

**Antikonvulzívne účinky a farmakokinetický profil
kanabidiolu (CBD) v modeloch záchvatov
pentyléntetrazolu (PTZ) alebo N-metyl-D-aspartátu
(NMDA) u detských potkanov
(Vol'ný preklad)**

Autori:

Libor Uttl, Tomáš Hložek, Pavel Mareš, Tomáš Páleníček, Hana Kubová

Publikované:

Online 22.12.2021

Originálny článok dostupný na:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8744811/>

Antikonvulzívne účinky a farmakokinetický profil kanabidiolu (CBD) v modeloch záchvatov pentyléntetrazolu (PTZ) alebo N-metyl-D-aspartátu (NMDA) u detských potkanov

Abstrakt

Napriek použitiu kanabidiolu (CBD), nepsychoaktívneho kanabinoidu, u pediatrických pacientov s epilepsiou sú predklinické štúdie o jeho účinkoch u nedospelých zvierat veľmi obmedzené. V tejto štúdii sme skúmali protizáchvatovú aktivitu CBD (10 a 60 mg/kg podávaných intraperitoneálne) na dvoch modeloch chemicky vyvolaných záchvatov u kojeneckých (12-dňových) potkanov. Záchvaty boli vyvolané buď pentyléntetrazolom (PTZ) alebo N-metyl-D-aspartátom (NMDA). Paralelne sa hodnotili hladiny CBD v mozgu a plazme a možné motorické nepriaznivé účinky v testoch vzpriamovacieho reflexu a držaní tyče. CBD bolo neúčinné proti záchvatom vyvolaným NMDA, ale v dávke 60 mg/kg zrušilo tonickú fázu generalizovaných záchvatov vyvolaných PTZ. Plazmatické a mozgové hladiny CBD boli stanovené do 24 hodín po podaní. Maximálne hladiny CBD v mozgu (996 ± 128 a $5\,689 \pm 150$ ng/g po dávkach 10 a 60 mg/kg, v uvedenom poradí) sa dosiahli 1–2 hodiny po podaní a boli stále detekovateľné o 24 hodín neskôr (120 ± 12 a 904 ± 63 ng/g, v tomto poradí). Žiadna z dávok negatívne neovplyvnila motorický výkon do 1 hodiny po podaní, ale CBD v oboch dávkach blokovalo zlepšenie v teste držania tyče pri opakovanom vystavení tejto úlohe. Celkovo vzaté, protizáchvatová aktivita CBD u malých zvierat závisí od dávky a modelu a pri terapeutických dávkach CBD nespôsobuje motorické poškodenie. Potenciálne riziko CBD pre motorické učenie pozorované pri opakovaných motorických testoch sa musí ďalej skúmať. v uvedenom poradí). Žiadna z dávok negatívne neovplyvnila motorický výkon do 1 hodiny po podaní, ale CBD v oboch dávkach blokovalo zlepšenie v teste držania tyče pri opakovanom vystavení tejto úlohe. Celkovo vzaté, protizáchvatová aktivita CBD u malých zvierat závisí od dávky a modelu a pri terapeutických dávkach CBD nespôsobuje motorické poškodenie. Potenciálne riziko CBD pre motorické učenie pozorované pri opakovaných motorických testoch sa musí ďalej skúmať. v uvedenom poradí). Žiadna z dávok negatívne neovplyvnila motorický výkon do 1 hodiny po podaní, ale CBD v oboch dávkach blokovalo zlepšenie v teste držania tyče pri opakovanom vystavení tejto úlohe. Celkovo vzaté, protizáchvatová aktivita CBD u malých zvierat závisí od dávky a modelu a pri terapeutických dávkach CBD nespôsobuje motorické poškodenie. Potenciálne riziko CBD pre motorické učenie pozorované pri opakovaných motorických testoch sa musí ďalej skúmať.

Kľúčové slová: kanabidiol, epilepsia, záchvaty, NMDA, pentyléntetrazol, PTZ, nedospelé potkany

1. Úvod

V súčasnosti rastie záujem o využitie fytoKANABINOIDOV získaných z konope na liečebné účely. Najrozšírenejšími fytoKANABINOIDMI v rastlinách *cannabis sativa* sú psychoaktívny Δ^9 -tetrahydroKANABINOL (Δ^9 -THC) a nepsychoaktívny kanabidiol (CBD). Absencia psychoaktívnych účinkov výrazne zjednodušuje používanie CBD na medicínske účely [1 , 2 , 3]. Popísané sú najmä jeho domnelé antipsychotické, anxiolytické a neuroprotektívne účinky [4 , 5 , 6 , 7].

Terapeutický potenciál CBD pri epilepsii je známy už mnoho rokov, ale veľký pokrok v charakterizácii jeho protizáchvatových účinkov sa dosiahol až v poslednom desaťročí. Predklinické aj klinické štúdie prinášajú presvedčivé údaje o protizáchvatových účinkoch CBD. V klinických štúdiách sa ukázalo, že CBD účinne znižuje frekvenciu záchvatov u pacientov s Dravetovým syndrómom alebo Lennox-Gastautovým syndrómom [8 , 9] a od roku 2018 je schválený americkým Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) na liečbu týchto ochorení. dve poruchy u detí [10].

Antikonvulzívne vlastnosti CBD a príbuzných zlúčenín boli hodnotené v rôznych predklinických testoch od začiatku 70. rokov, ale predchádzajúce štúdie priniesli kontroverzné výsledky. Zatiaľ čo v jednej štúdii CBD predchádzalo záchvatom maximálnych elektrošokov (MES), v inej neboli zaznamenané žiadne účinky v rovnakom modeli [11 , 12]. Protichodné výsledky môžu byť spojené so spôsobom podávania a neadekvátnymi hladinami CBD, pretože farmakokinetické vlastnosti CBD nie sú ani zďaleka ideálne (pre rev. [13 , 14]). Nedávno bola preukázaná protizáchvatová aktivita CBD na rôznych modeloch in vivo, ako aj in vitro (pre rev. [15]). Napriek tomu, že CBD sa používa hlavne na liečbu detských epilepsií, informácie o jeho účinkoch v predklinických modeloch detských záchvatov alebo epilepsií a o farmakokinetike u nedospelých laboratórnych zvierat sú veľmi obmedzené.

Mechanizmy zodpovedné za protizáchvatovú aktivitu CBD nie sú úplne pochopené. CBD je „viaccieľová“ droga. Interaguje s veľkým počtom receptorov a biologických systémov, z ktorých mnohé majú vplyv na reguláciu neurónovej excitability. Medzi nimi bolo preukázané, že CBD ovplyvňuje receptory spojené s G-proteínom, konkrétne kanabinoïdné receptory CB1 a CB2, receptory spojené s G-proteínom 55 a 18 a opioidné receptory μ a δ . Okrem toho sa zistilo, že CBD interaguje s prechodným receptorom potenciálneho vaniloidu typu 1 (TRPV1) a receptormi GABA A a sodíkovým kanálom s napäťovým ovládaním (VGSC) (pre rev. [16]). Ak vezmeme do úvahy dostupné údaje, neobjavili sa mechanizmy ako prevládajúce v protizáchvatovom pôsobení CBD a primárny mechanizmus sa môže líšiť v rámci experimentálnych modelov záchvatov alebo epilepsie.

Epidemiologické štúdie ukazujú, že záchvaty a epilepsia postihujú dojčatá a deti viac ako ktorákoľvek iná veková skupina [17] a novovzniknuté epilepsie sa vyskytujú najčastejšie počas prvých rokov života [18]. Klinické údaje teda naznačujú, že vyvíjajúci sa mozog je náchylnejší na vytváranie záchvatov ako dospelý, a to potvrdili mnohé štúdie na experimentálnych zvieratách. U hlodavcov sa obdobie maximálnej náchylnosti na záchvaty zhoduje s druhým a tretím postnatálnym týždňom života. Je skutočne veľmi ťažké porovnávať úroveň dozrievania u nedospelých hlodavcov s úrovňou u ľudí. Na základe načasovania rastového klíčenia, synaptogenézy, priebehu myelinizácie a dozrievania neurotransmitterových systémov, celkový konsenzus prekladá hlodavce P10-12 na ľudských novorodencov alebo raných dojčiat [19 , 20]. Okrem toho, publikované údaje ukazujú, že EEG aktivita je až do P10 prerušená obdobiami elektrického ticha, ktoré zodpovedajú „tracé alternant“ opísanému u predčasne narodených novorodencov, ale nikdy sa nevyskytovali u donosených ľudských novorodencov [21]. Na základe úrovne dozrievania týchto vývojových míľnikov sa teda mláďatá potkanov P10-P12 môžu porovnávať s ľudskými novorodencami alebo dojčatami.

