg.

5. Western blot

Pro účely tohoto experimentu bylo použito 90 samců potkana kmene Wistar v různém věkovém zastoupení odpovídající vývojovému profilu lidského mozku od novorozence pro ranou dospělost (7-, 10-, 12-, 15-, 18-, 25-, 32-, 45- a 52-denní zvířata). Zvířata byla usmrcena inhalační analgosedací v etherové komoře, mozková tkáň hipokampů zmrazena v -80 °C a následně analyzována pomocí metody Western blot (WB).

Výsledky

1. Vliv agonisty A1R na změny excitability hipokampu v průběhu ontogeneze

Prahová intenzita

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 kontrolami. Podobný výsledek byl zaznamenán u 45-denní skupiny zvířat, ale pouze u vyšší dávky CCPA (1,0 mg/kg).

Hipokampální následné výboje

Obě dávky CCPA vedly ke zkrácení délky ADs u 45- ($p = 0,021-0,035$ a $p = 0,004-0,039$) i 60-denních potkanů ($p = 0,005-0,019$ a $p = 0,007-0,023$). Po aplikaci dávky 1,0 mg/kg došlo ke zkrácení délky ADs u 12- ($p = 0,014-0,459$), 15- ($p = 0,017-0,203$) a 18-denních potkanů ($p = 0,023-0,232$). Opačný efekt po aplikaci CCPA v dávce 1,0 mg/kg byl zaznamenán u 25-denní skupiny zvířat, kdy došlo k prodloužení ADs ($p = 0,009-0,047$).

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

Prahová intenzita

Práh intenzity stimulačního proudu byl u 15-denních potkanů po SE signifikantně vyšší oproti kontrolám ($p = 0,0017$). Opačný výsledek byl pozorován

u skupiny 32-denních potkanů po SE ($p = 0,047$). Aplikací 5-ITU u 15-denních zvířat po SE došlo ke snížení ($p = 0,0081$), 32-denní skupina po SE naopak měla práh prokazatelně vyšší ($p = 0,0057$).

Hipokampální následné výboje

LiCl-pilokarpinový SE prokazatelně zkrátil délku ADs u 15-denních zvířat ($p = 0,0001-0,0381$). Naopak u 32-denních potkanů bylo výsledkem výrazné prodloužení ADs ($p = 0,0104-0,0350$). Aplikace 5-ITU vedla ke zkrácení ADs jak u kontrol, tak po SE u 12-, 15- i 32-denní skupiny zvířat.

Spontánní epileptické záchvaty

U kontrol nebyl prokázán žádný spontánní záchvat. Ty byly pozorovány až v delším odstupu po SE - u 50% 32-denních zvířat, 40% 45-denních zvířat po SE. Průměrný počet záchvatů byl 3,6 u 32-denních zvířat a 3,25 u 45-denní skupiny po SE. 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 přechod do bilaterálně tonicko-klonického záchvatu. Aplikace 5-ITU po ukončení SE vedla nejen k redukci incidence spontánních záchvatů ale i celkového počtu spontánních epileptických záchvatů u 32- a 45-denní skupiny zvířat. Pouze 30% zvířat vykazovalo spontánní epileptickou aktivitu s průměrným množstvím 2 záchvatů u 32- a 1,3 záchvatu u 45-denních zvířat po přechozí aplikaci 5-ITU.

3. Vývojový profil adenosinového receptoru A1 a isoform ADK

Ze zásadních výsledků byla prokázána nejvyšší exprese A1R v hipokampu u 10-denních zvířat, poté došlo k signifikantnímu poklesu u 25-denních ($p < 0,01$) a starších věkových skupin.

Expresí isoformy ADK-L v průběhu vývoje nevykazovala signifikantní rozdíly. U ADK-S došlo k postupnému zvyšování exprese v průběhu rané ontogeneze. Signifikantní rozdíly byly zaznamenány u 18- ($p = 0,0047$), 21- ($p = 0,0416$), 32- ($p = 0,0342$) a 45-denních potkanů ($p = 0,0280$) v porovnání

s nejmladší skupinou. Nejvyšší exprese isoformy ADK-S byla prokázána u 18-denní skupiny potkanů. Klesající poměr ADK-L/ADK-S demonstroval narůstající expresi ADK-S v porovnání s ADK-L.

