

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

FARMAKOLOGICKÉ OVLIVNĚNÍ MOTORIKY MLÁĐAT LABORATORNÍHO  
POTKANA

Diplomová práce

Autor: Mariana Stehlíková, obor fyzioterapie

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

Praha 2009

Jméno a příjmení autora: Bc. Mariana Stehlíková

Název diplomové práce: Farmakologické ovlivnění motoriky mláďat laboratorního potkana

Pracoviště: Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

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

Rok obhajoby diplomové práce: 2009

Abstrakt: Ganaxolon je nové potenciální antiepileptikum odvozené od progesteronového derivátu allopregnanolonu. Preklinické i klinické studie ukazují na jeho antikonvulzivní efekt při léčbě parciálních i generalizovaných typů epilepsií včetně částečného úspěchu u refrakterních epilepsií. Cílem studie bylo zjistit vliv ganaxolonu na motoriku mláďat laboratorního potkana a specifika vázaná na prepubertální věk potkana korelující s věkem dítěte. Otestováno bylo celkem 90 potkanů ve věku 12, 18 a 25 dnů. V každé věkové kategorii jsme hodnotili efekt dávky 20 mgGNX/kg a 40 mgGNX/kg porovnávaný s kontrolní skupinou. Pro posouzení motoriky jsme spolu se subjektivním hodnocením využili righting test, bar holding test, wire mesh test, negative geotaxis test a open field test volené s ohledem na věk potkana. U žádného testu nebyly vedlejší účinky na motoriku signifikantně potvrzeny. Studie tedy prokázala, že ganaxolon v efektivním antikonvulzivním množství nepůsobí zřetelně toxicky na motoriku mláďat laboratorního potkana.

Klíčová slova: ganaxolon, motorické testování, vývoj, potkan

Souhlasím s půjčováním diplomové práce v rámci knihovních služeb.

Author's first name and surname: Bc. Mariana Stehlíková

Title of the master thesis: Farmacological affection of the motor performance in immature rats

Department: Department of Rehabilitation and Exercise Medicine

Supervisor: Prof. MUDr. Pavel Mareš, DrSc.

The year of presentation: 2009

Abstract: Ganaxolone is a new potencional antiepileptic drug, synthetic analog of allopregnanolone which is a metabolite of progesterone. Preclinical and clinical studies point out its anticonvulsive effect in the treatment of both partial and generalized seizures including refractory epilepsy. The aim of our research was to investigate changes in the motor performance of the immature rats after administration of ganaxolone. We also focused on the relation between motoric impairment and the age of the rats which correlates with the age of children. 90 immature rats of age 12, 18 and 25 days were tested. Rats were divided in three groups injected with doses of 20 mgGNX/kg or 40 mgGNX/kg and the control group. The tests for assessing motor performance were chosen with respect to the maturation of sensorimotor reflexes from the following battery of tests: righting test, bar holding test, wire mesh test, negative geotaxis test and open field test. There were no significant differences before and after injection of the drug and in comparison with the control group not even in comparison of classes of age. We have demonstrated that the dose of ganaxolone effective against epileptic seizures does not markedly affect the motoric performance of the immature rats.

Keywords: ganaxolone, motor testing, ontogeny, rat

I agree the thesis paper to be lent within the library service.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením Prof. MUDr. Pavla Mareše, DrSc., uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky.

V Praze dne 17. 4. 2009

.....

Děkuji Prof. MUDr. Pavlu Marešovi, DrSc. za cenné rady a návrhy při vedení a pomoc při zpracování diplomové práce a zaměstnancům Fyziologického ústavu AV ČR za technickou pomoc a rady při přípravě měření. Dále děkuji Mgr. Pavlu Bubákovi, PhD za pomoc se statistickým zpracováním dat a s anglickým překladem některých pasáží a své rodině, partnerovi a přátelům děkuji za velikou podporu.

## OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 GANAXOLON.....	9
2.1 Chemická struktura látky.....	9
2.2 Účinnost ganaxolonu.....	10
2.2.1 Výsledky studií.....	10
2.3 Toxikologie ganaxolonu.....	12
2.4 Dávkování a farmakokinetika ganaxolonu.....	13
3 NEUROINHIBICE V LÉČBĚ EPILEPSIE.....	15
3.1 Patogeneze epileptických záchvatů.....	15
3.2 Mechanismus neuroinhibičního působení antiepileptik.....	16
3.3 Procesy na GABAergních receptorech.....	20
4 POSTNATÁLNÍ MOTORICKÝ VÝVOJ LABORATORNÍCH POTKANŮ V POROVNÁNÍ S ČLOVĚKEM.....	23
4.1 Dvanáctidenní mláďata laboratorního potkana.....	24
4.2 Osmnáctidenní mláďata laboratorního potkana.....	25
4.3 Dvacetipětidenní mláďata laboratorního potkana.....	25
5 CÍLE A HYPOTÉZY.....	27
6 METODIKA.....	28
6.1 Výběr zvířat.....	28
6.2 Testy motorických dovedností.....	29
6.2.1 Surface righting test.....	29
6.2.2 Negative geotaxis test.....	29
6.2.3 Wire mesh ascending test.....	29

6.2.4 Bar holding test.....	30
6.2.5 Open field test.....	30
6.3 Aplikovaná látka.....	31
6.4 Statistické zpracování dat.....	31
7 VÝSLEDKY.....	32
7.1 Surface righting test.....	32
7.2 Negative geotaxis test.....	32
7.3 Wire mesh ascending test.....	33
7.4 Bar holding test.....	35
7.5 Open field test.....	37
7.6 Testování hypotéz.....	40
8 DISKUZE.....	41
9 ZÁVĚR.....	45
10 SHRNU TÍ.....	46
11 SUMMARY.....	47
12 REFERENČNÍ SEZNAM.....	48

## SEZNAM ZKRATEK

AED	– Antiepileptika
AMPA	– $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-isoxazole-4-propionat
CNS	– Centrální nervová soustava
EEG	– Elektroencefalografie
GABA	– Kyselina gama-amino-máselná
GNX	– Ganaxolon
NMDA	– N-methyl-D-aspartat

# 1 ÚVOD

Farmakorezistentní epilepsií trpí 25-30 % všech diagnostikovaných pacientů s opakovanými epileptickými záchvaty. Kromě chirurgické léčby je pro tyto jedince velkou nadějí vývoj nových antiepileptik, která by byla schopna svou účinnost prokázat i u takto těžce postižených pacientů. Neléčení epilepsie může mít pro pacienta kromě výrazných psychosociálních důsledků také riziko přímého ohrožení epileptickými záchvaty nebo u dětí psychomotorickou retardací. Každý nový lék musí projít dlouhým několikastupňovým výzkumem, který má odhalit jeho účinnost, jeho farmakokinetiku, bezpečnost a vedlejší účinky. U neurofarmak se v první řadě zaměřujeme na nežádoucí působení v oblasti centrální nervové soustavy, které se mimo jiné může projevit změnami v motorice jedince. V našem výzkumu jsme tyto motorické projevy studovali a snažili jsme se vyhodnotit závažnost jejich změn při podání vybraného neuromodulátoru – neuroaktivního steroidu ganaxolonu, který je vyvíjen jako antiepileptikum.

Na první pohled se může zdát, že mezi fyzioterapií a testováním nového antiepileptika není žádná souvislost. Podle světové konfederace pro fyzioterapii je cílem fyzioterapie maximalizovat schopnosti pacienta a kvalitu jeho života prevencí, intervencí a rehabilitací. Pacienti s epilepsií se mohou objevit v ordinaci fyzioterapeuta stejně jako kterýkoliv jiný člověk. Je však dobré si uvědomit všechny důsledky, které léčba epilepsie přináší a které mohou ovlivňovat nejen terapii, ale i kvalitu života pacienta. Fyzioterapie se snaží o to, aby byla rovnocenným a respektovaným medicínským oborem se vzdělanými odborníky. K tomuto cíli se snaží zvýšit informovanost odborné veřejnosti o jejím obsahu a důležitosti. Nicméně dle mého názoru musí jít fyzioterapie zároveň vstříc oněm zdánlivě vzdáleným oborům a podílet se na rozvoji medicíny i z jiných úhlů, než bylo doposud zvykem. Vážím si možnosti být součástí preklinického výzkumu hodnotícího míru motorického deficitu po aplikaci farmaka. Jako fyzioterapeut tak mohu zasáhnout do farmakologické intervence, kterou obvykle fyzioterapie obchází.



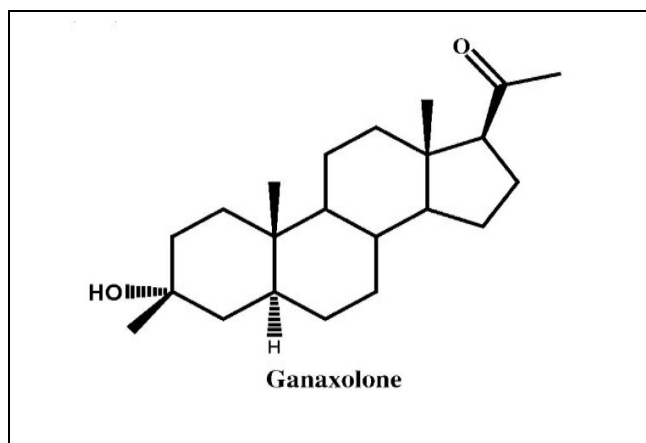
## 2 GANAXOLON

Ganaxolon (GNX) byl syntetizován týmem profesora E. P. Monaghana v 90. letech 20. století. Od roku 2004 probíhá komerční výzkum pro zjištění jeho využití jako nového antiepileptika (Nohria, Giller, 2007). Ganaxolon patří do skupiny neuroaktivních steroidů, tedy látek, které mají podobnou strukturu a účinky jako neurosteroidy, ale nejsou vytvářené v centrální nervové soustavě (CNS). Neurosteroidy hrají významnou roli v nastavení excitability neuronů modulací inhibičních receptorů pro kyselinu gama-amino-máselnou (GABA) a dalších iontropních receptorů (Dorda et al., 2001) (viz kapitola 3.2, 3.3).

### 2.1 Chemická struktura látky

Přirozené neurosteroidy vytvářené přímo v mozkové tkáni patří mezi rychlé modulátory excitability neuronů (Reddy, 2004). Podskupinou neurosteroidů jsou epalony, deriváty progesteronu (Levy et al., 2002), mezi které patří i allopregnanolon a tetrahydrodeoxykortikosteron (Dorda et al., 2001). Tyto dvě látky působí na stejném vazebném místě na GABA-A receptoru a zvyšují inhibiční signál. GNX je synteticky vyrobeným analogem allopregnanolonu (Nohria, Giller, 2007). Od allopregnanolonu se ganaxolon liší přídáním methylovou skupinou, která brání rychlému odbourávání charakteristickému pro metabolity progesteronu. Jeho chemický vzorec je  $3\alpha$ -hydroxy- $3\beta$ -methyl- $5\alpha$ -pregnan-20-one (Bialer et al., 2007) (Obrázek 1).

GNX je krystalická bílá látka nerozpustná ve vodě. Proto je podáván ve formě suspenze nebo tablet (Nohria, Giller, 2007).



**Obrázek 1.** Chemická struktura ganaxolonu (Bialer et al., 2007)

## 2.2 Účinnost ganaxolonu

Narozdíl od progesteronu, GNX postrádá klasické hormonální účinky (Bialer et al., 2007). Zato si však ponechává výrazný vliv na allosterickou modulaci GABA-A receptorů, typický pro progesteronové deriváty.

GNX ovlivňuje vazebná místa v chloridovém kanálu (Monaghan et al., 1997) a zároveň usnadňuje vazbu benzodiazepinů a kyseliny gama-amino-máselné (Nohria, Giller, 2007). Dle Monaghana et al. (1997) tak GNX působí na specifickém receptorovém místě pro neurosteroidy a mění konfiguraci vazebného komplexu. Výsledkem je posílení funkce GABA-A receptoru a s tím spojený útlum neuronální excitability.

Studie zkoumající účinky ganaxolonu došly k závěru, že GNX má sedativní, anxiolytický, antidepressivní a především antikonvulzivní efekt. Jeho výhodou oproti jiným neurosteroidům je delší biologický poločas, vysoká afinita ke GABA-A receptoru, vyloučené hormonální působení, možnost orálního podání a přijatelné vedlejší účinky.

### 2.2.1 Výsledky studií

Jedna z prvních studií zabývajících se účinky ganaxolonu (Carter et al., 1997) odhaluje široké možnosti využití ganaxolonu u rozsáhlého spektra epileptických záchvatů, které jsou však

v této studii sledovány na myších a potkanech. Preklinická studie Liptákové et al. (2000) sledovala účinnost GNX na primární generalizované záchvaty vyvolané u dospělých i nezralých potkanů. Výsledky ukazují na stejnou antikonvulzivní účinnost GNX u potkanů různého věku a větší efekt proti tonicko-klonickým záchvatům narozdíl od čistě klonických. Z výsledků je zároveň patrná vzájemná závislost velikosti potřebné antikonvulzivní dávky na věku potkana. U 9-denních a 15-denních potkanů bylo pro potlačení záchvatu nutné aplikovat nižší dávku ganaxolonu, jíž účinek zároveň přetrvával déle. Na druhou stranu měl ganaxolon u nižších věkových skupin narozdíl od dospělých jedinců vliv na motorické chování jedince. Snead (2000) na potkanech testoval účinek ganaxolonu u absencí vyvolaných pentylentetrazolem a gama-hydroxy máselnou kyselinou. Z výsledků vyplývá, že podávání ganaxolonu může zhoršit záchvaty absence.

Catamenická epilepsie vznikající u žen trpících epilepsií se projevuje před nebo během menstruace, tedy v té fázi ovulačního cyklu, kdy v séru klesá koncentrace progesteronu (Reddy, Rogawski, 2000b; Rogawski, 2004). U těchto pacientek se záchvaty nepodařilo snížit přírodními neurosteroidy, které se příliš rychle inaktivují. Reddy a Rogawski (2000b) provedli výzkum na samicích potkanů, u kterých uměle vyvolali náhlé snížení koncentrace neurosteroidů. V porovnání s valproatem a benzodiazepinem, které při snížení koncentrace neurosteroidů zároveň sniží svou účinnost, působil GNX antikonvulzivně zvýšenou intenzitou.

Lechtenberg et al. (1996) zjišťovali účinek ganaxolonu u dětí s refrakterní epilepsií a zaznamenali u poloviny probandů více než poloviční snížení frekvence epileptických záchvatů. Podobnou studii prováděli i Pieribone et al. (2007). Ta sice pro nízký počet pacientů neumožnila statistickou analýzu, ale přesto ukázala antikonvulzivní efekt ve zvýšené míře u poloviny sledovaných dětí.