Cieľom tejto štúdie bolo určiť predklinickú bezpečnosť a účinnosť CBD u malých potkanov. Účinnosť sa hodnotila u potkanov P12 v dvoch modeloch konvulzívnych záchvatov indukovaných chemicky

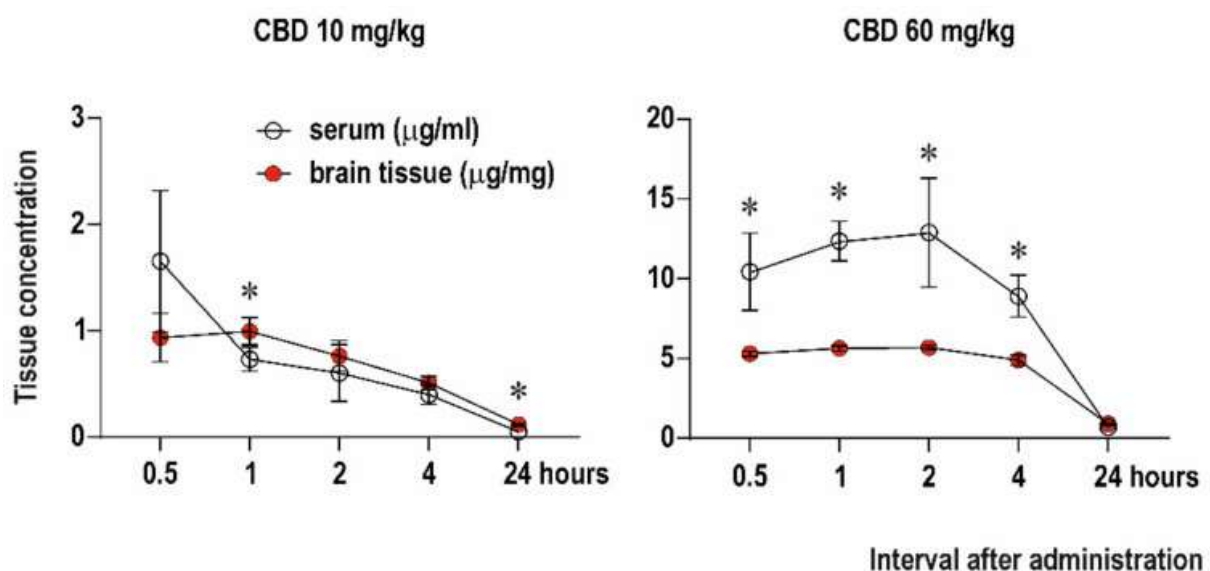
použitím buď pentyléntetrazolu (PTZ) alebo N-metyl-D-aspartátu (NMDA). Záchvaty vyvolané PTZ predstavujú štandardný model pre rutinný skríning potenciálnych liekov proti záchvatom. Vo vysokých dávkach PTZ vyvoláva generalizované tonicko-klonické záchvaty u všetkých vekových skupín hlodavcov vrátane novorodencov. Pri systémovom podávaní NMDA spôsobuje dva typy kŕčov: vekovo špecifické emprostotonické (flexie) v prvých troch postnatálnych týždňoch a generalizované klonicko-tonické záchvaty pozorované vo všetkých vekových skupinách [22]. Záchvaty vyvolané PTZ a NMDA sa podstatne líšia svojou farmakologickou reakciou.

Podľa našich najlepších vedomostí nie sú dostupné žiadne informácie týkajúce sa farmakokinetiky CBD u nedospelých hlodavcov. Na vyplnenie tejto medzery sme použili ďalšie skupiny zvierat na stanovenie hladín CBD v sére aj v mozgu do 24 hodín po podaní jednej dávky. Možné nepriaznivé účinky boli hodnotené pomocou dvoch behaviorálnych testov zameraných na motorické schopnosti, ich vývoj a motorické učenie.

2. Výsledky

2.1. Hladiny CBD v sére a mozgu

Skúmali sme zmeny koncentrácií CBD v sére a mozgu v piatich rôznych časových bodoch (0,5, 1, 2, 4 a 24 h) po podaní CBD v dávkach 10 a 60 mg/kg (postava 1). Pre každú dávku a časový bod sa použila samostatná skupina zvierat. Najprv sme porovnávali koncentráciu CBD v mozgu a sére pre každú dávku. Po podaní CBD 10 mg/kg bola maximálna koncentrácia v sére (1655 ± 664 ng/ml zistená pomocou AUC) dosiahnutá v intervale 0,5 hodiny a v mozgu (996 ± 128 ng/g) v intervale 1 hodiny. Porovnanie koncentrácií v sére a mozgu odhalilo efekt časového bodu $F(1,708, 15,80) = 49,48$, $p < 0,0001$ a časový bod x tkanivová interakcia $F(4, 47) = 8,578$; $p < 0,0001$). Koncentrácia CBD bola významne vyššia v mozgovom tkanive v porovnaní so sérom 1 h ($p = 0,0352$) a 24 h ($p < 0,0001$) po podaní lieku. Maximálne hladiny po podaní CBD 60 mg/kg boli $12\,903 \pm 342$ ng/ml v sére a $5\,689 \pm 150$ ng/g v mozgu a dosiahli sa 2 hodiny po podaní. Sérové koncentrácie boli významne vyššie ako koncentrácie CBD v mozgu počnúc 0,5 h až 4 h po podaní (intervalový účinok $F(2,080, 90,24) = 90,2$, $p < 0,0001$; tkanivový účinok $F(1, 10) = 51,88$; $p < 0,0001$ a interval x tkanivová interakcia $F(4, 37) = 17,86$; $p < 0,0001$).