SE vedl k poklesu exprese isoformy ADK-L v časovém odstupu 6 hodin po SE ($p = 0,021$). Ve stejné věkové skupině byly výsledky u exprese isoformy ADK-S přesně opačné ($p = 0,0425$). V časovém odstupu 3 a 20 dnů byl zjištěn signifikantní rozdíl pouze u isoformy ADK-L, u 15- ($p < 0,0001$) a 32-denních zvířat ($p = 0,0466$) v porovnání s 12-denní skupinou po SE. Narůstající poměr ADK-L/-S po SE demonstroval přesně opačnou zvyšující se expresi ADK-L v porovnání s ADK-S.

Diskuze

Adenosin hraje významnou úlohu v patogenezi TLE (Boison a Aronica, 2015), jejímž podkladem jsou funkční i morfologické změny hipokampu. Adenosin zajišťuje svůj antikonvulzivní účinek zejména aktivací A1R (Dunwiddie a Masino, 2001). A1R byly již dříve spojeny s potlačením epileptiformní aktivity v hipokampu (Tancredi a kol., 1998), avšak podrobnosti o roli a možnosti ovlivnění A1R v jednotlivých fázích vývoje mozku nebyly doposud popsány.

Z dosavadních poznatků exprese A1R rapidně stoupá v průběhu progresivní maturace neuronů a myelinizace (Rivkees, 1995a). V porovnání s předchozími studii byly podhaleny rozdíly v expresi A1R v hipokampu v průběhu vývoje. Při narození dosahuje exprese A1R přibližně 10% zastoupení v porovnání s dospělostí (Marangos a kol., 1982), maxima exprese A1R dosahuje v průběhu 2. postnatálního týdne (Descombes a kol., 1998). Konkrétní údaje o expresi A1R v hipokampu u nezralého mozku ale nebyly v těchto pracích popsány. V disertační práci byl zdokumentován počáteční nárůst exprese A1R od 7. po 10. den postnatálního vývoje, ve kterém dosáhl svého maxima, poté následoval pokles v dalším vývoji. A1R jsou zastoupené napříč různými typy buněk včetně buněk endotelu. S vývojem a růstem endotelových buněk, který dosahuje svého maxima v prvních 4 týdnech, dochází ke zvýšení exprese A1R (Mills a kol., 2011).

Z výsledku lze usoudit, 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.

Vůbec poprvé se v této práci studoval účinek A1R agonisty CCPA na excitabilitu hipokampu v průběhu ontogeneze. Byl popsán antikonvulzivní účinek CCPA s výjimkou 25-denních potkanů, kde byl pozorován přesně opačný efekt. 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 jejich vazebné kapacity a afinity (Cunha a kol., 1995). Může se dále uplatňovat sekundární zvýšení koncentrace adenosinu jako následek aplikace agonisty A1R (Boison, 2005) nebo přímé kortikální stimulace (Lewin a Bleck, 1981). V návaznosti na proběhlou epileptickou aktivitu byly pozorovány změny v densitě A1R, 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) vedoucí k dalšímu 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; Doriat a kol., 1996). Vazebná kapacita 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. 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 (Isomura a kol., 2003; Viitanen a kol., 2010). Podrobnější a doplňující studium metabolismu adenosinu s ohledem na komplexní

vývojové aspekty by mohlo vést k lepšímu porozumění mechanismu účinku a využití jeho analog v klinické praxi.

V druhé části disertační práce byly představeny změny excitability hipokampu v průběhu vývoje mozku v návaznosti na vyvolaný perinatální inzult. Byl použit model LiCl-pilokarpinového SE (indukovaný 12. den postnatálního vývoje), který patří mezi nejčastější animální modely ke studiu TLE (Curia a kol., 2008). SE navozuje široké spektrum strukturálních, metabolických, buněčných i molekulárních změn s dominantním postižením hipokampu (Dudek a Staley, 2011; Löscher a kol., 2015). 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).

