

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmakologie a toxikologie

Interakce MRP2 transportéru s vybranými
antiepileptiky.

Diplomová práce

Za pomoc a konzultace při vypracování své diplomové práce velmi děkuji panu PharmDr. Petrovi Pávkovi, Ph.D. z Katedry farmakologie a toxikologie.

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně za použití literatury uvedené v seznamu.

Obsah

OBSAH	3
1. ÚVOD DO KLINICKÉHO PROBLÉMU FARMAKOREZISTENCE U EPILEPSIE	4
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	5
3. OBECNÁ ČÁST	6
3.1 ÚVOD DO MECHANIZMU FARMAKOREZISTENCE NA BUNĚČNÉ ÚROVNI	6
3.1.1 <i>Modifikace cílových struktur pro léčiva jako základ farmakorezistence</i>	6
3.1.1.1 Změny v molekulárních cílových strukturách pro antiepileptika – iontové kanály	8
3.1.1.2 Systémy neurotransmise: GABA	11
3.1.1.3 Systémy neurotransmise: glutamát	13
3.1.2 <i>Modifikace transportérů jako základ farmakorezistence</i>	13
3.1.2.1 Hematoencefalická a hematolikvorová bariéra a multidrug transportéry	14
3.1.2.2 ABC transportéry	16
3.1.2.3 Modifikace ABC transportérů jako základ farmakorezistence u epilepsie	17
3.2 MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 2 (MRP2)	26
3.3 INTERAKCE ANTIPILEPTIK S MRP2 TRANSPORTÉREM	31
3.3.1 <i>Interakce MPR2 transportéru s antiepileptiky na in vitro úrovni</i>	31
3.3.2 <i>Interakce MPR2 transportéru s antiepileptiky na in vivo úrovni</i>	32
4. DISKUZE A ZÁVĚR	35
5. ABSTRAKTY	37
5.1 INTERAKCE MRP2 TRANSPORTÉRU S VYBRANÝMI ANTIPILEPTIKY	37
5.2 INTERACTIONS OF THE MRP2 TRANSPORTER WITH SELECTED ANTI-EPILEPTIC DRUGS	38
6. LITERATURA	39
7. SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	45

1. Úvod do klinického problému farmakorezistence u epilepsie

Epilepsie je časté devastující neurologické onemocnění, charakterizované opakovaným výskytem epileptických záchvatů. Postihuje přibližně 1-2% populace. U mnohých pacientů postižených epilepsií jsou záchvaty účinně kontrolovány v současnosti dostupnými antiepileptiky (AED – anti-epileptic drugs). U značného množství pacientů však záchvaty přetrvávají. Přesnější procentuální vyjádření zastoupení těchto pacientů mezi pacienty s epilepsií se v literatuře liší hlavně kvůli nejednotným kritériím pro klasifikaci pacienta jako farmakorezistentního (kolik antiepileptik musí být vyzkoušeno, nežli je pacient klasifikován jako farmakorezistentní, jak dlouho musí být neúspěšně léčen, do jaké míry jsou akceptovány nežádoucí účinky). Navzdory tomu se uvádí, že značná část (přibližně 30%) epileptických pacientů nereaguje na léčbu antiepileptiky první linie, i přes podávání léčiv v optimalizovaném a dobře monitorovaném režimu (Regesta a Tanganelli, 1999). Zdá se, že procentuální množství farmakorezistentních pacientů koreluje s určitými klinickými a biologickými znaky nemoci, jako jsou vysoká frekvence záchvatů, horečnaté záchvaty před zahájením léčby, časný nástup záchvatů nebo přítomnost určitých typů mozkových lézí. Kromě toho se rezistence také často vyskytuje u pacientů s částečnými záchvaty. Navzdory značné klinické závažnosti nekontrolovaných záchvatů u velkého množství pacientů, buněčná podstata této farmakorezistence nadále zůstává nevysvětlena. Dostupnost vzorků tkání epileptogenních ložisek od pacientů podstupujících chirurgické zákroky u ohniskových epilepsií, především u epilepsie temporálního laloku (TLE – temporal lobe epilepsy), dovoluje odhalit některé mechanismy skrývající se za farmakorezistencí u ohniskových epilepsií. Mechanizmy způsobující farmakorezistenci u některých forem generalizovaných epilepsií zůstávají nadále neobjasněny (Remy a Beck, 2005).