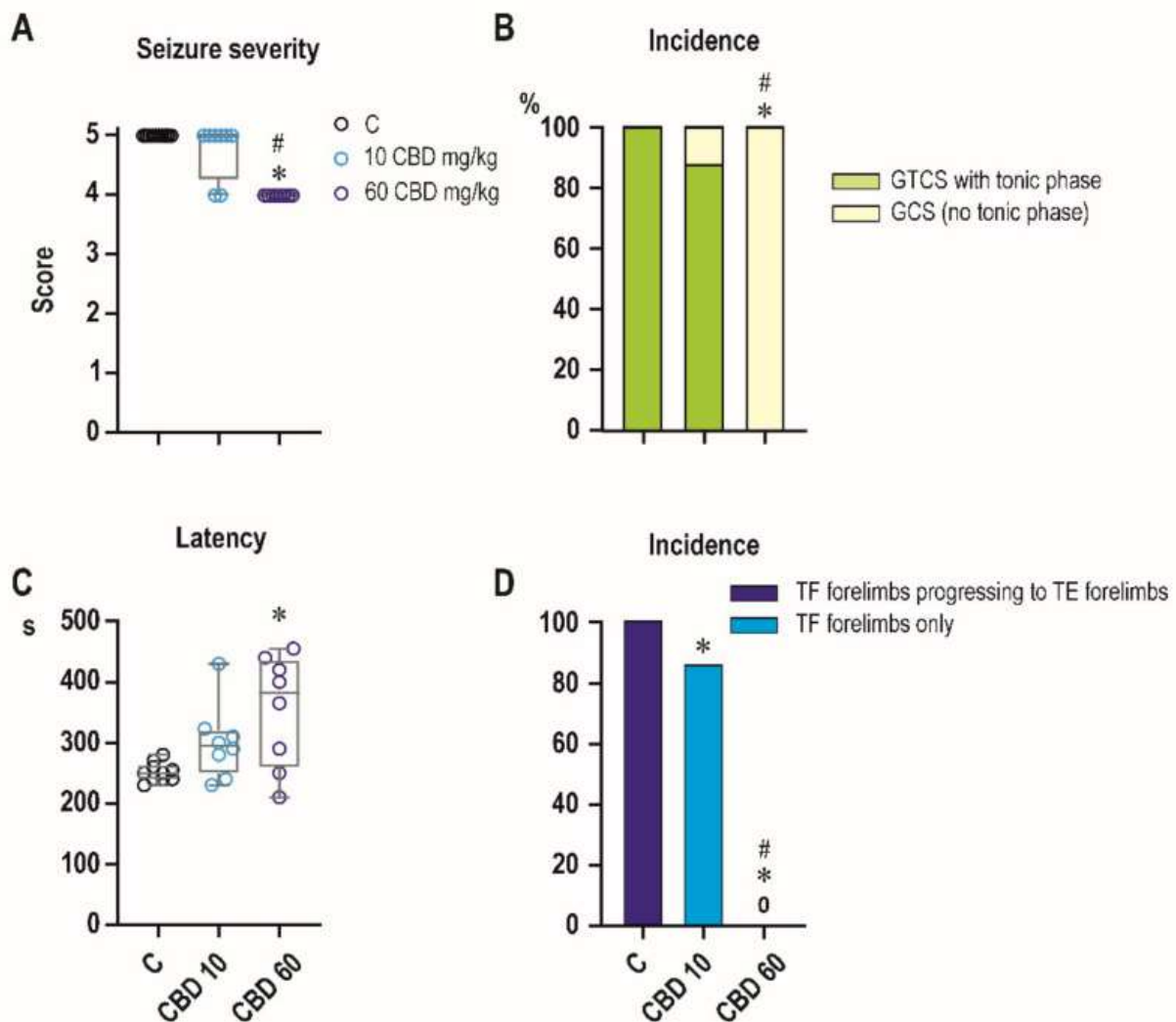


Tkanivová koncentrácia CBD. Hladiny CBD v sére (µg/ml plazmy, prázdne krúžky) a v mozgovom tkanive (µg/mg tkaniva, červené krúžky) hodnotené v 5-časových intervaloch po podaní lieku (0,5–24 h; os x).

CBD sa podávalo intraperitoneálne v dávkach 10 mg/kg (ľavý panel) alebo 60 mg/kg (pravý panel). Údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SD. Hviezdičky označujú významný rozdiel medzi hladinami v plazme a v mozgu.

2.2. Účinky CBD na záchvaty vyvolané PTZ

Najprv sme skúmali účinok CBD na modeli záchvatov PTZ (Obrázok 2). V kontrolných podmienkach sa u všetkých zvierat vyvinuli generalizované tonicko-klonické záchvaty so stredným skóre 5. Podávanie CBD ovplyvnilo závažnosť záchvatov a porovnanie medzi liečebnými skupinami s Kruskal-Wallis testom odhalilo významný rozdiel ($H = 18,91$; $p < 0,0001$). Zvieratá liečené CBD 60 mg/kg vykazovali zníženú závažnosť záchvatov v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,0001$) a skupinou CBD 10 mg/kg ($p = 0,0013$) (Obrázok 2A).



Účinky CBD v modeli PTZ. Účinky CBD v dvoch dávkach (10 a 60 mg/kg) na záchvaty vyvolané PTZ. CBD v dávke 60 mg/kg signifikantne znížilo závažnosť záchvatov (A) a tento účinok bol spôsobený najmä špecifickým potlačením tonickej zložky generalizovaných tonicko-klonických záchvatov (B). Percento zvierat vykazujúcich úplné generalizované tonicko-klonické záchvaty (zelené) a generalizované záchvaty bez tonickej fázy, tj generalizované klonické záchvaty (žlté) je na osi y. V tejto dávke CBD viedlo k zvýšeniu latencie do generalizovaných záchvatov (C). V nižšej dávke 10 mg/kg CBD blokovalo prechod z tonickej flexie (bledomodrá; iba predné končatiny TF) do tonickej extenzie na predných končatinách (tmavomodrá; TF predné končatiny progredujúce do TE predných končatín) (D).

Hviezdičky označujú významný rozdiel v porovnaní s kontrolami, # označujú významný rozdiel v porovnaní medzi rôznymi dávkami CBD. os x vo všetkých troch grafoch predstavuje kontrolu a dve skupiny s rôznymi dávkami (10 a 60 mg/kg) CBD. Údaje v grafoch (A , C) sú prezentované ako krabicové grafy (medián vzorky a prvý a tretí kvartil) s fúzmi (min a max). Kruhy označujú jednotlivé hodnoty.

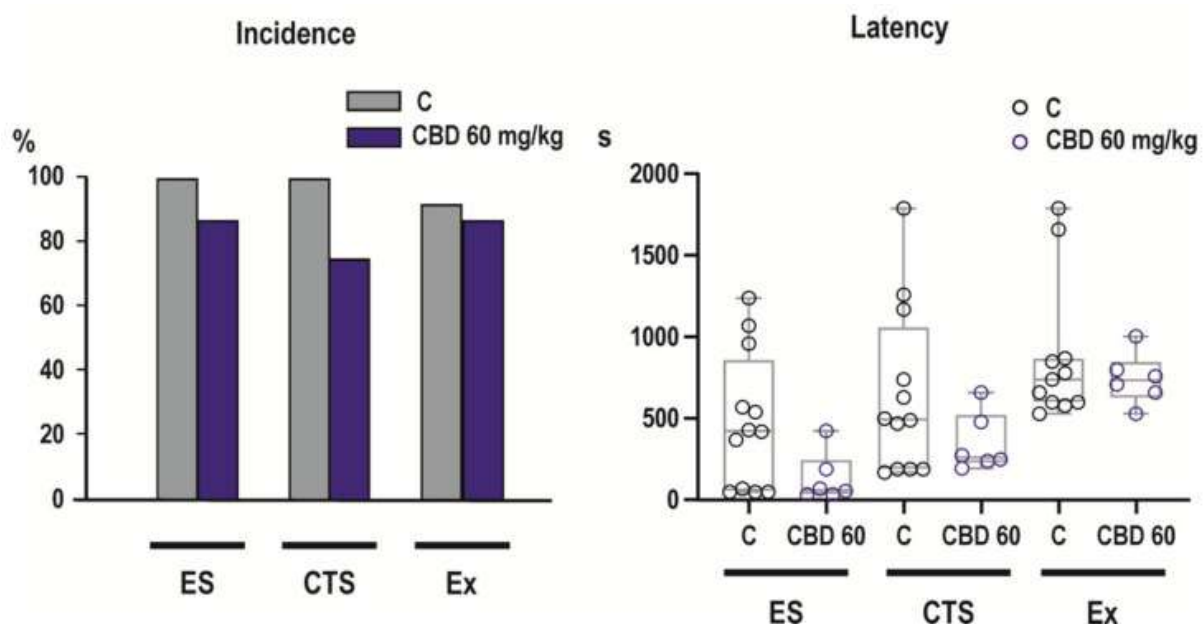
Za kontrolných podmienok bola priemerná latencia k generalizovaným záchvatom (so skóre 4–5) 251 s. Predbežná liečba CBD viedla k významnému zvýšeniu latencie v skupinách (F 2,23 = 5,730, p = 0,0096). Pri dávke 60 mg/kg sa priemerná latencia zvýšila na 354 s (p = 0,0020). Nižšia dávka CBD (10 mg/kg) mala tendenciu zvyšovať latenciu, ale rozdiel nedosiahol hladinu významnosti (p = 0,0986) (Obrázok 2C).

Podávanie CBD ovplyvnilo vzorec a výskyt tonickej fázy generalizovaných záchvatov. Analýza chí-kvadrát odhalila významný rozdiel vo výskyte tonickej fázy medzi liečebnými skupinami ($\chi^2 = 22,13$, df = 2, p < 0,0001) (Obrázok 2B). Tonická fáza predných končatín bola pozorovaná u 100 % a zadných končatín u 50 % kontrol, CBD v dávke 60 mg/kg úplne blokovalo tonicú fázu na predných aj zadných končatinách (p = 0,0014, Fisherovo presné). U všetkých kontrolných zvierat tonicá fáza na predných končatinách začala tonicou flexiou, ktorá progredovala do tonickej extenzie. CBD v dávke 10 mg/kg potlačil túto progresiu (p < 0,0001; Fisherov presný test), pričom výskyt tonickej flexie zostal nezmenený (Obrázok 2D).