Excitabilita hipokampu byla v práci opět studována pomocí hipokampálních ADs. V rámci přirozeného vývoje mozku byly v disertační práci prokázány věkové rozdíly v délce trvání ADs po SE. 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 a kol., 2000). Současně s časovým odstupem od vyvolaného SE u 32-denních a 45-denních potkanů byl prokázán rozvoj spontánních epileptických záchvatů s manifestací epilepsie. Mechanismy, které se působením LiCl-pilokarpinového SE podílejí na zvýšení excitability hipokampu a rozvoji TLE zahrnují kromě atrofie hipokampu dále např. ovlivnění receptorů excitačních AMK a jejich transporterů (Zhang a kol., 2004), synaptické reorganizace (Sankar a kol., 2000), navození oxidativního stresu a mitochondriální dysfunkce (Folbergova a kol., 2016), aktivace astrocytů a navození astroglie (Klein a kol., 2018). Jedním z přirozených obranných mechanismů po záchvatu je narůstání koncentrace extracelulárního adenosinu (Ilie a kol., 2012).

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 (Camm a Garrat, 1991) však není vhodným kandidátem k ovlivnění excitability hipokampu ve farmakologickém užití. Největšího pokroku a slibných výsledků doposud dosáhlo ovlivnění adenosinergního systému pomocí inhibice ADK (Boison, 2013).

Enzym ADK zásadním způsobem reguluje koncentraci adenosinu v mozku (Etherington a kol., 2009). Upregulace ADK souvisí se zvýšením excitability nervových buněk v důsledku snížení koncentrace adenosinu (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 extracelulárním prostředí (Boison, 2013). Oproti tomu se isoforma ADK-L uplatňuje jako epigenetický modulátor, zejména v metylaci DNA (Williams a Karnesky, 2013).

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 případě isoformy ADK-L žádné rozdíly v expresi v průběhu vývoje 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 (Gebril a kol., 2020; Gebril a kol., 2021) u 7-, 15- a 21-denních zvířat. V disertační práci však byla stanovena exprese isoform ADK reflektující kompletní vývojové zastoupení do dospělosti. Vůbec poprvé byly prezentovány výsledky exprese ADK v návaznosti na LiCl-pilokarpinový SE. Původní práce popisují nárůst exprese ADK v návaznosti na

akutní inzulty různé etiologie (Aronica a kol., 2011; Boison a kol., 2010). V bezprostřední návaznosti po vyvolání SE navíc dochází k rapidní downregulaci ADK (Gorter a kol., 2006; Sandau a kol., 2019). 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. Naopak ve stejném intervalu ihned po SE došlo k nárůstu isoformy ADK-S. S delším časovým odstupem (3 a 20 dní) po ukončení SE byl zaznamenán významný rozdíl v expresi isoformy ADK-L v porovnání se skupinou ihned po SE. Změny u ADK-S u kontrol ani po SE nevykazovaly žádné změny vůči věkově odpovídajícím skupinám. Narůstající poměr ADK-L/-S u zvířat po SE reflektuje narůstající expresi isoformy ADK-L oproti ADK-S, v porovnání s přirozeným vývojem je výsledek tedy opačný. Výsledky disertační práce podporují hypotézu, že změny excitability hipokampu po proběhlém 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). Farmakologickou inhibicí ADK dochází k rychlému poklesu adenosinu v ECT (Gouder a kol., 2004). Vysoce selektivní inhibitor ADK 5-ITU (Ugarkar a kol., 2000), který byl použit v disertační práci, má prokázaný efekt na redukci uvolnění glutamátu prostřednictvím zvýšení koncentrace adenosinu (Pazzagli a kol., 1995) a vede k potlačení epileptiformní aktivity v modelech indukovaných záchvatů a SE (Zang a kol., 1993; Gouder a kol., 2004). Doposud však nebyl efekt 5-ITU zkoumán v průběhu vývoje mozku. Hipokampální ADs byly potlačeny u zvířat s odstupem 20 dnů po SE. 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.

Závěr

Bližší pochopení mechanismů epileptogeneze včetně uplatnění adenosinu je klíčem k vytvoření nových možností terapie epilepsie. Disertační práce demonstrovala několik zásadních výsledků s vysokým potenciálem k využití v klinické praxi epileptologa. 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. Byl prokázán měnící se antikonvulzivní účinek agonisty A1R CCPA v závislosti na fázích vývoje hipokampu. Z výsledků disertační práce lze usuzovat, že užití CCPA v odpovídající fázi vývoje by mohlo vést k dosažení antikonvulzivního účinku. S ohledem na rezistenci agonistů A1R k metabolisujícím enzymům by mohly představovat budoucí terapeutickou možnost ovlivnění epileptických

záchvatů. Disertační práce objasnila vývojový profil isoform ADK v nezralém mozku v průběhu vývoje a v návaznosti na SE. Výsledky nasvědčují, že změny v expresi isoform ADK po SE hrají významnou roli v excitabilitě vyvíjejícího se hipokampu. Zejména zvýšení exprese isoformy ADK-L po 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. Inhibitory ADK by na základě těchto dat mohly představovat nový mechanismus léčby epilepsie. V budoucnosti 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.