U dětí trpících infantilními spasmy je léčba antiepileptiky (AED) ve více než polovině případů neúspěšná a dostupná terapie adrenokortikotropním hormonem má výrazné vedlejší účinky (Kerrigan et al., 2000). Pacientům byla po 4 týdny aplikována zvyšující se dávka GNX do

maxima 36 mg/kg/den (Kerrigan et al., 2000). Třetina dětí vykazala více než 50% snížení frekvence záchvatů, druhá třetina pocítila snížení frekvence záchvatů o 25 – 50% a u poslední třetiny toto snížení dosahovalo maximálně 25%. Tito pacienti jsou bez terapie ohroženi výrazným rizikem těžké psychomotorické retardace (Velíšek et al., 1992).

První testování účinku GNX na pacientech s parciální epilepsií provedl Laxer et al. (2000). V dvojité slepé studii autoři využili snížení dávky antiepileptik pod 25% kvůli zvažování chirurgického zásahu u probandů. U 50% pacientů GNX působil antikonvulzivně, avšak tento výsledek nebyl signifikantní. Nicméně autoři předpokládali, že pokud by pokus trval déle a zahrnoval by více pacientů, rozdíl mezi skupinou s GNX a skupinou s placebem by se zvyšoval.

### **2.3 Toxikologie ganaxolonu**

Liptáková et al. (2000) uvádí, že rozvoj vedlejších účinků na motoriku při testech na potkanech byl výraznější u mladších věkových skupin. Nicméně preklinické studie ukazují, že efektivní dávka GNX není toxická pro organismus (Liptáková et al., 2000). U dospělých potkanů vysoké dávky ganaxolonu kolem 40 mg/kg při dlouhodobém několikaměsíčním podávání způsobily zvětšení váhy ledvin a jater avšak bez signifikantních histologických změn (Nohria, Giller, 2007). V klinické studii Monaghana et al. (1997) byl GNX u zdravých probandů přijímán bez potíží včetně u těch s nejvyšší aplikovanou dávkou 1500 mg/den. GNX nijak neovlivnil vitální funkce ani EKG obraz. Pokud se objevily nežádoucí účinky, byly mírné a zahrnovaly závrať, nerovnováhu, poruchy koordinace a koncentrace, únavu, spavost a malátnost.

Ženy si častěji stěžují na vedlejší účinky (ve dvou třetinách případů), které se však svou kvalitou neliší od těch u mužů (Monaghan, Densel, Lechtenberg, 1996). Udávanými potížemi u obou pohlaví byly opět sedace, závrať, bolest hlavy a únava.

U dětí s refrakterní epilepsií ve věku mezi 5 a 15 roky byly při vícenásobných aplikacích 1 – 12 mg/kg zaznamenány lehké až střední potíže zahrnující spavost, poruchy spánku, nervozitu,

zácpu a změny v typu záchvatů (Lechtenberg et al., 1996). Pieribone et al. (2007) udávají jako nejčastější vedlejší efekt GNX spavost. U dětí s infantilními spasmy se nejčastěji objevoval průjem, v menším počtu případů pak zácpa, zvracení, nervozita a generalizované tonicko-klonické záchvaty.

Lechtenberg et al. (2000) uvádí jako nejčastější stížnost pacientů závrať, která se v této studii v podobné míře objevila i u kontrolní skupiny s placebem.

## **2.4 Dávkování a farmakokinetika ganaxolonu**

Monaghan et al. (1997) zkoumali na lidských zdravých dobrovolnících maximální tolerovanou dávku GNX a reakce na ní. Část probandů dostávala jednorázovou dávku GNX podávaného v tabletách v rozmezí 50 – 1 500 mg, část dostávala jednu nebo dvě dávky denně po více dnů. Bylo zjištěno, že není rozdíl mezi farmakokinetikou GNX u ženských a mužských probandů (Monaghan et al., 1996; Monaghan et al., 1997). Látka se rychle vstřebala do krve a své nejvyšší koncentrace dosáhla 1-3 h po aplikaci. Willmore (2000) uvádí nejvyšší koncentraci GNX v plazmě mezi 0,6-6 hodinami. Závislost velikosti dávky a zvětšování koncentrace GNX v séru má však se zvyšující se dávkou klesající tendenci. Biologický poločas se pohybuje mezi 37 a 70 hodinami. GNX se v organismu nekumuluje (Monaghan et al., 1996; Monaghan et al., 1997) a nevzniká na něj tolerance ani při chronickém podávání (Reddy, Rogawski, 2000a).

Laxer et al. (2000) použili při své studii na pacientech dávky 625 mg 3x denně. Kerrigan et al. (2000) na dětech během 3 týdnů zvyšovali denní dávku GNX od 4,5 do 36 mg/den a Pieribone et al. (2007) aplikovali GNX ve stoupajícím množství od 2 do 36 mg/kg/den.

Nižší dávky ganaxolonu, než je efektivní dávka proti záchvatům vyvolaným pentylenetetrazolem u dospělých potkanů (3,45 mg/kg), mají anxiolytický účinek (Beekman et al., 1998). Vysoké dávky ganaxolonu u dospělých potkanů (33,4 mg/kg) naopak způsobují ataxii na rotorod testu (Carter et al., 1997). Dávky potřebné proti většině testovaných záchvatů jsou však

nižší (mezi 4,6 – 30 mg/kg) (Carter et al., 1997). Výjimku tvoří záchvaty vyvolané maximálním elektrošokem (Carter et al., 1997). Reddy a Rogawski (2000a) ve své studii na potkanech upozorňují na umocnění vzniku tolerance na benzodiazepiny při současném podávání ganaxolonu. Naopak antikonvulzivní efekt ganaxolonu se při současném podávání benzodiazepinů s časem nesnižuje. Tyto vzájemné interakce znamenají určitou limitaci pro podávání benzodiazepinů s ganaxolonem při dlouhodobé terapii.

### 3. NEUROINHIBICE V LÉČBĚ EPILEPSIE

Optimální činnost CNS je závislá na regulačních mechanismech, které neurální aktivitu usměrňují. Inhibiční procesy v mozku jsou důležitým regulátorem neurální aktivity. Při jejich absenci by se nervový vzruch lavinovitě šířil celým nervovým systémem podobně jako to vidíme u pacientů s epilepsií.

#### 3.1 Patogeneze epileptických záchvatů

Epilepsie je chronické neurologické onemocnění, pro které jsou typické opakované spontánní epileptické záchvaty s prevalencí zhruba 1% populace. Záchvatem se myslí přechodná porucha funkce mozku, která se projevuje mnoha způsoby odvislými od lokalizace epileptogenního ložiska. Na elektroencefalografii (EEG) se tato porucha projeví jako abnormálně silná a synchronizovaná aktivita velkého počtu neuronů, která je důsledkem nerovnováhy mezi excitací a inhibicí v CNS. U epileptických záchvatů inhibiční systém není schopen dostatečně silně reagovat na zvýšenou excitaci. Při neléčení onemocnění má šíření této excitační aktivity progredující charakter (Stępień et al., 2005). Podle délky a síly epileptického záchvatu dochází k poškození mozku (Stępień et al., 2005) a zároveň s tím stoupá i obtížnost jeho kontroly (Marik, Varon, 2004). Dle Halasze a Rasonyiho (2004) se nadměrná excitace a neuronální destrukce objevují nejčastěji současně. Marik a Varon (2004) tuto buněčnou smrt dávají do souvislosti s excitačními N-methyl-D aspartatovými receptory (NMDA), jejichž nadměrná činnost poškozuje neuron i zvýšením intracelulární koncentrace vápenatých iontů. Aby nedocházelo k smrti neurálních buněk, je nutné záchvat co nejdříve zastavit.

Na základě klinických a EEG projevů můžeme vysledovat dva základní druhy epilepsií – parciální epilepsie, jejichž výskyt je převažující, a primárně generalizované epilepsie, u nichž není možné nalézt primární ložisko záchvatu a jichž epileptogenní aktivita je zaznamenána na celém povrchu mozku (Velíšek et al., 1992). Vznik ložiska může být podmíněn inzultem mozkové tkáně

(nádor, ischemie, úraz hlavy, zánět CNS), ale i čistě geneticky (Marik, Varon, 2004). Je však důležité zmínit, že epileptogenní ložiska nemusí obsahovat morfologicky změněné buňky, ale porucha excitability může být funkční. Mechanismus vzniku patologických impulzů z mozku je vždy podobný, a tím je porucha iontových toků na membráně (Velíšek et al., 1992). Tato porucha může vzniknout blokem GABA, chloridového kanálu, nedostatkem hořečnatých a chloridových iontů v extracelulárním prostředí aj.

Pojem záchvatová pohotovost vyjadřuje úroveň rovnováhy mezi excitací a inhibicí v mozku (Jedlička et al., 2005). Ta je ovlivňována dědičností, stupněm bdělosti, zralostí mozku, hormonálním stavem organismu aj. Dětský nezralý mozek má větší schopnost generovat epileptický záchvat, než dospělý člověk, a proto je i nejvíce pacientů s epilepsií mezi dětmi (Velíšek et al., 1992). Zvláštním typem epilepsie jsou absence u idiopatické generalizované epilepsie. Zde není vhodné využívat léky podporující inhibici neuronů, protože synchronizované salvy neuronálních signálů vyvolávají následnou hyperpolarizaci talamokortikálních neuronů, po jejichž odeznění vzniknou nové excitační salvy (Jedlička et al., 2005).

### **3.2 Mechanismus neuroinhibičního působení antiepileptik**

Mnoho AED působí na synapsích pomocí více mechanismů a je možné je kromě epilepsie využít k léčbě migrén, neuropatické bolesti, bipolárních poruch, schizofrenie, úzkosti, mánie, tremoru aj. (Landmark, 2007). AED procházela a stále procházejí vývojem, který má vést ke zvyšování jejich účinnosti a snižování vedlejších účinků. Rozdělení do vývojových skupin některých antiepileptik zmíněných v této práci nebo v uvedených člancích znázorňuje tabulka 1. Porovnávací studie naznačují průkazné výhody nových antiepileptik oproti tradičním (LaRoche, Helmers, 2004). Výhodou většiny z nich je snížená toxicita a reaktivita s léky metabolizovanými v játrech. Nevýhodou je jejich finanční nákladnost (LaRoche, Helmers, 2004).



<b>Klasická AED</b>	<b>Moderní AED</b>	<b>Nová AED</b>	<b>Potenciální AED</b>
Fenobarbital	Benzodiazepiny	Felbamate	Ganaxolon
Fenytoin	Carbamazepin	Gabapentin	Pregabalin
Oxazolidiny	Valproat	Lamotrigin	Remacemide
Ethosuximid		Levetiracetam	Stiripentol
		Oxcarbazepin	Brivaracetam
		Tiagabin	Lacosamid
		Topiramat	
		Vigabatrin	
		Zonisamid	

**Tabulka 1** Rozdělení AED dle historického vývoje (LaRoche, Helmers, 2004; Willmore, 2000). V některé literatuře se tyto podskupiny označují jako léky 1. – 4. Generace.

Jak bylo již uvedeno, mechanismy působení AED jsou mnohočetné (Obrázek 2). V této kapitole zmíním jen ty základní inhibiční procesy. Jednou z možností ovlivnění neuronu je blokáda napěťově řízených kanálů pro sodíkové ionty. Tím se snižuje depolarizace na postsynaptické membráně. Na tyto kanály významněji působí např. carbamazepin, fenytoin, felbamat, topiramat, lamotrigin, oxcarbazepin a zonisamid (Landmark, 2007). Felbamat, lamotrigin, topiramat, zonisamid (LaRoche, Helmers, 2004) a pregabalin (Stępień et al., 2005) blokují napěťově řízené kanály pro vápenaté ionty.

Další způsob inhibice se zaměřuje na glutamatergní synapse. Buď AED působí přímo proti uvolňování glutamátu z vesikul, nebo je inhibiční působení zajištěno blokádou napěťově řízených sodíkových, draselných a vápenatých iontových kanálů (Wojtal et al., 2006). Levetiracetam a jeho analogy účinkují na synaptický vesikulární protein (SV2A) (Rogawski, 2006). Tento protein je součástí glutamátových vesikul (Landmark, 2007). Není zcela jasné, jakým způsobem tato vazba působí inhibičně, nicméně se předpokládá vliv na exocytózu, kterou se glutamát uvolňuje z buňky. Glutamát se může navázat na 4 skupiny receptorů: metabotropní receptory a 3 typy ionotropních receptorů N-methyl-D-aspartátový (NMDA) receptor,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-isoxazole-4-propionátový (AMPA) receptor a kainátový (KA) receptor (Wojtal et al., 2006). Poslední dva typy receptorů jsou označovány jako non-NMDA receptory. Úloha NMDA receptorů je důležitá

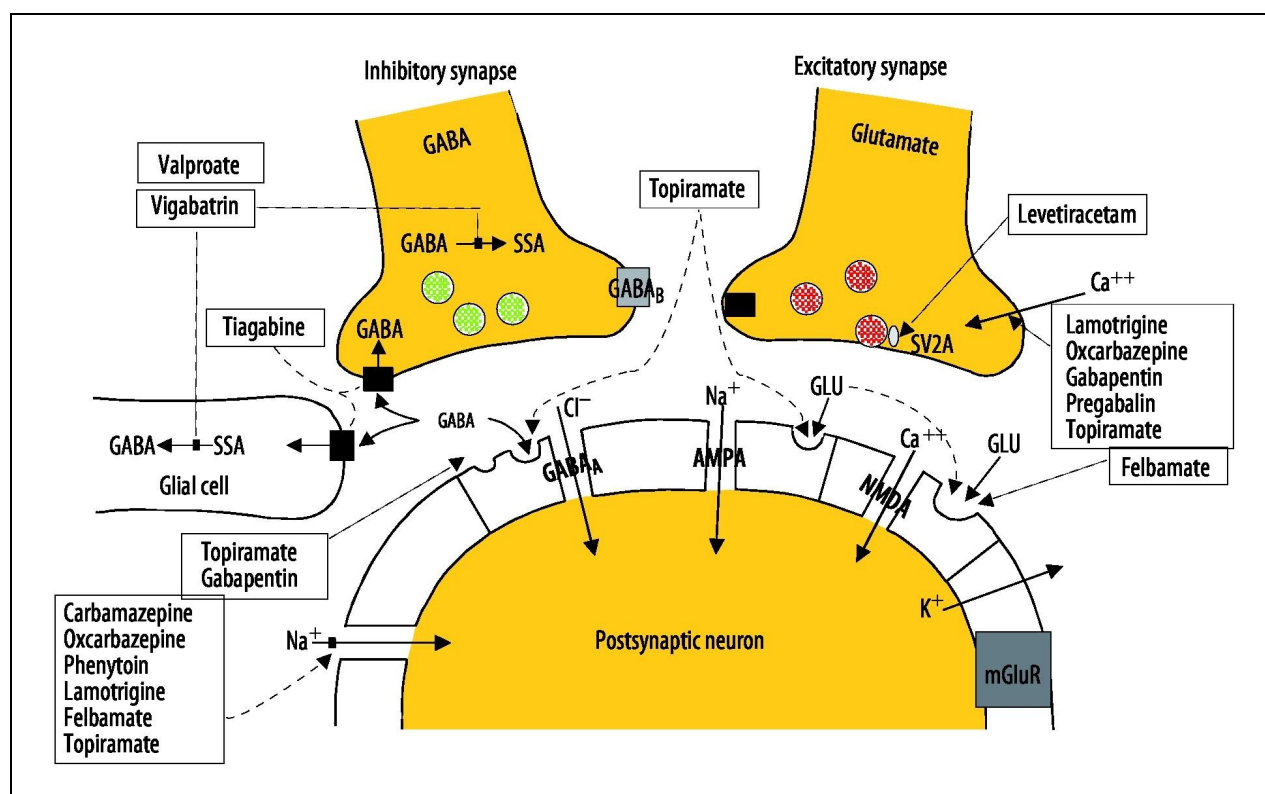
v procesech učení, paměti, motoriky, sensoriky i chování (Mikulecká, Mareš, 2001) a utváření synaptické plasticity (Wojtal et al., 2006). Non-NMDA receptory se starají o rychlý synaptický přenos a aktivují především sodíkové a draselné kanály (Wojtal et al., 2006). AMPA receptory jsou klíčové při šíření záchvatu (Landmark, 2007). Wojtal et al. (2006) uvádí, že antagonisté NMDA receptorů mají výrazné vedlejší účinky, a proto je vhodnější využít antagonisty AMPA a KA receptorů, např. topiramát (LaRoche, Helmers, 2004; Stępień et al., 2005).