Úmrtnosť bola veľmi nízka v 30-minútovom intervale po podaní PTZ u kontrol (1 z 10), ako aj u zvierat s CBD (0 z 8 v oboch dávkových skupinách), pričom nevykazovali žiadne štatisticky významné rozdiely.

2.3. Účinky CBD na záchvaty vyvolané NMDA

CBD len v testovanej dávke 60 mg/kg bolo neúčinné v modeli záchvatov vyvolaných NMDA (Obrázok 3).

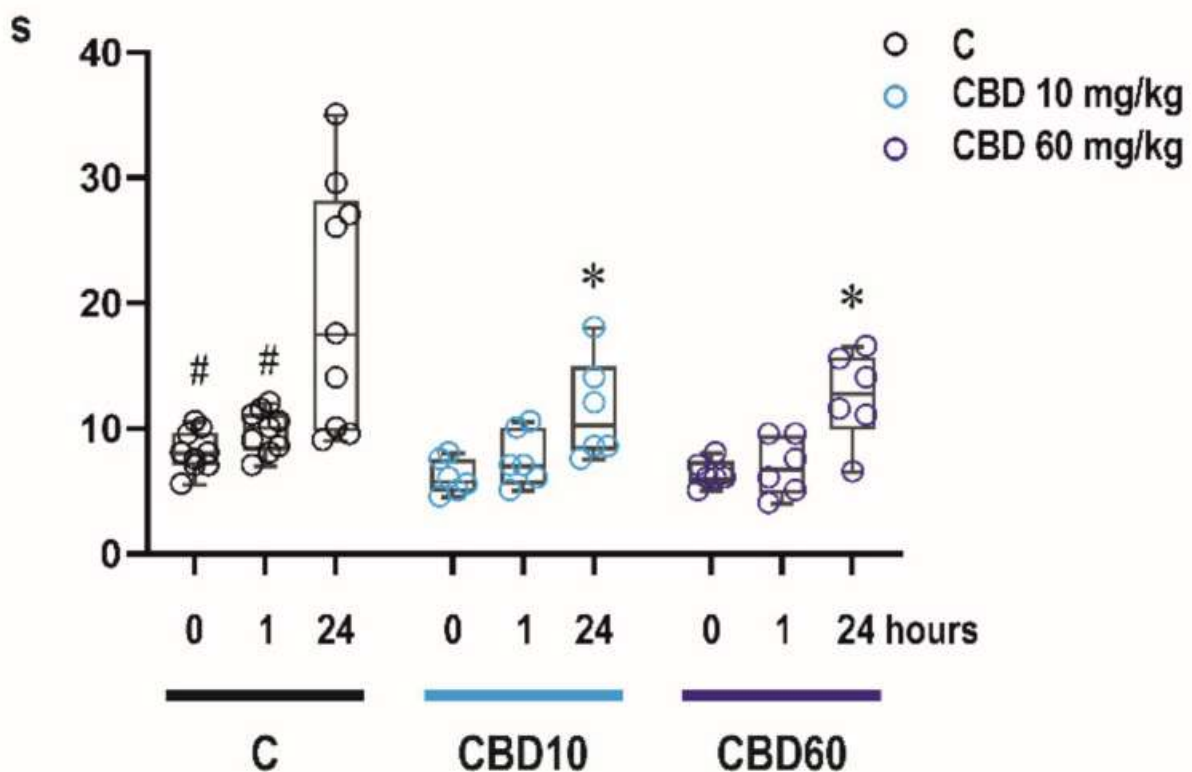


Účinky CBD v modeli NMDA. Predbežná liečba 60 mg/kg CBD neovplyvnila výskyt (ľavý panel) žiadnych hodnotených parametrov záchvatov vyvolaných NMDA – emprostotonických (flexiových) záchvatov (ES), generalizovaných klonických tonických záchvatov (CTS) alebo mortality (Ex). Latencie (pravý panel) jednotlivých parametrov sa nelíšili od kontrol. Ďalšie podrobnosti ako v Obrázok 2.

2.4. Účinky CBD na senzomotorické schopnosti dojčiat potkanov

2.4.1. Test držania tyče

Dvojcestná RM ANOVA odhalila významné účinky času po podaní CBD ($F_{2,54} = 18,14, p < 0,0001$) a liečbe ($F_{2,54} = 6,619, p < 0,0001$). Podávanie CBD viedlo k výraznému skráteniu času stráveného na tyčinke v porovnaní s kontrolami v 3. teste, tj 24 hodín po podaní dávky 10 mg/kg ($p = 0,0029$), ako aj 60 mg/kg ($p = 0,0102$). Kontroly strávili na lište výrazne dlhší čas v 24-hodinovom intervale (tj pri P13) v porovnaní s časom hodnoteným pri P12 (0,5 h a 1 h interval; $p < 0,0001$ a $p > 0,0001$, v tomto poradí) (Obrázok 4).



Účinky CBD na výkon motora. Test držania tyče – čas strávený na tyči. CBD významne neovplyvnilo čas strávený na tyči v teste držania tyče (osi yv sekundách) jednu hodinu po podaní lieku. V kontrolách bol čas na lište výrazne dlhší 24 hodín po prvom vystavení tomuto testu. Na rozdiel od toho zvieratá vystavené jednej alebo druhej dávke CBD (10 alebo 60 mg/kg) mali tendenciu zlepšovať svoj výkon v tomto teste len medzi 1. a 3. testom a strávili kratší čas na tyči v porovnaní s kontrolami. Prvýkrát boli zvieratá testované pred podaním CBD alebo rozpúšťadla. Ďalšie testy sa uskutočnili o 1 hodinu a 24 hodín neskôr. # označuje významný rozdiel medzi časom stráveným na lište v 3. a predchádzajúcich testoch v rámci jednej liečebnej skupiny, * významný rozdiel v porovnaní s kontrolami.

2.4.2. Vzpriamovacie reflexy

Bez ohľadu na liečbu a interval po podaní lieku sa všetky zvieratá vrátili do svojej normálnej vzpriamenej polohy za menej ako 1 s.

3. Diskusia

Hlavné zistenia našej štúdie odhalili, že predbežná liečba CBD viedla k zníženiu závažnosti záchvatov v modeli PTZ, ktorý bol poháňaný selektívnou blokádou tonickej fázy generalizovaných tonicko-klonických záchvatov. Na rozdiel od toho CBD neovplyvnilo záchvaty vyvolané NMDA u infantilných potkanov P12. Okrem toho ip podávanie CBD viedlo k dlhotrvajúcim hladinám CBD v plazme a mozgu, ktoré pretrvávali až 4 hodiny po podaní.

Prevládajúce účinky CBD na tonické (tj mozgovým kmeňom sprostredkované [22]) záchvaty sú v súlade s údajmi získanými u dospelých zvierat v modeli maximálneho elektrošoku [11 , 23] a s účinkami kanabidivarínu derivátu CBD (CBDV) na PTZ-indukované tonická fáza generalizovaných záchvatov u potkanov P10 [24]. Špecifické potlačenie tonickej fázy záchvatov vyvolaných PTZ ako hlavný účinok niektorých liekov proti záchvatom (napr. lamotrigínu a fenytoínu [25], karbamazepínu a oxkarbazepínu [26], felbamátu [27], tj liekov účinných proti MES) (pre rev. [28]) bol demonštrovaný v tomto modeli.