Souhrnně lze konstatovat, že všechny čtyři hypotézy byly potvrzeny.

Literatura

- 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): 102-116.
- 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.
- 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.
- 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 pharmacoresistant 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. Adenosine kinase: exploitation for therapeutic gain. *Pharmacol Rev* (2013) 65, 906-943.
- Boison, D., Aronica, E. (2015). Comorbidities in Neurology: Is adenosine the common link? *Neuropharmacology* 97: 18-34.
- Boison, D., Chen, J.F., Fredholm, B.B. (2010). Adenosine signaling and function in glial cells. *Cell Death Differ* 17: 1071-1082.
- Camm, A. J., Garratt, C. J. (1991). Adenosine and supraventricular tachycardia. *N. Engl. J. Med.* 325, 1621-1629.
- 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.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. (2011). Seizure probability in animal models of acquired epilepsy: a perspective on the concept of the preictal state. *Epilepsy Res* 97: 324-331.
- 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.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A. (2001). The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 24: 31-55.
- 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., 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- George, B.; Kulkarni, S.K. (1997). Modulation of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus by adenosinergic agents. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 19: 329-333.
- 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., 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.
- 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.
- 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.
- 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⁻ accumulation responsible for depolarizing GABAergic responses in mature hippocampal neurons. *Journal of neurophysiology* 90(4): 2752-2756.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lewin, E., Bleck, V. (1981). Electroshock seizures in mice: effect on brain adenosine and its metabolites. *Epilepsia* 22(5): 577-581.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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., 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., Sebastião, A.M., de Mendonca, 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.
- 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.
- Rosenow, F., Hamer, H.M., Knake, S. (2007). The epidemiology of convulsive and nonconvulsive status epilepticus. *Epilepsia* 48 Suppl 8: 82-84.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Viitanen, T., Ruusuvuori, E., Kaila, K., Voipio, J. (2010). The K⁺-Cl cotransporter KCC2 promotes GABAergic excitation in the mature rat hippocampus. *The Journal of physiology* 588(Pt 9): 1527-1540.
- Wieraszko, A., Seyfried, T. N. (1989). ATP-induced synaptic potentiation in hippocampal slices. *Brain research* 491(2): 356–359.
- 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.
- 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, 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.

Souhrn

Předkládaná disertační práce se zabývá vlivem perinatálního inzultu vyvolaného užitím LiCl-pilokarpinového epileptického statu (SE) na změnu excitability hipokampu a riziko rozvoje epilepsie. Teoretická část poskytuje přehled dosavadních znalostí o následcích SE vedoucí k rozvoji temporální epilepsie (TLE). Představeny jsou nejčastější animální modely ke studiu TLE. Podrobně je uvedena problematika úlohy adenosinergního systému ve vztahu k excitabilitě hipokampu. Hlavním cílem této disertační práce bylo objasnit expresi A1R a ADK v rámci přirozeného vývoje mozku a odhalit změny po působení SE. V různých stádiích vývoje mozku jsem farmakologickým ovlivněním A1R a

inhibicí ADK studoval změny antikonvulzivního účinku. Excitabilita hipokampu byla studována na modelu hipokampálních následných výbojů (ADs) v různých stádiích ontogeneze a výsledky korelovány se změnami exprese A1R a ADK. Indukcí LiCl-pilocarpinového SE bylo prokázáno iniciální snížení excitability hipokampu, v delším časovém odstupu se však měnila v hyperexcitabilitu spojenou s rozvojem spontánních epileptických záchvatů. V průběhu vývoje hipokampu bylo prokázáno zvýšení exprese ADK-S, exprese ADK-L se neměnila. Indukce SE souvisela s počátečním snížením exprese ADK-L, naopak s odstupem se zvýšila, u ADK-S tomu bylo ihned po SE. A1R vykazovala nejvyšší expresi 10. den vývoje, poté došlo k pozvolnému poklesu až do dospělosti. Administrací agonisty A1R a inhibitoru ADK bylo prokázáno výrazné snížení excitability hipokampu, v případě inhibice ADK i k poklesu incidence epileptických záchvatů po SE. Vývojové změny exprese A1R a ADK mohou významně ovlivňovat excitabilitu hipokampu a tím se podílet na rozvoji epilepsie. Farmakologické ovlivnění A1R a ADK s vhodným načasováním aplikace tak představuje nové možnosti léčby i prevence epilepsie.