Antiepileptika zaměřená na GABA receptory pozitivně modulují činnost GABA. Tiagabin specificky blokuje zpětné vychytávání GABA na presynaptické membráně neuronu i gliových buněk (Bialer et al., 2007). Stiripentol posiluje vyplavování GABA a prodlužuje aktivaci GABA-A receptoru (Bialer et al., 2007; Willmore, 2000). Benzodiazepiny allostericky působí na  $\alpha$  podjednotku GABA-A receptoru a zvyšují frekvenci otevírání chloridových kanálů. Jejich účinky mají výrazný sedativní a anxiolytický charakter. Barbituráty se váží na odlišné vazebné místo než benzodiazepiny a prodlužují dobu, po kterou je chloridový kanál otevřený. V neposlední řadě na GABA-A receptor allostericky působí neuroaktivní steroidy, např. ganaxolon, které zesilují účinnost GABA (Rogawski, 2006).

U některých AED se zatím neví přesný mechanismus účinku, přes jejich prokázaný antikonvulzivní efekt. Jedním z nich je i valproát, který je jako jeden z mála léků účinný jak proti parciálním, tak i proti generalizovaným záchvatům (LaRoche, Helmers, 2004, Rogawski, 2006). GABAergní mechanismy posiluje ovlivňováním nitrobuněčných signalizačních molekul. Podporuje tvorbu GABA a inhibuje její metabolismus (Landmark, 2007). Výraznou nevýhodou jsou jeho teratogenní vedlejší účinky, proto vznikají jeho více či méně podobné variace (Rogawski, 2006). Podobně jsou na tom znalosti o gabapentinu. Studie ukázaly, že gabapentin zvyšuje obsah GABA v neuronální tkáni, váže se na kanály pro vápenaté ionty (Stępień et al., 2005) a na GABA-A receptor (Landmark, 2007), nicméně Bialer et al. (2007) předpokládají, že působí jinak, než přes GABAergní receptor. Rozmanité účinky tohoto léku se využívají nejen u

refrakterních parciálních i generalizovaných epilepsií, ale i u neepileptických diagnóz jako je neuropatická bolest.

Craig (1996) na základě svých pokusů na myších došel k závěru, že steroidní látky jsou obecně méně antikonvulzivně účinné než nesteroidní sloučeniny. Přesto nepopírá jejich možné využití do budoucna, přičemž dokázal, že hormonální aktivita neuroaktivních steroidů nemá vliv na antikonvulzivní efekt daných látek. Sedláček et al. (2008) sledují chování neuroaktivních steroidů na ionotropních receptorech, konkrétně na pregnanolonu a pregnenolonu, které by v budoucnosti mohly nabídnout další možnosti pro působení prostřednictvím glutamatergních receptorů.



**Obrázek 2** Hlavní mechanismy působení AED (Landmark, 2006) přetištěno s laskavým svolením autorky. Černé čtverce označují proteiny zpětně vychytávající GABA a glutamát (GLU). Šedivě jsou označeny metabotropní receptory.

### 3.3 Procesy na GABAergních receptorech

GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem v CNS a je uvolňována GABAergními neurony (Marik, Varon, 2004). Tato aminokyselina se váže na 2 typy iontoropních receptorů (GABA-A, GABA-C) a 1 typ metabotropních receptorů (GABA-B). GABA receptory jsou makromolekulární proteiny, na kterých je mnoho specifických vazebných míst pro různé molekuly. Strukturální odlišnost jednotlivých typů GABA receptorů vede k rozdílné farmakologické senzitivě a tím i k rozdílné výsledné aktivitě. Historie rozlišování těchto tří receptorů reagujících na GABA se odvíjela právě od odhalování jejich specifických agonistů a antagonistů (Martin, Dunn, 2002).

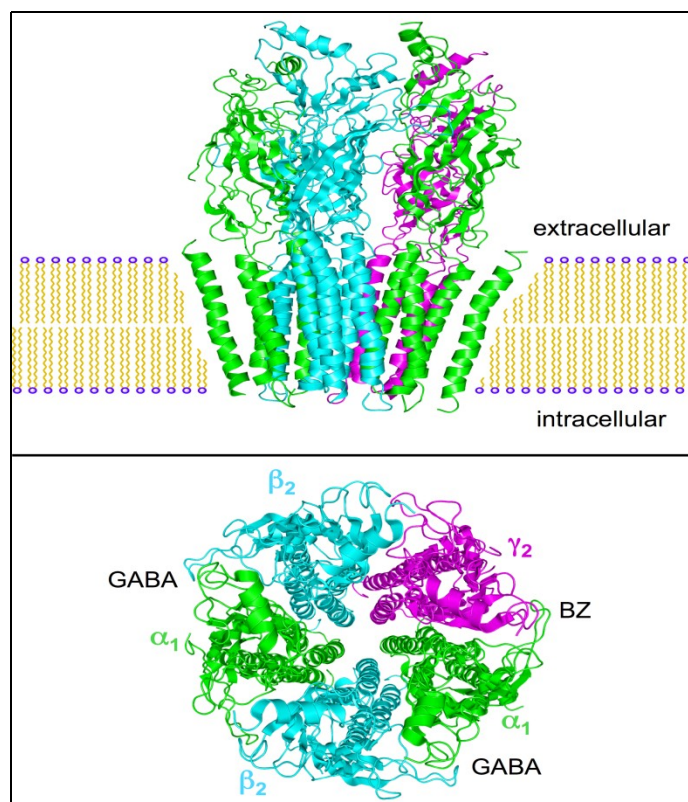
GABA-B receptory se skládají ze dvou podjednotek (Jorgensen, 2005) a nacházejí se na presynaptických zakončeních a na postsynaptických membránách (Meldrum, 1989). Kromě celého CNS se nacházejí i na periferních zakončeních autonomních nervů (Martin, Dunn, 2002). Přes G protein otevírají draselné kanály, kterými se vyrovnává intra- a extracelulární koncentrace draslíku, a tím dochází k hyperpolarizaci neuronu. GABA-B receptory omezením aktivity adenyl cyklázy snižují prostupnost pro  $Ca^{2+}$  (Meldrum, 1989) a svou prokazatelnou roli mají v modulaci uvolňování neurotransmiteru (Martin, Dunn, 2002). Na těchto receptorech je pro GABA agonistou baclofen využívaný k léčbě spasticity (Martin, Dunn, 2002).

GABA-C receptory stejně jako GABA-A receptory svou pentamerní strukturou tvoří na postsynaptické membráně iontový chloridový kanál, který se po navázání GABA otevře a umožní vstup chloridových iontů do buňky. Oproti GABA-A receptoru však iniciace chloridového toku naskakuje pomaleji, ale jejich aktivita je delší a silnější. Díky své odlišné struktuře podjednotek se liší i svými agonisty a antagonisty. Například zde nejsou vazebná místa pro benzodiazepiny, barbituráty a neuroaktivní steroidy (Martin, Dunn, 2002).

GABA-A receptory jsou složeny z pěti podjednotek – nejčastěji  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 2$  - které zároveň tvoří stěnu pro chloridový kanál v membráně neuronu (Obrázek 3) (Olsen, Tobin, 2005).

Pro GABA se vazebná místa nacházejí na  $\alpha$ - $\beta$  rozhraní. Můžou mít různě velikou afinitu (Martin, Dunn, 2002). Při aktivaci GABA-A receptoru se změní prostorové uspořádání na membráně a otevře se iontový kanál pro chloridové ionty, které v závislosti na elektrochemickém gradientu přestupují přes membránu, stabilizují klidový membránový potenciál a ztěžují tak vznik akčního potenciálu (Martin, Dunn, 2002). Jorgensen (2005) zmiňuje 2 typy inhibice, které mohou být pomocí GABA vyvolané. Jednak je to už výše popsaná hyperpolarizační inhibice, způsobená influxem chloridových iontů, jednak je to tzv. depolarizační inhibice. Stává se tak u buněk, které mají v intracelulárním prostoru více chloridových iontů, než by odpovídalo rovnovážnému stavu. Při otevření iontových kanálů proto dochází k efluxu chloridových iontů a k depolarizaci membrány. Otevřené chloridové kanály udržují koncentraci chloridových iontů v rovnovážném stavu, a tím brání další depolarizaci. Tento proces zároveň inaktivuje sodíkové kanály (Jorgensen, 2005).

Struktura GABA-A receptorů však není v celém mozku jednotná. Jsou zde přítomny různé podtypy, které se liší jedním nebo více polypeptidy (tedy i poskytovanými vazebnými místy) a svým umístěním na neuronu nebo v určité oblasti mozku (Olsen, Tobin, 1990). Tyto variace GABA-A receptoru ovlivňují i farmakologickou regulační aktivitu u jednotlivých podtypů, což otevírá možnosti specifické inhibice (Lazzaro et al., 2006). Vysokou afinitu vykazují GABA-A receptory vůči benzodiazepinům, barbiturátům a některým steroidům a anestetikům (Marik, Varon, 2004). Neurosteroidy (např. allopregnanolon) ze svého odlišného vazebného místa zvyšují délku i frekvenci otevření chloridového kanálu a ve vysokých koncentracích ho přímo aktivují (Martin, Dunn, 2002). Modulační role agonistů je na GABA-A receptorech velice důležitá, protože snižují desensitizaci vůči GABA (Martin, Dunn, 2002).



**Obrázek 3** Struktura GABA-A receptoru (Unwin, 2005). Na horním obrázku je znázorněn svislý průřez postsynaptickou membránou s vazebnými ligandy. Na dolním obrázku pohled shora na GABA-A receptor s chloridovým kanálem uprostřed a vyznačenými vazebnými místy pro kyselinu gama-amino-máselnou (GABA) a benzodiazepiny (BZ) na rozhraní podjednotek.

## 4 POSTNATÁLNÍ MOTORICKÝ VÝVOJ LABORATORNÍCH POTKANŮ V POROVNÁNÍ S ČLOVĚKEM

Mláďata laboratorních potkanů i lidí se rodí s nezralým CNS. Dle druhově specifických genetických vzorů automaticky dochází k postupnému vývoji motorických funkcí a reflexů (Vojta, 1995). U potkanů je rozvoj sensomotorické kůry nejrychlejší mezi 12. a 20. dnem života (Westerga, Gramsbergen, 1990), kde nultým dnem života se myslí den narození. První tři týdny jsou také zásadní pro myelinizaci nervových vláken, zrychluje se vedení periferními nervy, avšak oproti lidskému mozku se u potkanů už příliš neliší počet mozkových buněk a jejich organizace (Westerga, Gramsbergen, 1990). Stejně jako je tomu u člověka, dozrává mozeček potkana nejpozději, a to mezi 10. a 17. dnem (Westerga, Gramsbergen, 1990) oproti šesti letům u dítěte.

Motorický vývoj, který vede k dospělé kvadrupedální lokomoci, je charakterizován postupným antigravitačním zapojením svalů krku, trupu a extensorů končetin (Altman, Sudarshan, 1975). Stejně jako u člověka tento vývoj probíhá kranio-kaudálně a jako první předpoklad pro další vývoj lokomoce je posturální stabilizace trupu, která na počátku umožní antigravitační zvednutí hlavy a ramen nad podložku (Gramsbergen, 1998). Tato schopnost se vyvíjí v prvním týdnu života potkana (Altman, Sudarshan, 1975). Gramsbergen (1998) uvádí, že trvalejší aktivita dlouhých zádočných svalů je na EMG patrná od 15 dnů a je charakteristická ve vztahu ke krokovému cyklu. Do tohoto věku je aktivita zádočných svalů nepravidelná. Ve věku 21 dnů by úroveň posturální kontroly měla být srovnatelná s dospělým jedincem. Altman a Sudarshan (1975) zmiňují tři mechanismy periferní regulace posturální kontroly a to prostřednictvím vestibulárního systému, exterocepce a propiocepce. Vývojově nestarší funkcí díky dozrání prodloužené míchy je funkce vestibulární, která se testuje pomocí righting reflex testu a negative geotaxis testu. Naopak propioceptivní funkce úzce spojené s funkcí mozečku se vyvíjejí déle a jsou sledovatelné na

koordinaci zadních končetin v poskocích.

Přes specifitu druhu lze vyzorovat určité paralely ve vývoji potkana a člověka, kterých je pak možno s výhodou využít při laboratorním testování farmak. Motorické srovnávání je však v tomto směru velice obtížné, protože potkani se rodí s vyvinutějšími motorickými dovednostmi před zaostávajícími senzorickými funkcemi (Tabulka 2). U člověka je tento vztah přesně opačný. Porovnání se tedy řídí elektrofyziologickými pozorováními a navenek pak senzorickými schopnostmi a psychosociálním chováním. Pevnými mezníky ve srovnávání potkana a člověka jsou 12. a 35. den. Mládě potkana dosahuje úrovně zralosti mozku novorozence mezi 10-12 dnem života, kdy se u něj objevuje první korová odpověď na světelný záblesk (Velíšek et al., 1992). Puberta u potkana začíná v 35. dnu oproti 11 rokům u dívek, resp. 12 rokům u chlapců (Krásničanová, Lesný, 2000). Další srovnání je poněkud složitější. V následujících podkapitolách se budeme věnovat především třem stupním vývoje potkana, které se využívají pro testování motoriky a které jsme využili i my při testování vedlejších účinků ganaxolonu.