Systémové podávanie vysokých dávok NMDA, použité v našej štúdii, vedie k dvom typom záchvatov, ktoré sa líšia farmakologickou senzitivitou a priebehom vývoja. Zatiaľ čo generalizované záchvaty môžu byť vyvolané u všetkých vekových skupín hlodavcov, flexné záchvaty sú vysoko špecifické pre vek a možno ich spoľahlivo vyvolať len u zvierat mladších ako tri týždne [22]. Kvôli výskytu tohto typu záchvatov súvisiacemu s vekom a jeho špecifickej farmakologickej senzitivite boli flexné záchvaty navrhnuté ako model záchvatov v ranom veku (infantilné krčce) na skrining liekov [29]. V súlade s účinkami CBDV [24], CBD bolo neúčinné proti flexným záchvatom. Tieto údaje sú v rozpore s výsledkami klinickej štúdie, ktorá ukazuje, že podávanie CBD vedie k zníženiu záchvatov u pacientov s epileptickými krčmi [30]. V tejto štúdii bol však medián veku pacientov 8 rokov, tj vývojové štádium, ktoré skôr zodpovedá zrelším, juvenilným hlodavcom, ktoré sú citlivejšie na protizáchvatové účinky CBD-derivátu CBVD [24]. U dospelých myší sa zistilo, že CBD znižuje generalizované záchvaty vyvolané NMDA [31], ale v našich experimentoch bol neúčinný proti tomuto typu záchvatov u malých potkanov. Konfliktne výsledky našej a ich štúdie možno vysvetliť rôznymi spôsobmi podávania liekov, pretože v ich experimente boli CBD aj NMDA intracerebroventrikulárne injikované a tiež rôznymi vývojovými štádiami zvierat.

Rozdiely v protizáchvatovej aktivite CBD v dvoch modeloch záchvatov použitých v našej štúdii môžu súvisieť s odlišnými molekulárnymi mechanizmami zodpovednými za vývoj záchvatov. Účinky PTZ sú sprostredkované antagonizmom GABAergického prenosu [32], zatiaľ čo NMDA receptory sa musia podieľať na vytváraní flexných záchvatov. Podporujú to nielen naše zistenia, že iba krčce pôsobiace na tento typ receptorov sú schopné vyvolať tieto záchvaty [22 , 33 , 34], ale aj vývojová zhoda možnosti vyvolať flexné záchvaty s nadmernou expresiou [35] a vyššia citlivosť NMDA receptorov [36 , 37]. Farmakologická odozva generalizovaných záchvatov vyvolaných PTZ a flexných záchvatov vyvolaných NMDA sa podstatne líši. Generalizované záchvaty vyvolané PTZ alebo oddelene ich tonická fáza môžu byť potlačené mnohými liekmi proti záchvatom s odlišnými mechanizmami účinku (pre rev. [38]). Na rozdiel od toho, NMDA-indukované flexné záchvaty predstavujú model vysoko farmakorezistentných záchvatov a štúdie využívajúce tento model dokumentujú, že iba obmedzený počet liekov potláča tieto záchvaty, ako je vigabatrín u zvierat P12 [39] alebo valproát u potkanov P18 [29]. Doteraz nebol

zaznamenaný žiadny vzťah medzi mechanizmami protizáchvatovej aktivity a účinnosťou v modeli NMDA-indukovaných flexných záchvatov.

Niekoľko štúdií preukázalo, že CBD je u pediatrických pacientov dobre tolerovaná a neboli hlásené žiadne významné vedľajšie účinky na centrálny nervový systém alebo účinky na vitálne funkcie alebo náladu. Predklinické údaje o bezpečnosti CBD u nedospelých hlodavcov sú obmedzené. Podávanie CBDV v terapeutických dávkach potkanom P7 vedie k zvýšenej smrti neurónov u potkanov P7 (vývojová vrcholová citlivosť na neuronálnu apoptózu vyvolanú liekom proti záchvatom (ASD)) [40]. Tento účinok bol však výrazne menej silný ako účinky iných ASD, ktoré sa bežne používajú na liečbu neonatálnych záchvatov [41]. Pretože vedľajšie účinky ASD nie sú bežne testované na nedospelých laboratórnych zvieratách, pridali sme jednoduchú sadu testov na posúdenie účinkov CBD v dávkach potláčajúcich záchvaty na motorický výkon. Testy boli vybrané podľa úrovne dozrievania senzomotorického systému u infantilných zvierat a podstatne sa líšia svojou náročnosťou [42]. Zatiaľ čo vzpriamovacie reflexy dozrievajú krátko po narodení a predstavujú relatívne jednoduchú reakciu, ktorá koriguje orientáciu tela pri jeho vytiahnutí z normálnej vzpriamenej polohy, test držania tyče je najnáročnejším motorickým testom u infantilných zvierat [43].

Výkon v týchto motorických testoch nebol ovplyvnený CBD hodinu po podaní. Tieto údaje podporujú predchádzajúcu štúdiu na dospelých zvieratách, ktorá ukazuje, že CBD poskytuje ochranu pred záchvatmi pri nezhoršujúcich dávkach [23]. Avšak na rozdiel od kontrol, zvieratá liečené CBD nezlepšili svoj výkon v opakovanom teste držania tyče vykonanom 24 hodín po podaní CBD. Zlepšenie s opakovaním je znakom motorického učenia a bežne sa vyskytuje v mnohých motorických úlohách u vyvíjajúcich sa zvierat [42]. Možné negatívne účinky CBD na schopnosti učenia sa však musia ďalej skúmať z dôvodu obmedzeného počtu behaviorálnych testov použitých v našej štúdii.

V súlade so štúdiami na dospelých hlodavcoch [44] CBD rýchlo preniklo do mozgu po intraperitoneálnom podaní. Po podaní 60 mg/kg CBD sa T_{max} v mozgu dosiahol po 2 hodinách. C_{max} aj T_{max} boli porovnateľné s hodnotami u dospelých potkanov po ip dávkach 120 mg/kg (aktívna dávka u dospelých hlodavcov) [23 , 44]. To naznačuje, že nižšie dávky CBD sú dostatočné na dosiahnutie protizáchvatovo účinnej hladiny v mozgu u malých potkanov. Na rozdiel od dospelých [44], plazmatické hladiny boli podstatne vyššie v porovnaní s hladinami v mozgu po podaní 60 mg/kg CBD u malých potkanov. Je to pravdepodobne kvôli nezrelosti metabolických dráh zodpovedných za degradáciu CBD [45], ale farmakokinetiku CBD a iných kanabinoïdov je potrebné ďalej študovať u vyvíjajúcich sa hlodavcov.

Protizáchvatová účinnosť CBD a jeho derivátov bola študovaná len v obmedzenom rozsahu v iných vekových skupinách vyvíjajúcich sa hlodavcov, ale zistilo sa, že CBDV je účinnejší proti viacnásobným záchvatovým modelom u mláďat (P20) v porovnaní s infantilnými (P10) potkanmi [24]. Autori pripisujú toto zvýšenie účinnosti zvýšeniu expresie cieľa CBDV, receptora TRPV1.

4. Materiály a metódy

4.1. Zvieratá

Experimenty sa uskutočnili na 12-dňových (P12) samcoch potkanov Wistar albino (Fyziologický ústav Českej akadémie vied). Deň narodenia bol definovaný ako deň 0. Celkovo sa na túto štúdiu použilo 74 zvierat. Potkany boli umiestnené v kontrolovanom prostredí (teplota 22 ± 1 °C, vlhkosť 50–60 %, svetlo 6:00–18:00) s voľným prístupom k potrave a vode. V deň 5 (narodenie bolo definované ako deň 0) boli mláďatá náhodne odchované a každý vrh bol upravený na 10 samcov. V postnatálnom dni (PD) 12 boli zvieratá označené na identifikáciu a zmiešané ošetrením. Každý vrh pozostával z kontrol a zvierat liečených rôznymi dávkami CBD. Aby sa vylúčil efekt vrhu, zvieratá v akejkolvek skupine boli vybrané z rôznych vrhov. Všetky postupy zahŕňajúce zvieratá a starostlivosť o ne boli vykonané podľa smerníc ARRIVE <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines> (prístup 13. decembra 2021) v súlade s vnútroštátnymi (zákon č. 246/1992 Zb.) a medzinárodnými zákonmi a politikami (smernica EÚ 2010/63/EÚ pre zvieratá experimentov a Príručky Národného zdravotného ústavu pre starostlivosť a používanie laboratórnych zvierat (publikácia NIH č. 8023, revidovaná 1978) Etická komisia Českej akadémie vied schválila protokol experimentu (Schválenie č. 15/2018, dátum schválenie 4. júna 2018).