Summary

The aim of this thesis is to study the role of a perinatal insult using LiCl-pilocarpine status epilepticus (SE) on hippocampal excitability and risk of epilepsy development. The theoretical part provides an overview of current knowledge about the consequences of SE leading to the development of temporal lobe epilepsy (TLE). Animal models for studying TLE and the impact of adenosinergic system on hippocampal excitability are presented. The main goal of the thesis is to elucidate the changes in A1R and ADK isoform expression during brain development and after SE, and whether potential changes may contribute to

changes in hippocampal excitability. Pharmacological potentiation of A1R as well as inhibition of ADK may bolster anticonvulsant effect during brain development and after SE. Hippocampal excitability was studied by the model of hippocampal afterdischarges (ADs) and correlated with changes of A1R and ADK isoforms in the hippocampus. Initially after SE induction, ADs demonstrated significantly decreased hippocampal excitability, whereas significant hyperexcitability accompanied with spontaneous seizures in older rats was shown. Increasing ADK-S isoform expression during early brain development was revealed, ADK-L isoform remained unchanged. In SE rats, ADK-L showed initial decline in expression followed by an increase, whereas ADK-S demonstrated declined expression on the day of SE induction. A1 receptor expression in the hippocampus was highest in 10-day-old rats and decreased thereafter. Administration of A1R agonist and ADK inhibitor showed inhibitory effect on the ADs as well as incidence of spontaneous seizures. Age-related differences in hippocampal excitability might be due to development of A1R and ADK in the hippocampus. A1R agonists and ADK inhibitors may represent promising approaches to develop new anticonvulsant and/or preemptive therapy of epilepsy in the future.

Přehled publikační činnosti autora

1. 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)**

2. 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)**

3. 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.

4. Přednášky, posterová sdělení

Fabera, P., Parizkova, M., Uttl, L., Vondrakova, K., Kubova, H., Tsenov, G., Mares, P. *Effect of A1 adenosine receptor agonist CCPA in hippocampal excitability during brain development in rats.* 13th European Congress on Epileptology, Vídeň, Rakousko, 2018.

Fabera, P., Parizkova, M., Uttl, L., Vondrakova, K., Kubova, H., Tsenov, G., Mares, P. *Effect of A1 adenosine receptor agonist CCPA in hippocampal*

excitability during brain development in rats. Studentská vědecká konference 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha, 2018.

Fabera, P., Kubova, H., Mares, P. *The effect of status epilepticus on hippocampal afterdischarges in immature rats.* The 6th London Innsbruck Colloquium on Status Epilepticus and Acute Seizures, Salzburg, Rakousko, 2017.

Fabera, P., Kubova, H., Mares, P. *The correlation of GABA and adenosine concentrations with changes in hippocampal excitability after status epilepticus in immature rats.* 32nd International Epilepsy Congress, Praha, 2016.

Fabera, P., Uttl, L., Kubova, H., Tsenov, G., Mares, P. *Úloha adenosinu ve změně excitability adenosinu hippokampu po epileptickém statu.* Studentská vědecká konference 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha, 2016.

Fabera, P., Parizkova, M., Kubova, H., Mares, P. *Effect of A1 adenosine receptor agonist in hippocampal afterdischarges in immature rats.* 10th FENS Forum of Neuroscience, Kodaň, Dánsko, 2016.

Fabera, P., Kubova, H., Mares, P. *The correlation of GABA and adenosine concentrations with changes in hippocampal excitability after status epilepticus in immature rats.* 31st International Epilepsy Congress, Istanbul, Turecko, 2015.

Fabera, P., Kubova, H., Mares, P. *The effect of status epilepticus on hippocampal afterdischarges in immature rats.* 12th European Congress on Epileptology, Stockholm, Švédsko, 2014.