#### **4.1 Dvanáctidenní mláďata laboratorního potkana**

Jak již bylo řečeno, tento věk zralosti mozku odpovídá lidskému novorozenci. Ve 12 dnech je potkan již velmi čilý, ačkoliv ještě nevidí – má zavřené oči - a nereaguje na běžné sluchové podněty (Bolles, Woods, 1964). Již krátce po narození se mláďata dokáží pohybovat po vzoru tulenění ze 7,5 měsíčního lidského modelu, kdy táhnou zadních končetiny volně za tělem. Ve třech dnech se přesouvá opora i na zadní končetiny, ale tělo se stále táhne po podložce, což v určitém stupni přetrvává až do poloviny 2. týdne (Westerga, Gramsbergen, 1990). Tento typ lokomoce by odpovídal lidskému lezení, tedy 9 měsícům života člověka (Wood et al., 2003). Nicméně od 11 dnů u potkanů pozorujeme stabilní stoj a vývoj dospělé kvadrupedální chůze, kterou předvádí i 12-denní potkan, u kterého je chůze převažujícím způsobem lokomoce (Altman, Sudarshan, 1975; Bolles, Woods, 1964). Z hlediska motorické ontogeneze odpovídá tato fáze vývoje zhruba 13



měsícům věku dítěte (Wood et al., 2003). V tomto věku se potkan umí přetáčet ze supinační polohy, umí poposkočit, dokáže zvednout jednu přední končetinu bez ztráty rovnováhy a začíná si prohledávat klec.

V reakci na přetočení na záda (righting reflex test) už briskně zareagují supinací těla, ale zatím bez koordinace zadních končetin (Altman, Sudarshan, 1975). Při negative geotaxis testu jsou potkani schopní otočit se o 180° od 5. dne (Altman, Sudarshan, 1975).

#### **4.2 Osmnáctidenní mláďata laboratorního potkana**

V tomto věku jsou potkani velice aktivní a rychle střídají různé činnosti (Bolles, Woods, 1964). Potkani vidí, využívají kvadrupedální chůzi a díky tomu se rychle rozvíjí jejich poznávací schopnosti. Pro období 14-28 dnů s maximem kolem 21 dnů je typická živá sociální interakce mezi potkany hrou, kdy si potkani začínají vytvářet svou sociální pozici, učí se komunikovat a reagovat s okolím (Wood et al., 2003). Toto období odpovídá předškolnímu věku dítěte 4-6 let, kdy je pro dítě typické rychlé střídání různých forem pohybu, vysoká dynamika motorického chování především hrou. Zlepšuje se pohybová koordinace a zručnost, což se projevuje na schopnosti provádět aktivity jako je jízda na kole, házení s míčem, kreslení. Dítě tohoto věku se socializuje, je velice zvědavé a získává vlastní identitu a sebevědomí (Vágnerová, 2005).

#### **4.3 Dvacetipětidenní mláďata laboratorního potkana**

Ve 25. dnu života potkana stále přetrvává velmi aktivní a až „zběsilé“ chování, ve kterém převažuje boj se svým sourozenci. Od 20. dne je téměř nemožné potkana položit na záda, protože se zvládně otočit už ve vzduchu (Altman, Sudarshan, 1975). 25-denní potkani by se rovněž měli ve 100% procentech případů udržet při pověšení na hrazdu a zároveň by se u většiny měla objevit schopnost úchopu i zadními končetinami. Při testování negative geotaxis testu se potkan neotočí o 180°, protože většinou rovnou vyleze ven z testovacího zařízení, proto se u nich tento test

nevyšetřuje. Tento věk odpovídá mladšímu školnímu věku dítěte, respektive období mezi zhruba 6. a 12. rokem života (Alaverdashvili et al., 2005). Děti tohoto stáří vykazují vysokou potřebu pohybu nadále zprostředkovaného především hrou. Vyvíjí se u nich časoprostorová koordinace, rozvoj rovnovážných funkcí a zautomatizovaných pohybů. Toto období je důležité z hlediska utváření sebehodnocení, rozvoje sebepojetí a sebeovládání a tím i schopnosti řešit úkoly v kolektivu.

Věk (dny)	Motorické schopnosti	Senzorické schopnosti	Behaviorální schopnosti
1	vleče DKK za sebou		
4	zvednutí hlavy, ramen nad podložku počátky posazování plazení se		
6	při lezení udrží hlavu nad podložkou lezení přes překážky		
7			počátek komunikace UZ
10	otočení ze supinační polohy počátky chůze		
11	stabilní stoj		
12	poskočení prohledávání klece zvednutí jedné přední končetiny		děle se myje
13	běh	počátek reakce na sluchový podnět	olizuje si tělo
14	chůze převládá v lokomoci	částečné otevření očí	počátek boje mezi mláďaty
15	stoj na 3 opěrných bodech pohyb hlavou i během chůze		drbe se, jí pevnou stravu
16	postavení se ke zdi sed bez opory předních KK rychlý běh		
17	vsedě práce s předními KK		efektivně se napije
18	vzpřímení krční páteře lezení po stěnách klece krátké postavení na zadní KK	úplné otevření očí	hyperaktivita mláďata se perou
19		zaznamenání pozorovatele	
21	konsistentní úchop při zavěšení na lano		konec komunikace UZ odstavení od matky
22	lezení po stropě klece		
23		freezing jako reakce na hluk	častěji se myjí, češou se
24	lezení po látce		
25			kradou si potravu

**Tabulka 2** Souhrnný pohled na vývoj laboratorního potkana během prvních 25 dnů postnatálního života (Altman, Sudarshan, 1975; Bolles, Woods, 1964; Gramsbergen, 1998). (Pozn. Některé časové údaje jsou pouze orientační, protože se u různých autorů mírně liší).

## 5 CÍLE A HYPOTÉZY

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vliv ganaxolonu na motoriku mláďat laboratorních potkanů pomocí motorických testů vycházejících z dosaženého stupně jejich vývoje. S kontrolní skupinou byli porovnáváni potkani s dvěma různými dávkami ganaxolonu. Využili jsme tří rozdílných věkových kategorií pro zjištění případných rozdílů reakcí nejen mezi skupinami s odlišnou dávkou GNX, ale i pro zjištění věkové determinace.

### Hypotéza 1

$H_0$  Motorika potkanů se po aplikaci látky signifikatně nemění.

$H_A$  Motorika potkanů se po aplikaci látky změní nejméně v jednom z provedených testů.

### Hypotéza 2

$H_0$  Není rozdíl mezi vedlejšími účinky u jednotlivých věkových kategoriích.

$H_A$  Vedlejší účinky jsou u různých věkových kategorií odlišné.

### Hypotéza 3

$H_0$  U mladších jedinců nejsou vedlejší účinky patrnější.

$H_A$  U mladších jedinců jsou vedlejší účinky výraznější než u starších potkanů.

## 6 METODIKA

Experiment byl prováděn v rámci řešení grantu GAČR 203/06/1605 Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky (FGÚ AV ČR). Byl schválen Odbornou komisí FGÚ AV ČR, že je v souladu se zákonem ČR o ochraně zvířat a podle standardů humánní péče a využívání laboratorních zvířat. Testování probíhalo v zatemněné místnosti s umělým osvětlením, klimatizací udržující stálou teplotu 23°C a s odvětráváním. Motorické testy prováděl, sledoval a vyhodnocoval stejný člověk vždy v odpoledních hodinách mezi 13. a 17. hodinou.

Spolu se statisticky využitelnými číselnými výsledky bylo prováděno subjektivní hodnocení potkanů ve smyslu zjištění hypotonie, změn rovnovážných funkcí a míry aktivity během testů. Ataxie, dyskoordinace a pasivita byla vždy posuzována při opakovaném měření. Výsledkem bylo hodnocení změny ve smyslu ano (objevila se změna v daném parametru) nebo ne (neobjevila se změna v daném parametru). Pozitivní hodnocení bylo uvažováno pouze v případech, v kterých byla daná pohybová změna převažující v celém testu a byla-li výrazně rozdílná mezi měřením před a po podání GNX.

### 6.1 Výběr zvířat

K pokusu byli využiti samečci bílých laboratorních potkanů druhu Wistar. Chování byli v prostředí o teplotě  $22\pm 1^\circ\text{C}$ , o  $55\pm 5\%$  vlhkosti a s pravidelným 12 hodinovým osvětlením (6:00 – 18:00). Potkani měli permanentní přístup k potravě a vodě, vyjma v průběhu testu.

Potkani byli po narození rozděleni do skupin po 10 samečcích s jednou matkou. Testováno bylo celkem 90 potkanů – třicet 12-denních, třicet 18-denních a třicet 25-denních. Věkové skupiny byly rozděleny do tří dalších podskupin – kontrolní skupina, skupina s dávkou ganaxolonu 20 mg/kg a skupina s dávkou 40 mg/kg. Tyto podskupiny byly zahrnuty v každém testovaném vrhu potkanů. Všichni potkani byli k pokusu použiti pouze jednou.

## **6.2 Testy motorických dovedností**

Pro pokus byly vybrány 4 motorické testy podle Altmana a Sudarshana (1975) a Mikulecké a Mareše (2002) vypovídající o dozrávání CNS. Testy byly prováděny vždy ve stejném pořadí. Testování probíhalo u každého potkana dvakrát, tzn. před aplikací zkoumané látky a 30 minut po aplikaci. Přidáno bylo navíc sledování pohybu potkana ve vyhrazeném prostoru – open field test – na závěr druhého testování. Vzhledem ke schopnostem vázaným na věk potkana nebyl u 12-denních potkanů testován open field test a u 25-denních potkanů negative geotaxis test.

### **6.2.1 Surface righting test**

Potkan byl přetočen zády na podložku do supinační polohy. Sledovali jsme rychlost a koordinaci přetočení zpět na břicho. Koordinované přetočení do pronační polohy do 1 sekundy bylo hodnoceno číslem 1 jako úspěšné splnění testu. Numericky vyšší hodnoty získali potkani vykazující v průběhu testu delší latenci.

### **6.2.2 Negative geotaxis test**

Potkan byl umístěn hlavou dolů na šikmou plochu s hrubým povrchem se sklonem 30°. Byl měřen čas, za který se potkan otočí o 180° hlavou vzhůru.

### **6.2.3 Wire mesh ascending test**

Pro test byla využita plošina mřížovité struktury s 10mm otvory, dlouhá 45 cm a široká 15 cm. Umístili jsme ji šikmo v úhlu 70° spodním koncem k okraji stolu, horním koncem k vodorovné rampě. Mříž byla rozdělena do 4 pásem od 1. pásma nejnižšího po 4. pásmo nejvyšší od podložky. Potkan byl položen všemi končetinami na začátek mříže v prvním pásmu. Během 60 sekundového časového limitu se měřilo, do jakého pásma byl potkan schopen dolézt, případně jestli vylezl na rampu (ohodnoceno stupněm 5), podařilo-li se mu vylézt z mříže na stůl a nebo

jestli spadnul. V posledních dvou eventualitách test skončil předčasně a nebyl vyhodnocen.

#### **6.2.4 Bar holding test**

Potkan byl předními končetinami zavěšen na dřevěnou 25 cm dlouhou hrazdu – tyč – o průměru 1 cm. Potkan byl po zavěšení jemně stažen směrem k zemi za zadní končetiny, aby došlo k napnutí předních končetin a svalů kolem ramen a tím k aktivaci úchopového reflexu (Alaverdashvili, Kubová, Mareš, 2005). Hrazda byla ve vodorovné poloze umístěna ve výšce 25 cm nad podložkou. Test trval 120 sekund. Měřilo se jak dlouho potkan vydrží viset na hrazdě a jestli byl schopný přitáhnout zadní končetiny na tyč.

#### **6.2.5 Open field test**

Potkan byl umístěn do černé nádoby čtvercového půdorysu 50x50 cm s neprůsvitnými stěnami vysokými 30 cm a s odkrytým stropem. Potkan byl umístěn doprostřed prostoru a byl pomocí kamery (Panasonic Wv BP330) zavěšené 1 metr nad středem sledovaného prostoru snímán po dobu 5 minut. Nahraná sekvence byla následně zpracována pomocí programu EthoVision XT (© Noldus Information Technology). Snímaná plocha byla rozdělena do šestnácti stejných čtverců mezi kterými byly označeny 4 centrální čtverce a 12 čtverců obvodových, z kterých byly zvlášť označeny ještě 4 rohové čtverce. Měřili jsme čas, za který potkan opustil centrální prostor, do kterého byl na začátku pokusu umístěn. Software pak vyhodnotil průměrnou rychlost, kterou se potkan pohyboval, a vzdálenost, kterou ušel. Na základě čtvercového rozdělení měřeného pole jsme získali informace o času stráveném v jednotlivých vymezených prostorech, především na periferii a v rozích. Vyšetřovací plocha byla po každém měření očištěna vlhkým kusem látky, aby se omezilo ovlivnění testu pachovými stopami.

### **6.3 Aplikovaná látka**

Sledovanou látkou byl ganaxolon (Sigma, St. Louis, Missouri) aplikovaný jednorázově injekčně intraperitoneálně v dávce 20 mg/kg pro první skupinu potkanů, 40 mg/kg pro druhou skupinu. Kontrolní skupina dostávala 8 ml/kg fyziologického roztoku. Suspenzní směs GNX byla namíchána v koncentraci 5mg/ml ve složení GNX, kapka Tween 80 (polyoxyethylensorbitanmonooleát neboli polysorbát 80) a fyziologický roztok.

### **6.4 Statistické zpracování dat**

Naměřená data všech výše uvedených testů byla zpracována statistickým softwarem SigmaStat (SigmaStat® SPSS). Všechna data prošla úpravou deskriptivní statistikou určenou pro statistický soubor s jedním argumentem. Program vždy testoval normalitu distribuce hodnot. Pro zhodnocení výsledků byla využita jednosměrná analýza rozptylu – one way ANOVA, pomocí které jsme zjišťovali odlišnost průměrů naměřených hodnot jednoho testu u tří různých skupin – kontrolní skupina, skupina s dávkou 20 mg/kg a skupina s dávkou 40 mg/kg daného věku. Párový t-test byl využit pro porovnání změn před a po aplikaci látky u jedné podskupiny. Četnost výskytu jednotlivých fenoménů byla testována Fisherovým exaktním testem. Hladina statistické významnosti byla u všech testů určena na 5%, respektive  $P < 0,05$ .

## 7 VÝSLEDKY

Z technických důvodů byli z 90 potkanů dva vyřazeni před kontrolním měřením a vyhodnoceno proto bylo pouze 88 potkanů. Chyběli tedy 2 potkani v kontrolní skupině u 18-denních potkanů. V žádném testu neprokázali potkani v rámci subjektivního hodnocení výrazné zlepšení koordinace. U potkanů s dávkou 40 mg/kg byla bez ohledu na věk patrná sedace (klid, spavost) a palpačně zjištěná celková myorelaxace. Další aspekty subjektivního hodnocení jsou zaznamenány zvláště u jednotlivých testů.