4.2. Podávanie liekov a odber vzoriek

Kanabidiol (CBD; THC-Pharm GmbH (TH526K, 99,8 % čistota) sa rozpustil v 2 % roztoku Tween 20 (Bio-Rad kat. č. 170-6531) vo fosfátovom pufrí (0,001 M, pH 7,4) a sonifikoval 60 minút pri 50 °C. Roztoky liečiva sa pripravili tesne pred podaním CBD sa podávalo intraperitoneálne (ip) v dávkach 10 a 60 mg/kg.

Na stanovenie farmakokinetického profilu CBD boli zvieratá dekapitované v éterovej anestézii v piatich intervaloch (0,5, 1, 2, 4, 24 h) po podaní CBD. Každá skupina s dávkou a intervalom pozostávala zo 6 zvierat. Sérum a mozgy boli zozbierané, zmrazené v práškovom suchom ľade a udržiavané pri -80 °C až do analýzy.

4.3. Hodnotenie hladín CBD v plazme a mozgu

Kanabidol bol stanovený interne vyvinutou a overenou a certifikovanou metódou GC-MS (certifikované Policajným prezídiom ČR, č.j.: PPR-31123-7/CJ-2015-990530/evid.č.: 16/2015) . Celkom 10 µl roztoku deuterovaného CBD-d3 (5 ng/µl) vnútorného štandardu sa pridalo do každej 200 µl vzorky séra alebo mozgového metanolového homogenátu (5 ml). Na analýzu mozgu sa 1 g mozgového tkaniva homogenizoval v 5 ml metanolu. Homogenizované vzorky mozgu boli zmrazené pri -20 °C v etanolovom kúpeli počas 10 minút a potom centrifugované pri 4200 ot./min. počas 2 minút. Supernatant (4 ml) sa umiestnil do sklenenej skúmavky a odparil sa na 200 až 300 ul. Extrakty séra a mozgu sa zriedili 4 ml pufru octanu sodného s pH 4,0 (0,01 mol/l). Sérum a mozgový CBD boli extrahované pomocou SPE kolón (Bond-ELUT, 130 mg, Agilent Technologies) a eluované zmesou hexán/etylacetát (1:4v / v) a sušia sa pod prúdom dusíka v 400 ul sklenenej vložke umiestnenej v 1,5-litrovej sklenenej fľaštičke. Vzorky boli derivatizované so 100 ul N-metyl-N-(trimetylsilyl)trifluóracetamidom (MSTFA) počas 20 minút pri 80 °C. Kvantifikácia extrahovaného CBD sa uskutočnila pomocou plynovej chromatografie-hmotnostnej spektrometrie (GC-MS) (GC7860/5742C MSD, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) s použitím ionizácie nárazom elektrónov v

selektívnom iónovom režime (CBD: m / z 391; CBD-d3: m / z394). Rozsahy kalibračných kriviek boli pripravené pridaním hovädzieho séra bez liečiva alebo mozgového homogenátu potkana bez liečiva na analýzu séra a mozgu v koncentráciách 2–100 ng/ml CBD, (ii) 100–1000 ng/ml CBD. Vzorky s prímiesou boli pretrepané na vortexe a ošetrené rovnako ako skutočné vzorky. Reálne vzorky boli zriedené, ak prekročili kalibračné rozsahy. Táto analytická metóda na stanovenie CBD v krvi a mozgovom tkanive bola použitá aj v našej predchádzajúcej práci [46]. Po komentári [47] k nášmu predchádzajúcemu článku [46], bola vykonaná opätovná analýza metódy a bola zistená variabilná konverzia CBD na THC na SPE kolónach v rozsahu 0–10 %. Na stanovenie akýchkoľvek hladín THC v meraných vzorkách sa do vzoriek pridal deuterovaný THC (THC-3d) a pripravili sa rovnaké kalibračné série ako pre CBD. Preto, ak sa vo vzorkách zistilo nejaké THC, pridali sa k hladinám CBD a vyjadрили sa ako CBD. Limity detekcie (LOD) a kvantifikácie (LOQ) boli 1 ng/ml a 2 ng/ml.

4.4. Antikonvulzívne účinky CBD

Na hodnotenie antikonvulzívneho potenciálu CBD sa použili dva modely chemicky vyvolaných kŕčov – PTZ model a NMDA model. Pretože meranie hladín CBD v mozgu ukázalo, že v mozgu sa maximálne hladiny CBD dosahujú 1–2 hodiny po podaní CBD ip, zvieratá boli vopred ošetrené CBD 60 minút pred podaním chemokonvulzív. Pred začiatkom experimentu sa použila jednoduchá randomizácia na priradenie každého potkana do konkrétnej liečebnej skupiny. Po podaní CBD boli mláďatá vrátené svojim matkám. Bezprostredne pred podaním chemokonvulzív sa zvieratá jednotlivito umiestnili do klietok z plexiskla s kontrolovanou teplotou 34 ± 2 °C. Ich správanie bolo sledované na kŕče počas 30 minút skúseným pozorovateľom zaslepeným voči liečbe.

4.4.1. Model PTZ

Ďalšie skupiny zvierat sa použili na hodnotenie antikonvulzívnych účinkov CBD v modeli PTZ. PTZ (Sigma, kat. č. P6500) bol injikovaný subkutánne v dávke 100 mg/kg [48]. Po injekcii PTZ bola zaznamenaná incidencia a latencia generalizovaných tonicko-klonických záchvatov (GTCS), počnúc krátkou fázou a sprevádzaná stratou vzpriamovacích reflexov. Výskyt tonickej fázy sa registroval samostatne. Vzor tonickej fázy na predných končatinách sa ďalej analyzoval a počet zvierat vykazujúcich iba tonickú flexiu alebo tonickú flexiu nasledovanú extenziou sa registroval samostatne. Na posúdenie závažnosti epileptických javov bolo zvieratám priradené skóre pre najzávažnejšie behaviorálne charakteristiky takto [49]:

0 = žiadne zmeny

0,5 = abnormálne správanie (napr. automatizmy, zvýšená orientačná reakcia)

1 = izolované myoklonické záškľby

2 = atypické alebo neúplné minimálne záchvaty

3 = minimálne záchvaty

4 = generalizované záchvaty bez tonickej fázy, GCS

5 = úplné generalizované tonicko-klonické záchvaty, GTCS

Kontrolná skupina pozostávala z 10 zvierat, každá skupina liečená CBD mala 8 zvierat. Úmrtnosť bola zaznamenaná počas 30 minútového obdobia pozorovania.

4.4.2. Model NMDA

Na hodnotenie účinkov CBD v tomto modeli sa použili ďalšie skupiny zvierat. Záchvaty boli vyvolané N-metyl-D-aspartátom (NMDA; Sigma, St. Louis, MO, USA) rozpusteným v 0,01 PBS, pH 7,4 (60 mg/5 ml) injikovaným intraperitoneálne v dávke 60 mg/kg [22] . Kontroly dostali fyziologický roztok namiesto CBD. V tomto experimente bolo CBD podané iba v jednej dávke 60 mg/kg, čo bolo účinné v PTZ-teste. Kontrolná skupina pozostávala z 12 zvierat a skupina CBD 60 mg/kg pozostávala zo 6 zvierat.

Hodnotili sa tieto typy motorických záchvatov:

Flekčné záchvaty (FS), tj flexia celého tela, hlavne tonická (tj emprostotonus), so stratou vzpriamovacích reflexov (podrobnosti [22 , 29]).

Klonicko-tonické záchvaty (CTS) sa objavili po flexných záchvatoch. Vzor generalizovaných klonicko-tonických záchvatov sa ďalej analyzoval, pokiaľ ide o prítomnosť a distribúciu tonickej fázy.

Okrem výskytu jednotlivých typov záchvatov sa do 30 minút po podaní NMDA registrovala aj latencia do nástupu záchvatov a letálny výsledok.

4.5. Účinky CBD na výkon motora

Účinky CBD na motorické schopnosti a ich rozvoj boli testované pomocou testu vzpriamovacieho reflexu a testu držania tyče. Zvieratá v skupinách CBD navrhnutých pre 24-hodinový interval vo farmakokinetickej štúdii (6 zvierat na každú skupinu) boli testované na posúdenie akútnych účinkov na motorickú výkonnosť a tiež na zistenie možných účinkov expozície jednej dávke na normálny vývoj motorických schopností. Kontrolná skupina pozostávala z 9 zvierat. Zvieratá boli testované v troch sedeniach v troch časových intervaloch: prvýkrát pred podaním CBD (interval 0 h), potom o 1 h neskôr (interval 1 h) a naposledy pred usmrtením, tj 24 h po podaní CBD (interval 24 hodín).

4.5.1. Vzpriamovacie reflexy

Šteniatka sa umiestnili na chrbát na dosku stola a držali sa v polohe 5 sekúnd. Meral sa čas, za ktorý sa šteniatko vráti do polohy na bruchu. V každej testovacej relácii sa test vždy opakoval trikrát a vypočítal sa priemerný čas vzpriamenia.

4.5.2. Držanie baru

Potkany boli držané tak, že ich predné končatiny sa dotýkali 25 cm dlhej drevenej tyče pretiahnutej medzi dve tyče vysoké 50 cm. Latencia pádu bola zaznamenaná až do 120 s.

4.6. Štatistické analýzy

Veľkosť vzorky bola stanovená vopred na základe predchádzajúcich skúseností a podľa princípov troch R (Replacement, Reduction and Refinement; <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs> (prístup 13. decembra 2021)). Na začiatku experimentu boli jednotlivé zvieratá náhodne pridelené do konkrétnej liečebnej skupiny. Všetko úsilie bolo vynaložené na minimalizáciu počtu použitých zvierat a ich utrpenia.

Prospektívne boli vybrané výsledky merania a štatistické testy. Na začiatku štúdie sa použila jednoduchá randomizácia na priradenie každého zvieraťa do konkrétnej liečebnej skupiny. Zber údajov a analýza sa uskutočňovali bez liečby. Údaje sa analyzovali pomocou softvéru GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Pomocou D'Agostino-Pearsonovho testu normality sa všetky súbory údajov najskôr analyzovali, aby sa určilo, či boli hodnoty odvodené z Gaussovho rozdelenia. Súbory údajov, ktoré nespĺňali prísne kritériá normality, boli analyzované pomocou Kruskal-Wallisovho testu. Na identifikáciu hlavného účinku CBD sa použili jednosmerná ANOVA a dvojcestná ANOVA s opakovaným meraním. Za prítomnosti významného hlavného účinku, ale bez interakcie medzi faktormi, sa zvažovali jednoduché účinky. Kedykoľvek bola identifikovaná významná interakcia, údaje boli podrobené Tukeyho post-hoc testu. Rozdiely medzi dvoma skupinami (model NMDA) sa analyzovali pomocou Mann-Whitneyho testu, pretože súbory údajov nespĺňali prísne kritériá normality. Výskyt jednotlivých záchvatových javov a úmrtnosť sa porovnávali najskôr s χ^2 test na trendy a následne kontrolné a jednotlivé dávkové skupiny boli analyzované pomocou Fisherovho exaktného testu. Latencia strávená na tyči v teste držania tyče sa porovnávala s použitím dvojcestnej ANOVA RM, viacnásobné porovnanie pomocou kontroly miery falošného objavovania (FDR). Pretože niektoré hodnoty chýbali, rozdiely medzi koncentraciami CBD v mozgu a sére sa porovnávali pomocou analýzy so zmiešaným účinkom. Maximálna koncentrácia CBD bola hodnotená pomocou Area Under Curve (AUC). Pre významnosť bola potrebná hodnota $p < 0,05$ a $q < 0,05$ sa považovalo za objav.

5. Záver

Spoločne je protizáchvatová aktivita CBD závislá od modelu u malých zvierat. V dávkach potláčajúcich záchvaty CBD nezhoršuje motorické schopnosti, ale môže zhoršiť schopnosti učenia v ranom štádiu vývoja a toto potenciálne riziko by sa malo ďalej analyzovať.

Referencie

1. Alexander S.P.H. Therapeutic potential of cannabis-related drugs. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2016;64:157–166. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.07.001. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Bhattacharyya S., Morrison P.D., Fusar-Poli P., Martin-Santos R., Borgwardt S., Wintonbrown T.T., Nosarti C., Carroll C.M.O., Seal M.L., Allen P., et al. Opposite effects of δ -9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:764–774. doi: 10.1038/npp.2009.184. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Englund A., Morrison P.D., Nottage J.F., Hague D., Kane F., Bonaccorso S., Stone J.M., Reichenberg A., Brenneisen R., Holt D., et al. Cannabidiol inhibits THC-elicited paranoid symptoms and hippocampal-dependent memory impairment. *J. Psychopharmacol.* 2013;27:19–27. doi: 10.1177/0269881112460109. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Hayakawa K., Mishima K., Fujiwara M. Therapeutic Potential of Non-Psychotropic Cannabidiol in Ischemic Stroke. *Pharmaceuticals*. 2010;3:2197–2212. doi: 10.3390/ph3072197. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. McGuire P., Robson P., Cubala W., Vasile D., Morrison P.D., Barron R., Taylor A., Wright S. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. *Am. J. Psychiatry*. 2018;175:225–231. doi: 10.1176/appi.ajp.2017.17030325. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Resstel L.B.M., Joca S.R.L., Moreira F.A., Correa F.M.A., Guimaraes F.S. Effects of cannabidiol and diazepam on behavioral and cardiovascular responses induced by contextual conditioned fear in rats. *Behav. Brain Res.* 2006;172:294–298. doi: 10.1016/j.bbr.2006.05.016. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Schiavon A.P., Bonato J.M., Milani H., Guimaraes F.S., de Oliveira R.M.W. Influence of single and repeated cannabidiol administration on emotional behavior and markers of cell proliferation and neurogenesis in non-stressed mice. *Prog. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2016;64:27–34. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.06.017. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Devinsky O., Cross H., Laux L., Marsh E., Miller I., Nabbout R., Scheffer I., Thiele E.A., Wright S. Trial of Cannabidiol for Drug-Resistant Seizures in the Dravet Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2017;376:2011–2020. doi: 10.1056/NEJMoa1611618. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Devinsky O., Patel A.D., Cross H., Villanueva V., Wirrell E.C., Privitera M., Greenwood S.M., Roberts C., Checketts D., VanLandingham K.E., et al. Effect of Cannabidiol on Drop Seizures in the Lennox–Gastaut Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2018;378:1888–1897. doi: 10.1056/NEJMoa1714631. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Corroon J., Kight R. Regulatory Status of Cannabidiol in the United States: A Perspective. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2018;3:190–194. doi: 10.1089/can.2018.0030. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. Izquierdo I., Tannhauser M. Letter: The effect of cannabidiol on maximal electroshock seizures in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1973;25:916–917. doi: 10.1111/j.2042-7158.1973.tb09976.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