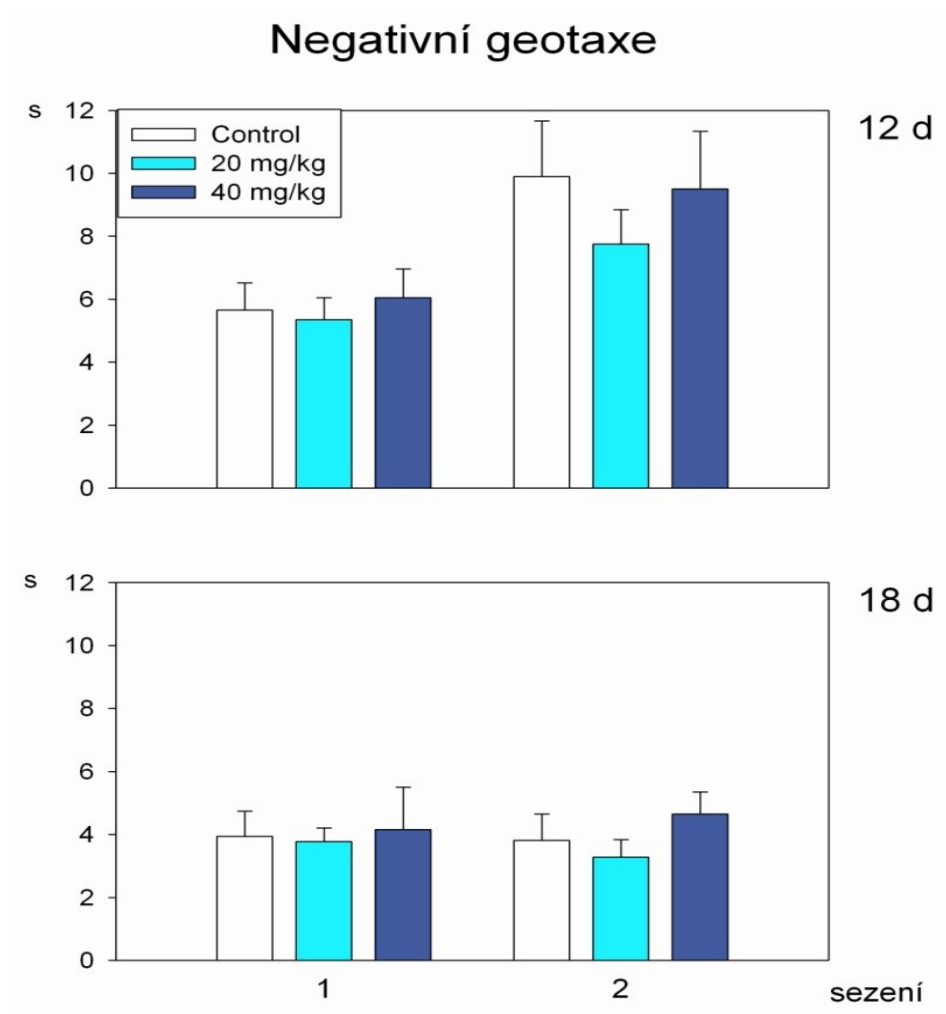
### 7.1 Surface righting test

18-denní ani 25-denní potkani nevykazovali v žádné podskupině změnu v provedení reflexu před a po aplikaci ganaxolonu. U 12-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg se objevila výrazná latence a zpomalení při otáčení na břicho. Výsledek byl signifikantní,  $P=0.008$ . Rychlost provedení nepřesáhla 1,5 sekundy. Dyskoordinaci horních a dolních končetin při subjektivním posouzení vykazovalo 5 z 10 potkanů s dávkou 40 mg/kg v této skupině.

### 7.2 Negative geotaxis test

Signifikantní změny v délce provedení testu nevykázala žádná z poskupin 18 a 25 denních potkanů. U jednoho 18 denního potkana s dávkou 20 mg/kg a jednoho 12 denního potkana s dávkou 40 mg/kg nedošlo v opakovaném měření k otočení o více než  $90^\circ$  a test proto nebyl vyhodnocen. U 12 denních potkanů došlo u všech podskupin k prodloužení doby trvání testu (Obrázek 4). U kontrolní skupiny byl tento výsledek signifikantní,  $P=0.044$ , u ostatních podskupin tato změna nedosáhla hladiny statistické významnosti - pro 20 mg/kg ganaxolonu bylo  $P=0.081$  a pro 40 mg/kg ganaxolonu vyšla hladina významnosti  $P=0.108$ .





**Obrázek 4** Sloupcový diagram ukazující výsledky negativní geotaxis testu u 12-denních potkanů (horní graf) a u 18-denních potkanů (dolní graf). Na ose X jsou znázorněny všechny podskupiny před injekcí (1) a po injekci (2). Osa Y označuje čas v sekundách (s), za který byl potkan schopen test provést.

### 7.3 Wire mesh ascending test

U žádné podskupiny nebyla shledána statisticky významná změna v úrovni, kam byli potkani schopni na žebříku dolézt (Obrázek 5). Pády se vyskytovaly pouze u 12-denních potkanů (Tabulka 3) a jejich četnost se neměnila před a po aplikaci látky, pouze u dávky 40 mg/kg došlo k mírnému snížení počtu pádů. Schopnost vylézt ven ze žebříku byla patrná pouze u dvou starších věkových skupin (Tabulka 4). U 18-denních potkanů se po aplikaci GNX 20 mg/kg tato schopnost

mírně snížila. V rámci subjektivního hodnocení byla posuzována nápadná změna v aktivitě potkana, která se nejvýrazněji objevila u 25-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg (Tabulka 5).

PÁD u WM	kontroly		20 mg/kg		40 mg/kg	
	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.
12 denní	2/10	2/10	4/10	4/10	3/10	1/10
18 denní	0/8	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
25 denní	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

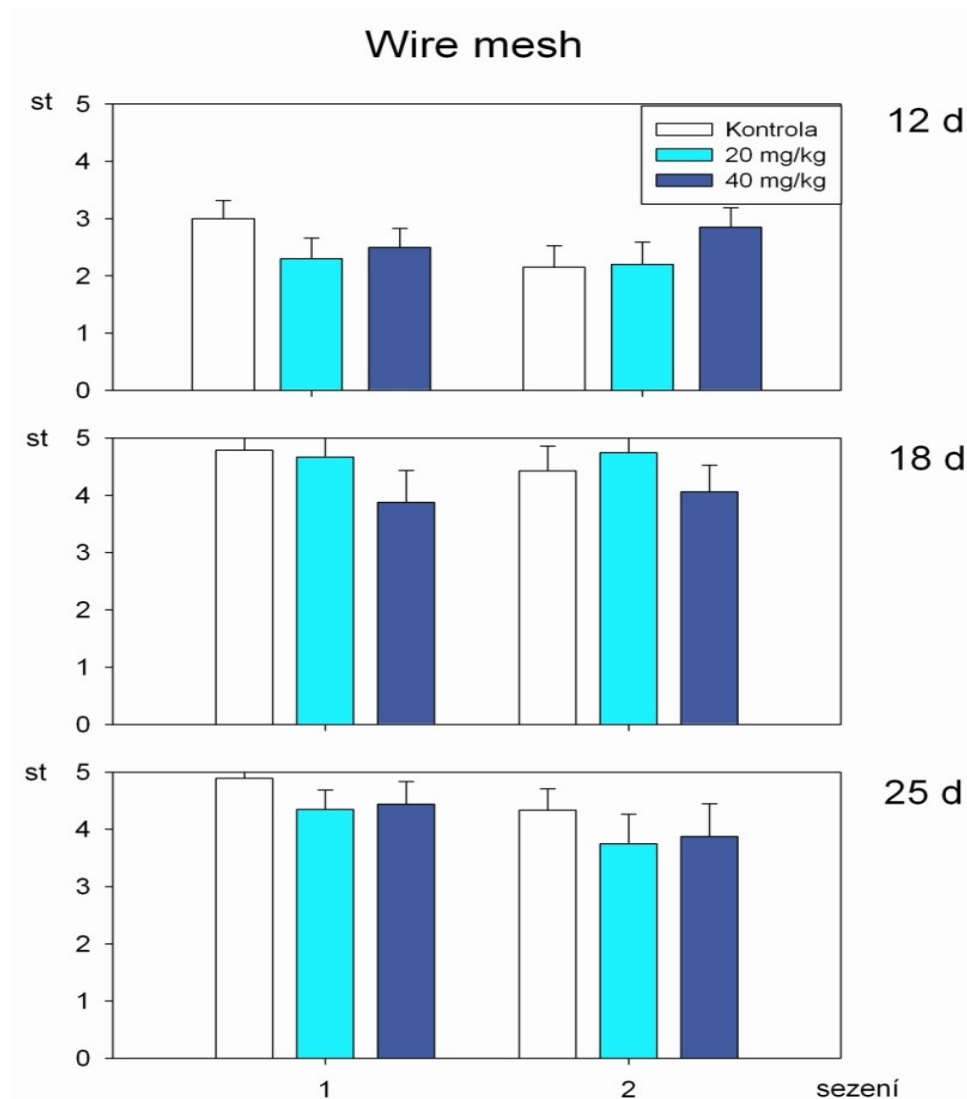
**Tabulka 3** Výskyt pádů u Wire mesh testu. Zlomek vyjadřuje v čitateli počet pádů ve skupině, ve jmenovateli počet jedinců ve skupině.

VYLEZNÍ VEN ZE ŽEBŘÍKU u WM	kontroly		20 mg/kg		40 mg/kg	
	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.
12 denní	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
18 denní	1/8	1/8	4/10	1/10	2/10	0/10
25 denní	1/10	0/10	0/10	0/10	2/10	1/10

**Tabulka 4** Výskyt jedinců, kterým se u Wire mesh testu (WM) podařilo vylézt ven z testovacího žebříku. Zlomek vyjadřuje poměr mezi potkany, kteří vylezli z žebříku, a celkovým počtem jedinců ve skupině.

VÝRAZNÁ PASIVITA u WM	kontroly		20 mg/kg		40 mg/kg	
	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.
12 denní	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
18 denní	0/8	0/8	0/10	1/10	0/10	2/10
25 denní	0/10	0/10	0/10	2/10	0/10	3/10

**Tabulka 5** Četnost výskytu jedinců, kteří během Wire mesh testu (WM) vykazovali v porovnání s druhým měřením výraznou pasivitu. Zlomek vyjadřuje poměr mezi pasivními potkany a celkovým počtem potkanů ve skupině.



**Obrázek 5** Sloupcový diagram ukazující výsledky wire mesh testu u 12-denních potkanů (horní graf), u 18-denních potkanů (střední graf) a u 25-denních potkanů (dolní graf). Na ose X jsou znázorněny všechny podskupiny před injekcí (1) a po injekci (2). Osa Y označuje stupeň (st) na žebříku (1 - 4), do kterého byl potkan schopen vylézt. Stupně 5 potkan dosáhl tehdy, vylezl-li až na plošinu nad žebříkem.

#### 7.4 Bar holding test

V žádné skupině nebyl prokázán signifikantní rozdíl v době visu na hrazdě. Rozdíly však vznikaly ve schopnosti vylézt na hrazdu (Tabulka 6). U 18-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg

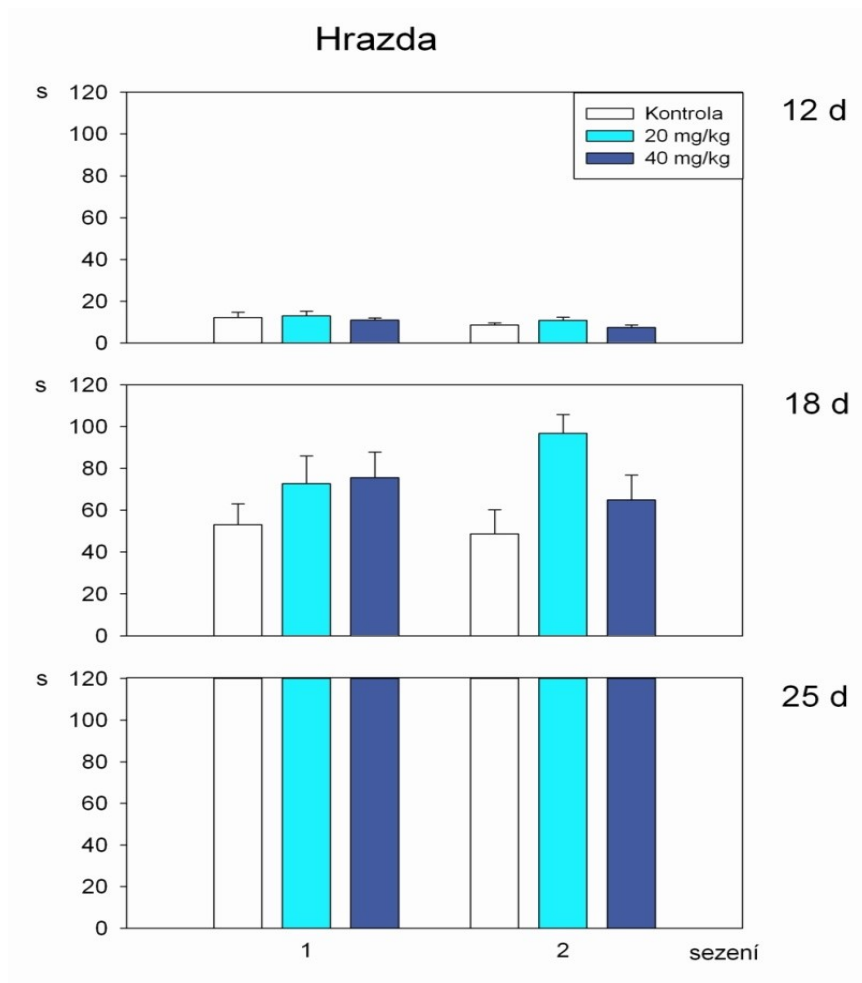
byl zpozorován výrazný, ne však signifikantní úbytek této schopnosti po aplikaci ganaxolonu. V rámci subjektivního hodnocení byla sledována ataxie zadních končetin při snaze si je přitáhnout k hrazdě a zachytit se jimi o ní. U 18-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg byl sledován nejvýraznější rozdíl v motorickém chování dolních končetin před a po injekci (Tabulka 7). Tento rozdíl však opět nebyl signifikantní.

VYLEZENÍ NA HRAZDU u BH	kontroly		20 mg/kg		40 mg/kg	
	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.
12 denní	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
18 denní	0/8	0/8	5/10	4/10	6/10	1/10
25 denní	10/10	10/10	7/10	7/10	4/10	7/10

**Tabulka 6** Četnost výskytu jedinců, kteří během Bar holding testu (BH) vylezli na hrazdu. Zlomek vyjadřuje v čitateli počet potkanů ve skupině, kterým se alespoň jedenkrát během testu podařilo vylézt na hrazdu, ve jmenovateli počet jedinců ve skupině.

ATAXIE ZKK u BH	kontroly		20 mg/kg		40 mg/kg	
	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.	před inj.	po inj.
12 denní	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
18 denní	0/8	0/8	0/10	1/10	0/10	4/10
25 denní	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	2/10

**Tabulka 7** Četnost výskytu jedinců, kteří během Bar holding testu (BH) vykazovali v porovnání s druhým měřením výraznou ataxii zadních končetin (ZKK) při snaze zachytit se jimi o hrazdu. Zlomek vyjadřuje v čitateli počet jedinců s vyhodnocenou ataxií ve skupině, ve jmenovateli počet jedinců ve skupině.

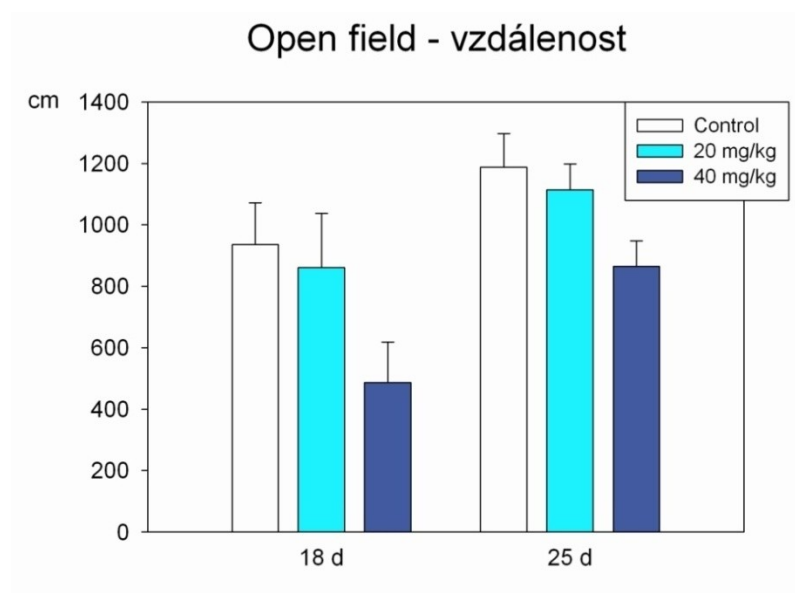


**Obrázek 6** Sloupcový diagram ukazující výsledky bar holding testu u 12-denních potkanů (horní graf), u 18-denních potkanů (střední graf) a u 25-denních potkanů (dolní graf). Na ose X jsou znázorněny všechny podskupiny před injekcí (1) a po injekci (2). Osa Y označuje čas v sekundách (s), po který byl potkan schopný se udržet na hrazdě v rámci limitu 120 s.

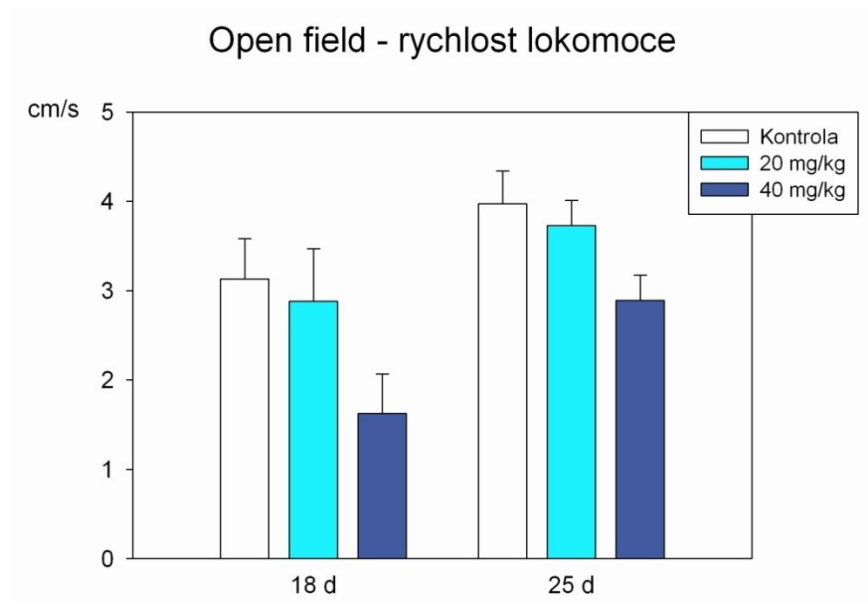
## 7.5 Open field test

U 18-denních potkanů nebyl shledán signifikantní rozdíl v žádném z měřených paramterů. Avšak z technických důvodů byl počet měřených potkanů výrazně snížen na 4 potkany v kontrolní skupině, 7 potkanů s dávkou 20 mg/kg a 7 potkanů s dávkou 40 mg/kg. U 25-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg byla velikost uběhnuté vzdálenosti (Obrázek 7) a průměrná rychlost (Obrázek 8) snížena. Změna zůstala těsně nad hranicí statistické významnosti, u obou  $P=0.052$ . Ostatní

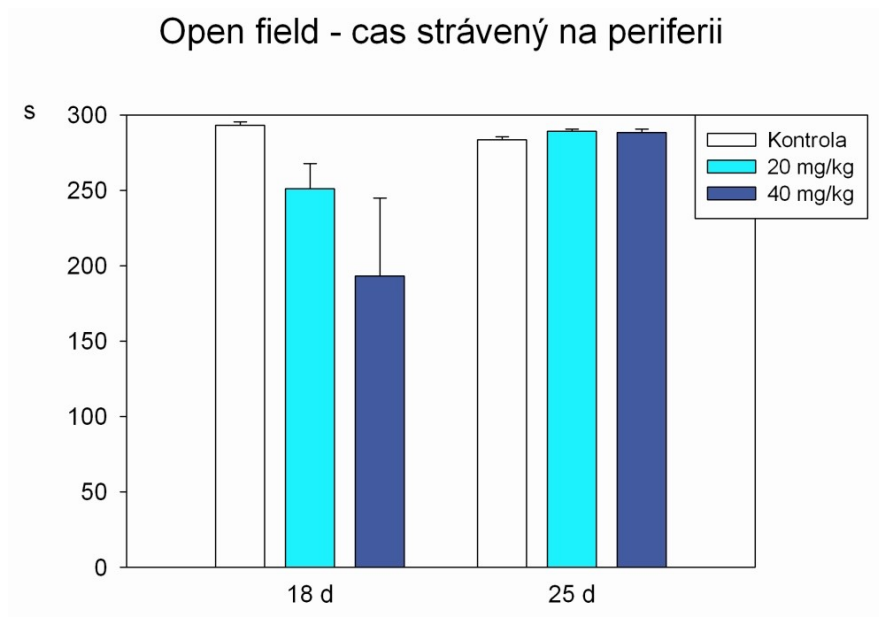
parametru testu se signifikantně nelišily (Obrázek 9 a 10).



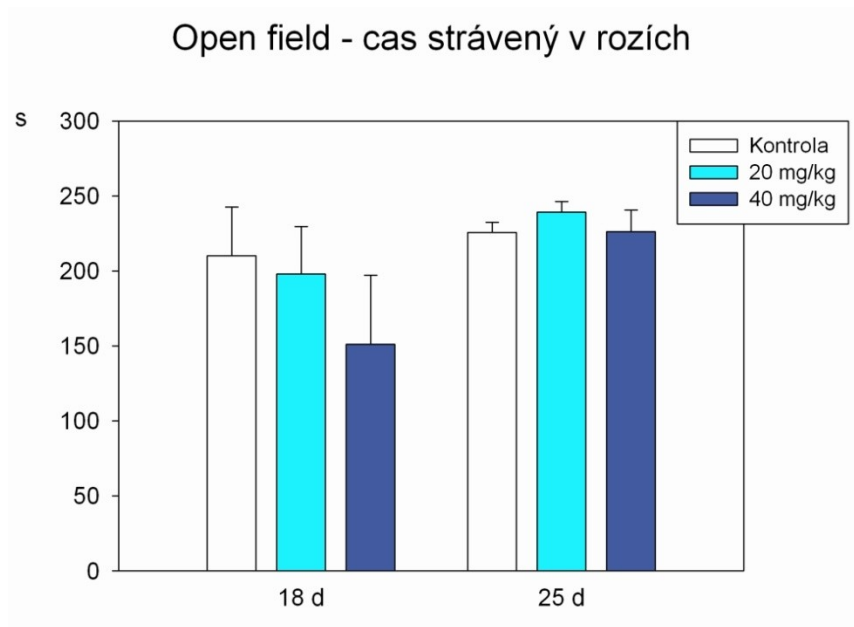
**Obrázek 7** Sloupcový diagram ukazující výsledky měření uběhnuté vzdálenosti v rámci open field testu. Na ose X jsou znázorněny výsledky u 18-denních potkanů (18 d) a u 25-denních potkanů (25 d). Osa Y označuje naměřenou vzdálenost v centimetrech (cm) (pozn. měření probíhalo pouze po aplikaci injekce).



**Obrázek 8** Sloupcový diagram ukazující výsledky měření průměrné rychlosti v rámci open field testu. Na ose X jsou znázorněny výsledky u 18-denních potkanů (18 d) a u 25-denních potkanů (25 d). Osa Y označuje naměřenou rychlost v centimetrech za sekundu (cm/s).



**Obrázek 9** Sloupcový diagram ukazující výsledky měření celkového času stráveného na periferii v rámci open field testu. Na ose X jsou znázorněny výsledky u 18-denních potkanů (18 d) a u 25-denních potkanů (25 d). Osa Y označuje naměřený čas v sekundách (s).



**Obrázek 10** Sloupcový diagram ukazující výsledky měření celkového času stráveného v rozích v rámci open field testu. Na ose X jsou znázorněny výsledky u 18-denních potkanů (18d) a u 25-denních potkanů (25 d). Osa Y označuje naměřený čas v sekundách (s).

## **7.6 Testování hypotéz**

### **Hypotéza 1**

$H_0$  byla odmítnuta vzhledem k signifikantním změnám v motorickém chování při dávce 40 mg/kg.

$H_A$  se potvrdila.

### **Hypotéza 2**

$H_0$  byla odmítnuta vzhledem k rozdílným projevům mezi 12-denními a 18-denními potkany oproti 25-denním potkanům.

$H_A$  se potvrdila.

### **Hypotéza 3**

$H_0$  předpokládající výraznější vedlejší účinky u mladších jedinců se nepodařilo odmítnout.

$H_A$  se nepodařilo potvrdit.



## 8 DISKUZE

Výzkumů testujících účinky ganaxolonu již byla zrealizována celá řada. Antikonvulzivní efekt ganaxolonu byl prokázán na epileptických záchvatech u potkanů i na různých typech epilepsie u lidí (Carter et al., 1997; Gasior et al., 1997, Kaminski et al., 2004; Kerrigan et al., 2000; Laxer et al., 2000; Lechtenberg et al., 1996; Liptáková et al., 2000; Pieribone et al., 2007; Redy, Rogawski, 2000b). Prozkoumána je i otázka vedlejších účinků, které zahrnují závrať, poruchy rovnováhy a koordinace, únavu, spavost, sedaci (Lechtenberg et al., 2000; Monaghan et al., 1996), ataxii (Carter et al., 1997) a anxiolytické působení (Beekman et al., 1998). U dětských pacientů byla mezi vedlejšími účinky ganaxolonu zmiňována spavost, poruchy spánku, nervozita, zácpa nebo průjem a změna typu záchvatu (Lechtenberg et al., 1996; Pieribone et al., 2007).

Ve výčtu studií zkoumajících ganaxolon chybí testy na mláďatech laboratorních potkanů. Jedinou výjimkou je studie Liptákové et al. (2000), která testovala vliv ganaxolonu na jediný typ záchvatů - primárně generalizované záchvaty vyvolané flurothylem u potkanů ve věku 9, 15, 30 a 60 dnů. Posuzován byl zároveň vliv ganaxolonu na motorické chování jedinců na podkladě změn schopnosti využívat končetiny při lokomoci a při otáčení.

Pro naši studii jsme využili tří věkových skupin potkanů - 12, 18 a 25 dnů odpovídajícím různým etapám prepubertálního vývoje. Liptáková et al. (2000) zjistila motorické změny trvající nejdéle do 10 minut po aplikaci ganaxolonu. My jsme kontrolní měření prováděli 30 minut po aplikaci ganaxolonu z důvodu vyšší použité dávky. Carter et al. (1997) uvádí nejvyšší antikonvulzivní efekt ganaxolonu proti záchvatům vyvolaným maximálním elektrošokem, tedy z testovaných záchvatů nejvíce rezistentním vůči léčbě steroidními antiepileptiky, právě po uplynutí 30 minut. Potkanům jsme aplikovali dávku ganaxolonu 20 mg/kg nebo 40 mg/kg. Velikost dávek byla vybrána na základě antikonvulzivní efektivity proti záchvatům vyvolaným pentylentetrazolem u mláďat laboratorních potkanů, která je 40 mg/kg (Mareš et al., nabídnuto do

tisku). U dospělého jedince s dávkou 40 mg/kg můžeme očekávat zvýšené riziko motorických změn včetně ataxie (Carter et al., 1997), avšak bez hepatotoxicity a nefrotoxicity (Nohria, Giller, 2007). Jestli a v jaké míře budou vedlejší účinky na motorice přítomny i u mláďat potkanů s dávkami 20 mg/kg a 40 mg/kg bylo jednou z otázek, kterou jsme si kladli my.

Ganaxolon pozitivně moduluje GABA-A inhibiční receptor vazbou na specifické vazebné místo pro neurosteroidy (resp. neuroaktivní steroidy). Tento vliv na CNS může mít své důsledky ve změně motorického chování ve formě nerovnováhy, ataxie a sedace (Carter et al., 1997; Monaghan et al., 1997). Avšak děti zkoušející ganaxolon v rámci klinických studií vykazovaly vedlejší účinky jako je spavost, poruchy spánku, nervozita, zácpa nebo průjem a změna typu záchvatu (Lechtenberg et al., 1996; Pieribone et al., 2007). Motorický deficit se tedy u nich neobjevil, nicméně testované dávky dosahovaly velikosti maximálně 36 mg/kg (Kerrigan et al., 2000; Pieribone et al., 2007).

Ataktické změny jsme podle našich výsledků vysledovali pouze u potkanů s dávkou 40 mg/kg. U 12-denních potkanů se tendence k ataxii projevila jako dyskoordinace, ale i latence při provádění righting reflexu, která se jako jediná z testů změnila signifikantně. U 18-denních potkanů se tendence k ataxii projevila nepřesností při umístění zadních končetin na hrazdu při bar holding testu, která se v menší míře objevila i u 25-denních mláďat. Výsledky odpovídají závěrům Cartera et al. (1997), kteří ataxii na rotorod testu u dospělých potkanů vyvolali dávkou 33, 4 mg/kg, a Liptákové et al. (2000), která vysledovala zpomalení righting reflexu u 9-denních a 15-denních potkanů již po dávkách 5 mg/kg a 10 mg/kg. Rozdílnost ve velikosti dávky ganaxolonu a reakci na ní u 12-denních potkanů a reakci na nižší dávky u Liptákové et al. (2000) může být dána jednak odlišným hodnocením righting reflexu, který vychází ze subjektivního posouzení, jednak dobou začátku měření, která byla v našem případě posunuta o 20 minut později.