12. Chesher G.B., Dahl C.J., Everingham M., Jackson D.M., Marchant-Williams H., Starmer G.A. The effect of cannabinoids on intestinal motility and their antinociceptive effect in mice. *Br. J. Pharmacol.* 1973;49:588–594. doi: 10.1111/j.1476-5381.1973.tb08534.x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
13. Franco V., Perucca E. Pharmacological and Therapeutic Properties of Cannabidiol for Epilepsy. *Drugs.* 2019;79:1435–1454. doi: 10.1007/s40265-019-01171-4. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
14. Franco V., Bialer M., Perucca E. Cannabidiol in the treatment of epilepsy: Current evidence and perspectives for further research. *Neuropharmacology.* 2021;185:108442. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108442. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
15. Rosenberg E.C., Tsien R.W., Whalley B.J., Devinsky O. Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2015;12:747–768. doi: 10.1007/s13311-015-0375-5. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
16. Senn L., Cannazza G., Biagini G. Receptors and channels possibly mediating the effects of phytocannabinoids on seizures and epilepsy. *Pharmaceuticals.* 2020;13:174. doi: 10.3390/ph13080174. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
17. Benn E.K., Hauser W.A., Shih T., Leary L., Bagiella E., Dayan P., Green R., Andrews H., Thurman D.J., Hesdorffer D.C. Estimating the incidence of first unprovoked seizure and newly diagnosed epilepsy in the low-income urban community of Northern Manhattan, New York City. *Epilepsia.* 2008;49:1431–1439. doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01564.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
18. Cowan L.D. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 2002;8:171–181. doi: 10.1002/mrdd.10035. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
19. Clancy B., Darlington R.B., Finlay B.L. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience.* 2001;105:7–17. doi: 10.1016/S0306-4522(01)00171-3. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
20. Workman A.D., Charvet C.J., Clancy B., Darlington R.B., Finlay B.L. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J. Neurosci.* 2013;33:7368–7383. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
21. Ellingson R.J. Studies of the Electrical Activity of the Developing Human Brain. *Prog. Brain Res.* 1964;9:26–53. doi: 10.1016/S0079-6123(08)63130-1. [CrossRef] [Google Scholar]
22. Mares P., Velisek L. N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced seizures in developing rats. *Dev. Brain Res.* 1992;65:185–189. doi: 10.1016/0165-3806(92)90178-Y. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
23. Klein B.D., Jacobson C.A., Metcalf C.S., Smith M.D., Wilcox K.S., Hampson A.J., Kehne J.H. Evaluation of Cannabidiol in Animal Seizure Models by the Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP) *Neurochem. Res.* 2017;42:1939–1948. doi: 10.1007/s11064-017-2287-8. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
24. Huizenga M.N., Sepulveda-Rodriguez A., Forcelli P.A. Preclinical safety and efficacy of cannabidivarin for early life seizures. *Neuropharmacology.* 2019;148:189–198. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.01.002. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
25. Staňková L., Kubová H., Mareš P. Anticonvulsant action of lamotrigine during ontogenesis in rats. *Epilepsy Res.* 1992;13:17–22. doi: 10.1016/0920-1211(92)90003-C. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

26. Kubová H., Maresš P. Anticonvulsant Action of Oxcarbazepine, Hydroxycarbamazepine, and Carbamazepine Against Metrazol-Induced Motor Seizures in Developing Rats. *Epilepsia*. 1993;34:188–192. doi: 10.1111/j.1528-1157.1993.tb02397.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
27. Haugvicová R., Kubová H., Mareš P. Qualitative changes of anticonvulsant action of felbamate during development in rats. *Brain Dev.* 1998;20:222–226. doi: 10.1016/S0387-7604(98)00030-8. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Löscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*. 2011;20:359–368. doi: 10.1016/j.seizure.2011.01.003. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
29. Kabova R., Liptakova S., Slamberova R., Pometlova M., Velisek L. Age-specific N-methyl-D-aspartate-induced seizures: Perspectives for the West syndrome model. *Epilepsia*. 1999;40:1357–1369. doi: 10.1111/j.1528-1157.1999.tb02006.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
30. Herlopian A., Hess E.J., Barnett J., Geffrey A.L., Pollack S.F., Skirvin L., Bruno P., Sourbron J., Thiele E.A. Cannabidiol in treatment of refractory epileptic spasms: An open-label study. *Epilepsy Behav.* 2020;106:106988. doi: 10.1016/j.yebeh.2020.106988. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
31. Rodríguez-Muñoz M., Onetti Y., Cortés-Montero E., Garzón J., Sánchez-Blázquez P. Cannabidiol enhances morphine antinociception, diminishes NMDA-mediated seizures and reduces stroke damage via the sigma 1 receptor 11 *Medical and Health Sciences* 1109 *Neurosciences* 11 *Medical and Health Sciences* 1115 *Pharmacology and Pharmaceutical Scien. Mol. Brain*. 2018;11:1–12. doi: 10.1186/s13041-018-0395-2. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
32. Macdonald R.L., Barker J.L. Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: A common mode of convulsant action. *Neurology*. 1978;28:325–330. doi: 10.1212/WNL.28.4.325. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
33. Kubová H., Folbergrová J., Mares P. Seizures induced by homocysteine in rats during ontogenesis. *Epilepsia*. 1995;36:750–756. doi: 10.1111/j.1528-1157.1995.tb01611.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
34. Mares P., Folbergrová J., Langmeier M., Haugvicová R., Kubová H. Convulsant action of D,L-homocysteic acid and its stereoisomers in immature rats. *Epilepsia*. 1997;38:767–776. doi: 10.1111/j.1528-1157.1997.tb01463.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
35. Insel T.R., Miller L.P., Gelhard R.E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain—I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience*. 1990;35:31–43. doi: 10.1016/0306-4522(90)90117-m. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
36. Tsumoto T., Hagihara K., Sato H., Hata Y. NMDA receptors in the visual cortex of young kittens are more effective than those of adult cats. *Nature*. 1987;327:513–514. doi: 10.1038/327513a0. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
37. Hamon B., Heinemann U. Developmental changes in neuronal sensitivity to excitatory amino acids in area CA1 of the rat hippocampus. *Brain Res.* 1988;466:286–290. doi: 10.1016/0165-3806(88)90054-5. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
38. Kubová H. Ontogenesis and treatment efficacy: Prevention of seizures in the immature brain. *Adv. Neurol.* 1999;81:357–361. [PubMed] [Google Scholar]

39. Kubová H., Mares P. Vigabatrin but not valproate prevents development of age-specific flexion seizures induced by N-methyl-D-aspartate (NMDA) in immature rats. *Epilepsia*. 2010;51:469–472. doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02305.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
40. Bittigau P., Sifringer M., Genz K., Reith E., Pospischil D., Govindarajalu S., Dzierko M., Pesditschek S., Mai I., Dikranian K., et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002;99:15089–15094. doi: 10.1073/pnas.222550499. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
41. Ikonomidou C., Turski L. Antiepileptic drugs and brain development. *Epilepsy Res*. 2010;88:11–22. doi: 10.1016/j.eplesyres.2009.09.019. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
42. Altman J., Sudarshan K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav*. 1975;23:896–920. doi: 10.1016/0003-3472(75)90114-1. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
43. Jänicke B., Schulze G., Coper H. Motor performance achievements in rats of different ages. *Exp. Gerontol*. 1983;18:393–407. doi: 10.1016/0531-5565(83)90018-9. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
44. Deiana S., Watanabe A., Yamasaki Y., Amada N., Arthur M., Fleming S., Woodcock H., Dorward P., Pigliacampo B., Close S., et al. Plasma and brain pharmacokinetic profile of cannabidiol (CBD), cannabidivarin (CBDV), Δ 9-tetrahydrocannabivarin (THCV) and cannabigerol (CBG) in rats and mice following oral and intraperitoneal administration and CBD action on obsessive-compulsive behavior. *Psychopharmacology*. 2012;219:859–873. doi: 10.1007/s00213-011-2415-0. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
45. McPhail B.T., White C.A., Cummings B.S., Muralidhara S., Wilson J.T., Bruckner J.V. The immature rat as a potential model for chemical risks to children: Ontogeny of selected hepatic P450s. *Chem. Biol. Interact*. 2016;256:167–177. doi: 10.1016/j.cbi.2016.07.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
46. Hložek T., Uttl L., Kadeřábek L., Balíková M., Lhotková E., Horsley R.R., Nováková P., Šichová K., Štefková K., Tylš F., et al. Pharmacokinetic and behavioural profile of THC, CBD, and THC + CBD combination after pulmonary, oral, and subcutaneous administration in rats and confirmation of conversion in vivo of CBD to THC. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2017;27:1223–1237. doi: 10.1016/j.euroneuro.2017.10.037. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
47. Vacek J., Papouskova B., Polanska H., Hönigova K., Storch J., Babula P., Masarik M. CBD is not converted to THC in rats: A framework interpretation and discussion. *Eur. Neuropsychopharmacol*. 2021;50:135–136. doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.04.003. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
48. Velisek L., Kubova H., Pohl M., Stankova L., Mareš P., Schickerova R. Pentylentetrazol-induced seizures in rats: An ontogenetic study. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 1992;346:588–591. doi: 10.1007/BF00169017. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
49. Pohl M., Mares P. Effects of flunarizine on Metrazol-induced seizures in developing rats. *Epilepsy Res*. 1987;1:302–305. doi: 10.1016/0920-1211(87)90006-4. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]