U 25-denních potkanů se hlavní změny v motorickém chování po aplikaci 40 mg/kg vztahovaly k celkovému snížení aktivity, což odráží pasivita na wire mesh testu, ale i v open

fieldu. Je nutné podotknout, že tato pasivita se neprojevila sníženou výškou, do které byl potkan schopen na žebříku vylézt, ale pohybovou chudostí zaznamenanou pozorovatelem během měření. V open field testu byla tato tendence potvrzena výrazným snížením uběhnuté vzdálenosti a průměrné rychlosti. Naměřené výsledky sice těsně nedosáhly hladiny statistické významnosti, nicméně tendence potkanů k celkové sedaci je zřejmá. Lze předpokládat, že při aplikaci vyšších dávek, než 40 mg/kg, by již mohlo dojít k signifikantním změnám i v motorice testované v open fieldu. Výsledky korespondují s udávanými sedativními účinky ganaxolonu u dospělých potkanů (Carter et al., 1997) i dětí (Lechtenberg et al., 1996; Pieribone et al., 2007).

U 18-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg se nejvíce ze všech podskupin projevilo zhoršení schopnosti vylézt na hrazdu. Tato aktivita je závislá na schopnosti přitáhnout zadní končetiny k hrudníku a s pomocí souhry všech čtyř končetin se vyšvihnout na hrazdu (Altman, Sudarshan, 1975). Narušení této schopnosti může svědčit o poruše koordinace a částečně i svalové síly. Dovednost konstantě využívat zadní končetiny tímto způsobem je sice zmiňována až od 21 dnů věku potkana (Altman, Sudarshan, 1975), ale výrazná změna v jediné podskupině stejně starých potkanů svědčí o oslabení zadních končetin, které s velkou pravděpodobností nesouvisí s kolísavými schopnostmi potkana v tomto věku. Ačkoliv naše výsledky hovoří pouze o náznacích těchto změn, Liptáková et al. (2000) zmiňuje podobné účinky. U 9-denních a 15-denních potkanů konstatuje oslabení zadních končetin při lokomoci po aplikaci 5 mg/kg a 10 mg/kg ganaxolonu.

Liptáková et al. (2000) zjistila výraznější efekt ganaxolonu u mladších věkových skupin vztahující se nejen na antikonvulzivní působení, ale i na motorické změny. Naším dalším cílem bylo tedy zjistit, zda míra vedlejších účinků bude věkově závislá. Z výsledků však vyplývá, že spíše než v míře vedlejších účinků se rozdíly projevily v typech motorických změn. Zatímco u 12-denních a 18-denních potkanů byla dominantní dyskoordinace a ataxie, u 25-denních potkanů do popředí nejvíce vystoupil celkový útlum v motorickém chování. Je však třeba brát v úvahu věkové rozdíly a s nimi spojenou úroveň senzomotorických reflexu. 12-denní potkani nemohli být

testování v open fieldu a i hodnocení jejich aktivity ve smyslu sedace je obtížné, jelikož v tomto věku ještě nejsou natolik aktivní jako potkani ve starších věkových skupinách. Určitá neobratnost se u těchto potkanů objevila i v dalších testech, nicméně nebylo v nich možné odlišit výrazné změny před a po aplikaci látky, jako tomu bylo u starších potkanů. U těch je naopak righting reflex, negativně ovlivněný u 12 denních-potkanů, natolik vyvinut, že výrazné změny v provedení testu nebyly vyzorovány. Bar holding test poukázal na ataxii zadních končetin u 18-denních potkanů. Tento jev byl dobře pozorovatelný u potkanů, kteří ještě nebyli schopni vylézt na hrazdu. Potkani, kteří již dovedli vylézt na hrazdu, pak totiž mohli po zbytek testu vydržet v nějaké statické poloze bez patrných známek ataxie. Proto i tato vazba ataxie u bar holding testu na 18-denní potkany může být mírně zavádějící. Nicméně v subjektivním hodnocení jsme se snažili sledovat i projevy dyskoordinace při chůzi po hrazdě a v tomto směru jsme takové potkany sice vysledovali, ale jejich nemotornost byla přítomna před i po aplikaci ganaxolonu a tudíž nebylo možné je hodnotit pozitivně pro přítomnost ataxie v souvislosti s ganaxolonem.

U některých potkanů v určitých sledovaných parametrech došlo ke zlepšení výsledku po aplikaci ganaxolonu. Bylo tomu tak u 12-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg, u kterých se po aplikaci mírně snížil počet pádů z wire meh testu, a u 25-denních potkanů s dávkou 40 mg/kg se zvýšil počet jedinců, kteří vylezli na hrazdu u bar holding testu. Je pravděpodobné, že za tato mírná zlepšení může opakovaná expozice testu.

## 9 ZÁVĚR

U 88 mlád'at laboratorních potkanů byly vyhodnoceny vedlejší účinky ganaxolonu na motoriku pomocí testů adekvátních pro jednotlivá vývojová stadia i subjektivního hodnocení. Ze všech testů se signifikantní změna vyskytla pouze u 12-denních potkanů s dávkou ganaxolonu 40 mg/kg, kteří vykazovali zpomalení righting reflexu svědčící o narušení koordinace při otáčení. U 18-denních a částečně i u 25-denních potkanů, u obou s dávkou ganaxolonu 40 mg/kg, byla shledána tendence k projevům ataxie a oslabení zadních končetin, které se projevilo při subjektivním hodnocení snížením schopnosti přitáhnout zadní končetiny k trupu u bar holding testu a vylézt na hrazdu, případně vylézt ze žebříku u wire mesh testu. Mírná tendence k pasivitě na wire mesh testu byla vysledována u 18-denních i u 25-denních potkanů po aplikaci 40 mg/kg, u 25-denních potkanů se navíc při stejné dávce ganaxolonu snížení uběhnuté vzdálenosti a průměrné rychlosti přiblížilo těsně k hranici statistické významnosti.

Z palpačního dojmu (náznak myorelaxace) u všech věkových kategorií potkanů s dávkou 40 mg/kg, ze zklidnění chování potkanů i z celkového dojmu a výsledků subjektivního hodnocení lze vyčíst určité tendence ve změně motoriky ve smyslu sedace a ataxie, nicméně z těchto závěrů nelze usuzovat, že by dávka 40 mg/kg, a rozhodně už ne 20 mg/kg, působila toxicky na motoriku mlád'at potkanů. Nelze ani potvrdit původní předpoklad, že u mladších potkanů budou vedlejší účinky výraznější nebo odlišné.

Z naší studie tedy vyplývá, že ganaxolon aplikovaný v množství 20 a 40 mg/kg výrazněji neovlivňuje motoriku mlád'at laboratorních potkanů.

## 10 SHRnutí

Cílem této diplomové práce bylo zjistit vedlejší účinek epalonu a potenciálního antiepileptika ganaxolonu na motoriku mláďat laboratorních potkanů. Na základě výsledků získaných na mláďatech potkana lze očekávat podobné reakce na ganaxolon i u dětí. Diplomová práce obsahuje kapitoly o ganaxalonu, o neuroinhibičním působení antiepileptik a o postnatálním vývoji laboratorního potkana do 25 dnů věku. Pro studii bylo využito 90 potkanů ve věku 12, 18 a 25 dnů, které korelují s věkem novorozence, předškoláka a dítěte mladšího školního věku. Ganaxolon byl aplikován intraperitoneálně v dávkách 20 mg/kg a 40 mg/kg a jeho účinky byly porovnávány s kontrolní skupinou. Motorické testování prováděné před aplikací a 30 minut po aplikaci obsahovalo tyto testy: righting test, bar holding test, wire mesh test, negative geotaxis test a open field test. Výběr testů byl volen s ohledem na vývojový věk potkana. Subjektivní hodnocení motoriky se zaměřovalo na posouzení výrazných změn v aktivitě, na známky ataxie a dyskoordinace. U žádného testu nebyly vedlejší účinky na motoriku signifikantně potvrzeny. Nicméně lze očekávat, že při vyšších dávkách ganaxolonu by se již ovlivnění motoriky projevilo výrazněji. Z výsledků vyplývá, že účinná antikonvulzivní dávka ganaxolonu nepůsobí výraznější vedlejší účinky na motoriku mláďat laboratorního potkana bez ohledu na věk.

## 11 SUMMARY

This diploma thesis aims to detecting side effect of a new potencional drug ganaxolon on the motoric performace of immature rats. On the basis of the results gained from the research made on immature rats, we can expect similar effects in the population of children. This diploma thesis consists of the chapters devoted to ganaxolon, to neuroinhibiting mechanisms of the antiepileptic drugs and finally to the postnatal development of locomotion of a laboratory rat up to the postnatal day 25. We have tested 90 immature rats of the age 12, 18 and 25 days. These ages correspond to the new-born, pre-school and early school life periods of children. Ganaxolon was applied intraperitoneally in doses 20 mg/kg and 40 mg/kg and its effect was compared with a control group. We have tested motor performance before and 30 minutes after the injection by a battery of tests which includes the righting test, the bar holding test, the wire mesh test, the negative geotaxis test and the open field test. Some of the tests were choosen in consideration of the age of the rats. We have also evaluated markable changes in the degree of activity, symptoms of ataxia or dyscoordination. Our results show that the effects of ganaxolon on motor performance are similar to those of solvent. Nevertheles there is expectation of the significant side effect on the higher doses of ganaxolon which should be studied. The results of our study indicate that the active anticonvulsive dose of ganaxolone does not cause any significant side-effects in the motorics of the young laboratory rats and these results are indifferent to the age of the rats studied.

## 12 REFERENČNÍ SEZNAM

- Alaverdashvili, M., Kubová, H, Mareš, P. Motor performance and behavior of immature rats are not compromised by a high dose of topiramate. *Epilepsy Behaviour*, 7 (2), 222-230, 2005.
- Altman, J., Sudarshan, K.: Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*, 23 (4), 896-920, 1975.
- Beekman, M., Ungard, J. T., Gasior, M., Carter, R. B., Dijkstra, D., Goldberg, S. R., Witkin, J. M. Reversal of behavioral effects of pentylenetetrazol by the neuroactive steroid ganaxolone. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 284 (3), 868-877, 1998.
- Bialer, M., Johannessen, S. I., Kupferberg, H. J., Levy, R. H., Perucca, E., Tomson, T.: Progress report on new antiepileptic drugs: A summary of the Eight Eilat Conference (EILAT VIII). *Epilepsy Research*, 73, 1-52, 2007.
- Bolles, R. C., Woods, P. J.: The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Animal Behaviour*, 12 (4), 427-441, 1964.
- Carter, R. B., Wood, P. L., Wieland, S., Hawkinson, J. E., Belelli, D., Lambert, J. J., White, H. S., Wolf, H. H., Mirsadeghi, S., Tahir, S. H., Bolger, M. B., Lan, N. C., Gee, K. V. Characterization of the Anticonvulsant Properties of Ganaxolone (CCD 1042; 3a-Hydroxy-3b-methyl-5a-pregnan-20-one), a Selective, High-Affinity, Steroid Modulator of the g-Aminobutyric AcidA Receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280 (3), 1284-1295, 1997.
- Craig, Ch. R.: Anticonvulsant activity of steroids: separability of anticonvulsant from hormonal effects. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 153 (2), 337-343, 1966.
- Dorda, M., Vlček, K., Chodounská, H., Vyklický, L. Neurosteroidy – mechanismus působení a možnosti užití v praxi. *Psychiatrie*, 5 (3), 5-9, 2001.
- Gasior, M., Carter, R. B., Goldberg, S. R., Witkin, J. M. Antikonvulsant and behavioral effect of



- neuroactive steroids alone and in conjunction with diazepam. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 282 (2), 543-553, 1997.
- Gramsbergen, A.: Posture and Locomotion in the Rat: Independent or Interdependent Development? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 22 (4), 547-553, 1998.
- Halász, P., Rásonyi, G. Neuroprotection and epilepsy. *Advances in experimental medicine and biology*, 541, 91-109, 2004.
- Jedlička, P., Keller, O. et al. *Speciální neurologie*. Praha: Galén, 2005.
- Jorgensen, E. M. GABA. *WormBook*, 31, 1-13, 2005. Retrieved 8. 3. 2009 from [http://www.wormbook.org/chapters/www\\_gaba/gaba.html](http://www.wormbook.org/chapters/www_gaba/gaba.html)
- Kaminski, R. M., Livingood, M. R., Rogawski, M. A. Allopregnanolone Analogs That Positively Modulate GABAA Receptors Protect against Partial Seizures Induced by 6-Hz Electrical Stimulation in Mice. *Epilepsia*, 45 (7), 864-867, 2004.
- Kerrigan, J. F., Shields, W. D., Nelson, T. Y., Bluestone, D. L., Dodson, W. E., Bourgeois, B. F. D., Pellock, J. M., Morton, L. D., Monaghan, E. P.: Ganaxolone for Treating Intractable Infantile Spasms: a Multicenter, Open-label, Add-on Trial. *Epilepsy Research*, 42, 133-139, 2000.
- Krásničáková, H, Lesný, P. *Kompendium pediatrické auxologie*. Praha: Galén, 2000.
- Landmark, C. J.: Targets for antiepileptic drugs in the synapse. *Medical Science Monitor*, 13 (1), RA1-7, 2007. Retrieved 9. 9. 2008 from [www.medscimonit.com](http://www.medscimonit.com).
- LaRoche, S. M., & Helmers, S. L.: The New Antiepileptic Drugs: Scientific Review. *Jama*, 291 (5), 605-614, 2004. Retrieved 9. 9. 2008 from [www.jama.com](http://www.jama.com).
- Laxer, K., Blum, D., Abou-Khalil, B. W., Morrell, M. J., Lee, D. A., Data, J. L., Monaghan, E. P., The Ganaxolone Presurgical Study Group: Assessment of Ganaxolone's Anticonvulsant Activity Using a Randomized, Double-Blind, Presurgical Trial Design. *Epilepsia*, 41 (9), 1187-1194, 2000.
- Lazzaro, V. D., Pilato, F., Dileone, M., Ranieri, F., Ricci, V., Profice, P., Bria, P., Tonali, P. A.,

- Ziemann, U. GABAA receptor subtype specific enhancement of inhibition motor cortex. *The Journal of Physiology*, 575 (3), 721-726, 2006. Retrieved 8. 3. 2009 from <http://jp.physoc.org>.
- Lechtenberg, R., Villeneuve, N., Monaghan, E. P., Densel, M. B., Rey, E., Dulac, O.: An open-label dose-escalation study to evaluate the safety and tolerability of ganaxolone in the treatment of refractory epilepsy in pediatric patients. *Epilepsia*, 37 [suppl 5], 204, 1996.
- Levy, R. H., Mattson, R. H., Meldrum, B. S., Perucca, E.: *Antiepileptic Drugs. Fifth edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.
- Liptáková, S., Velíšek, L., Velíšková, J., Moshé, S. L.: Effect of Ganaxolone on Flurothyl Seizures in Developing Rats. *Epilepsia*, 41 (7), 788-793, 2000.
- Marik, P. E., Varon, J.: The Management of Status Epilepticus. *Chest*, 126, 582-591, 2004. Retrieved 9. 9. 2008 from [www.chestjournal.org](http://www.chestjournal.org).
- Martin, I. L., Dunn, S. M. GABA receptors. *Toctris Reviews*, 20, 1-8, 2002. Retrieved 8. 3. 2009 from <http://www.tocris.com/pdfs/gabarev.pdf>
- Meldrum, B. S.: GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 27, 3S-11S, 1989.
- Mikulecká, A., Mareš, P.: NMDA receptor antagonists impair motor performance in immature rats. *Psychopharmacology*, 162, 364-372, 2002.
- Monaghan, E. P., Densel, M. B., Lechtenberg, R.: Gender differences in sensitivity to ganaxolone, a neuroactive steroid under investigation as an antiepileptic drug. *Epilepsia*, 37 [Suppl 5], 171, 1996.
- Monaghan, E. P., Navalta, L. A., Shum, L., Ashbrook, D. W., Lee, D. A.: Initial Human Experience with Ganaxolone, a Neuroactive Steroid with Antiepileptic Activity. *Epilepsia*, 38 (9), 1026-1031, 1997.
- Nohria, V., Giller, E.: Ganaxolone. *Neurotherapeutics*, 4 (1), 102-105, 2007.
- Olsen, R. W., Tobin, A. J. Molecular biology of GABAA receptors. *The FASEB Journal*, 4 (5),

- 1469-1480, 1990. Retrieved 10. 2. 2009 from <http://www.fasebj.org/cgi/reprint/4/5/1469>.
- Pieribone, V. A., Tsai, J., Soufflet, Ch., Rey, E., Shaw, K., Giller, E., Dulac, O.: Clinical Evaluation of Ganaxolone in Pediatric and Adolescent Patients with Refractory Epilepsy. *Epilepsia*, 48 (10), 1870-1874, 2007.
- Reddy, D. S.: Role of neurosteroids in catamenial epilepsy. *Epilepsy Research*, 62, 99-118, 2004.
- Reddy, D. S., Rogawski, M. A.: Chronic Treatment with the Neuroactive Steroid Ganaxolone in the Rat Induces Anticonvulsant Tolerance to Diazepam but Not to Itself. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295 (3), 1241-1248, 2000a.
- Reddy, D. S., Rogawski, M. A.: Enhanced Anticonvulsant Activity of Ganaxolone after Neurosteroid Withdrawal in a Rat Model of Catamenial Epilepsy. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294 (3), 909-915, 2000b.
- Rogawski, M. A.: Diverse Mechanisms of Antiepileptic Drugs in the Development Pipeline. *Epilepsy Research*, 69 (3), 273-294, 2006.
- Sedláček, M., Kořínek, M., Petrovič, M., Cais, O., Adamusová, E., Chodounská, H., Vyklický Jr., L. Neurosteroid Modulation of Ionotropic Glutamate Receptors and Excitatory Synaptic Transmission. *Physiological Research*, 57 (3), 49-57, 2008.
- Snead, O. C. Ganaxolone, a selective, high-affinity steroid modulator of the gamma-aminobutyric acid-A receptor, exacerbates seizures in animal models of absence. *Annals of neurology*, 44 (4), 688-691, 1998.
- Stępień, K., Tomaszewski, M., Czuczwar, S. J.: Profile of anticonvulsant activity and neuroprotective effects of novel and potential antiepileptic drugs – an update. *Pharmacological Reports*, 57, 719-733, 2005.
- Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of molecular biology*, 346 (4), 967-989, 2005.
- Vágnerová, M. *Vývojová psychologie I. Dětství a dospívání*. Praha: Karolinum, 2005

- Velišek a kol. *Kapitoly z moderní neurofyziologie a epileptologie*. Praha: Karolinum, 1992.
- Vojta, V. *Vojtův princip: svalové souhry v reflexní lokomoci a motorická ontogeneze*. Praha: Grada, 1995.
- Westerga, J., Gramsbergen, A.: The development of locomotion in the rat. *Developmental Brain Research*, 57, 163-174, 1990.
- Willmore, L. J. Clinical pharmacology of new antiepileptic drugs. *Neurology*, 55 (11), [suppl 3], S17-S24, 2000.
- Wojtal, K., Borowicz, K. K., Błaszczyk, B., Czuczwar, S. J.: Interactions of excitatory amino acid receptor antagonists with antiepileptic drugs in three basic models of experimental epilepsy. *Pharmacological Reports*, 58, 587-598, 2006.
- Wood, S. L., Beyer, B. K., Cappon, G. D.: Species Comparison of Postnatal CNS Development: Functional Measures. *Birth Defects Research, part B*, 68, 391-407, 1993.

## **SEZNAM PŘÍLOH**

### **PŘÍLOHA 1 - Negative geotaxis test**

- Znázornění testovacího zařízení a uložení potkana na počátku testu

### **PŘÍLOHA 2 - Wire mesh test**

- Znázornění testovacího zařízení s vyznačenými stupni na levém okraji žebříku
- Během našich měření nebyl na plošinu umíst'ován košík se sourozenci jako je vyobrazeno zde

### **PŘÍLOHA 3 - Bar holding test**

- Znázornění testovacího zařízení – dřevěná hrazda zavěšená na kovových tyčích 50 cm nad podložkou
- Na obrázku je potkan, který na hrazdě visí a snaží se zachytit pravou zadní končetinou

### **PŘÍLOHA 4 - Bar holding test**

- Znázornění testovacího zařízení
- Na obrázku je vyobrazen potkan, který byl schopen vylézt na hrazdu a přetrvává ve statické poloze

### **PŘÍLOHA 5 - 12-denní potkani – testy**

- Výsledky měření jednotlivých testů u každého potkana

### **PŘÍLOHA 6 - 18-denní potkani – testy**

- Výsledky měření jednotlivých testů u každého potkana

### **PŘÍLOHA 7 - 25-denní potkani – testy**

- Výsledky měření jednotlivých testů u každého potkana

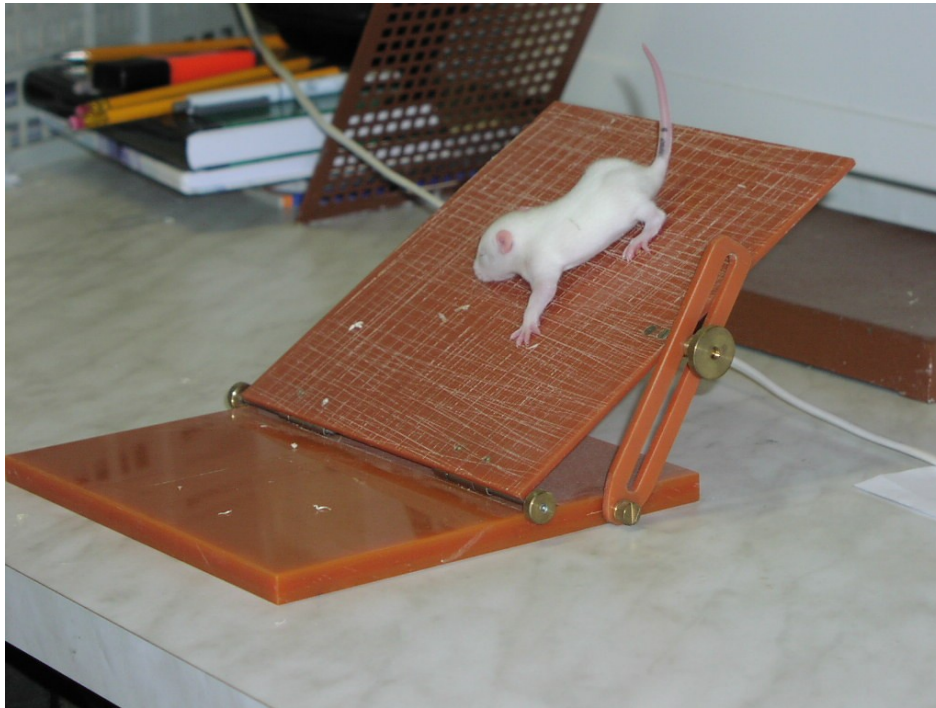
### **PŘÍLOHA 8 - 18-denní potkani – open field test**

- Výsledky zvolených parametrů zpracované programem Etho Vision XT u každého potkana

### **PŘÍLOHA 9 - 25-denní potkani – open field test**

- Výsledky zvolených parametrů zpracované programem Etho Vision XT u každého potkana

## PŘÍLOHA 1 – Negative geotaxis test



## PŘÍLOHA 2 – Wire mesh test



**PŘÍLOHA 3 – Bar holding test**



**PŘÍLOHA 4 – Bar holding test**



## PŘÍLOHA 5 – 12-denní potkani - testy

12 dnů								
kontroly	RR před	RR po	NG před	NG po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	6	4	3,5	1#	18	16
2	1	1	5	10	2	2	11	8
3	1	1	5	12	4	1	32	11
4	1	1	5	8	2	2,5	12	7
5	1	1	6	5	4	3	14	7
6	1	1	4	17	2,5#	4#	6	10
7	1	1	3	5	1,5#	4	5	6
8	1	1	12,5	11	2,5	1	7	6
9	1	1	3	21	4	1,5	4	10
10	1	1	7	6	4	1,5	12	4,5

sekundy

sekundy

stupeň

sekundy

5 = vylezl až nahoru

# = pád

20 mg/kg	RR před	RR po	NG před	NG po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	10	4	4	1,5#	25	15
2	1	1	4	13	2#	2,5	23	7
3	1	1	4	7	2,5	2#	10	5
4	1	1	4	6	1,5#	1,5	9	9
5	1	1	5	3,5	1,5	3,5	6	7
6	1	1	7	10	1	1	8	15
7	1	1	4	5	3,5	1#	15	7
8	1	1	3,5	11	1,5#	5	6	10
9	1	1	8	12	1,5#	1#	20	19
10	1	1	4	6	5	5	8	14

sekundy

sekundy

stupeň

sekundy

5 = vylezl až nahoru

# = pád

40 mg/kg	RR před	RR po	NG před	NG po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	4	5	1,5#	5	13	5
2	1	1*	8	20	4	1#	12	10
3	1	1*	5	nehod.	2	2,5	12	5
4	1	1	3,5	5	3	2	17	4
5	1	1,5*	2,5	5	2,5	2	12	13
6	1	1	8,5	9	1,5	2,5	11	3
7	1	1,5*	6	9	1#	2,5	6	11
8	1	1,5*	10	6	2,5#	4	13	6
9	1	1	10	7	4	4	8	6
10	1	1	3	9	3	4	6	12

sekundy

sekundy

stupeň

sekundy

\* = dyskoordinace

nehod.=neotočil se

5 = vylezl až nahoru

# = pád



## PŘÍLOHA 6 – 18-denní potkani - testy

18 dnů								
kontroly	RR před	RR po	NG před	NG po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	2	2	5	5	34	32
2	1	1	7	4	5	4	36	26
3	1	1	2	2	3,5	2	28	30
4	1	1	2	8	5	5	39	59
5	1	1	6	5	5	5	60	23
6	1	1	1,5	1,5	5	5	66	91
7	1	1	5	2	5	5	116	105
8	1	1	6	6	nehod.	nehod.	45	23
9								
10								

sekundy

sekundy

stupeň

sekundy

5 = vylezl až nahoru

nehod. = vylezl ven

20 mg/kg	RR před	RR po	NG před	NG po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	6	7	3	3,5	120	105
2	1	1	2	nehod.	5	5	95	108
3	1	1	5	4	nehod.	5	120×	120×
4	1	1	4	3	nehod.	5	60×	120×
5	1	1	3	4	5	5	120×	110
6	1	1	5	3	5	5	85	72
7	1	1	3	1,5	nehod.	nehod.	17×	38×
8	1	1	3	3	nehod.	5	64×	120×
9	1	1	2	1,5	5	5	26	110
10	1	1	3	2,5	5	5	20	64

sekundy

sekundy

stupeň

sekundy

nehod.=neotočil se

5 = vylezl až nahoru

× = vylezl na hrazdu

nehod. = vylezl ven

40 mg/kg	RR před	RR po	NG před	NG po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	2	2	5	2,5	95×	110
2	1	1	2	6	5	2	22	45
3	1	1	15	4	2,5	5	100×	13
4	1	1	2	5	1,5	5	115	31
5	1	1	3	3,5	5	5	120×	88
6	1	1	4	2	nehod.	5	30	38
7	1	1	2	4	5	5	58×	102
8	1	1	2	9	5	5	120×	120×
9	1	1	8	7	2	3	38	40
10	1	1	1,5	4	nehod.	5	58×	63

sekundy

sekundy

stupeň

sekundy

5 = vylezl až nahoru

× = vylezl na hrazdu

nehod. = vylezl ven

## PŘÍLOHA 7 – 25-denní potkani - testy

25 dnů						
kontroly	RR před	RR po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	5	3	120×	120×
2	1	1	5	4	120×	120×
3	1	1	5	5	120×	120×
4	1	1	5	5	120×	120×
5	1	1	5	5	120×	120×
6	1	1	5	5	120×	120×
7	1	1	5	5	120×	120×
8	1	1	nehod.	2,5	120×	120×
9	1	1	4	2	120×	120×
10	1	1	5	5	120×	120×

sekundy

stupeň

sekundy

5 = vylezl až nahoru

× = vylezl na hrazdu

nehod. = vylezl ven

20 mg/kg	RR před	RR po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	5	5	120×	120×
2	1	1	5	5	120	120
3	1	1	5	5	120×	120×
4	1	1	5	4	120×	120×
5	1	1	5	4	120×	120×
6	1	1	3	2	120	120
7	1	1	5	5	120×	120×
8	1	1	5	5	120×	120×
9	1	1	3	1	120×	120×
10	1	1	2,5	1,5	120	120

sekundy

stupeň

sekundy

5 = vylezl až nahoru

× = vylezl na hrazdu

nehod. = vylezl ven

40 mg/kg	RR před	RR po	WM před	WM po	BH před	BH po
1	1	1	5	5	120	120
2	1	1	5	1,5	120×	120×
3	1	1	3,5	1,5	120	120×
4	1	1	2	3	120×	120×
5	1	1	5	5	120×	120×
6	1	1	5	5	120	120×
7	1	1	5	5	120	120×
8	1	1	5	5	120	120
9	1	1	nehod.	nehod.	120×	120×
10	1	1	nehod.	3,5	120	120

sekundy

stupeň

sekundy

5 = vylezl až nahoru

× = vylezl na hrazdu

nehod. = vylezl ven