2. Cíl diplomové práce

Cílem této rešeršní diplomové práce je shrnout současné poznatky o interakcích klinicky významných antiepileptik s transportéry ABC rodiny. Zvláštní důraz bude kladen především na Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) a jeho interakce a ovlivnění klinicky relevantními antiepileptiky.

Tato rešeršní diplomová práce je součástí výzkumného směru skupiny PharmDr. Petra Pávka, Ph.D., s cílem studovat interakce antiepileptik s ABC transportéry při predikci významnosti těchto transportérů při vzniku rezistentních forem epilepsie. Informace obsažené v této diplomové práci by proto měly přinést informace o aktuálním stavu poznání na poli farmakorezistentní epilepsie a pomoci při směřování dalších výzkumných aktivit této skupiny.

Nejnovější vědecké poznatky v dané problematice budou vyhledávány v elektronických databázích Medline a ScienceDirect.

3. Obecná část

3.1 Úvod do mechanismu farmakorezistence na buněčné úrovni

V současnosti bylo identifikováno několik předpokládaných neurobiologických mechanismů odpovědných za farmakorezistenci u epilepsie. Na poznacích o těchto mechanismech určujících účinnost léčiv působících na CNS (centrální nervový systém) byly založeny dvě hlavní teorie.

Za prvé, za přítomnosti adekvátních, pečlivě monitorovaných hladin léčiv musí tyto léčiva prostoupit hematoencefalickou bariérou (HEB). Aktivita AED v CNS je pak určena množstvím faktorů, zahrnující fyzikální vlastnosti jako lipofilita, které ovlivňují jejich distribuci do různých kompartmentů CNS. Prvním z možných scénářů pro vysvětlení farmakorezistence může být nedosažení dostatečných intraparenchymálních hladin AED navzdory jejich adekvátním hladinám v séru. Tento fenomén pravděpodobně nastává kvůli zvýšené expresi (a tedy aktivitě) multidrug transportérů, které omezují uptake AED do mozku a tedy kontrolují jejich intraparenchymální hladiny. Tato teorie byla nazvána transportérová hypotéza farmakorezistence.

Po přestupu do parenchymu CNS se musí léčiva navázat na jednu nebo více cílových molekul, aby uplatnila svůj žádaný účinek. Rezistence může být taktéž způsobena změnou jedné nebo více cílových molekul. Tyto změny pak způsobují zmenšení účinnosti léčiva na danou cílovou strukturu. Tento koncept byl nazván hypotéza cílových struktur u farmakorezistence.

Tyto hypotézy se vzájemně nevylučují a je možný jejich výskyt u jednoho pacienta. Farmakorezistence u epilepsie je samozřejmě multifaktoriálním fenoménem a z tohoto důvodu tyto dvě teorie nemohou poskytnout úplné vysvětlení její existence, jsou však v současné době nejakceptovanější a proto se o nich nyní zmíním detailněji.

3.1.1 Modifikace cílových struktur pro léčiva jako základ farmakorezistence

Aby léčivo prokázalo antiepileptickou aktivitu musí účinkovat na jednu nebo více molekulárních cílových struktur v mozku. Mezi tyto struktury patří iontové kanály, receptory pro neurotransmitery a transportéry nebo metabolické enzymy účastníci se na uvolňování, zpětném vychytávání a metabolismu neurotransmiterů. Podle specifických cílových struktur, na které jednotlivé AED působí, se mohou antiepileptika rozdělit na

léčiva účinkující modulací napětím řízených iontových kanálů (sodíkové, vápníkové a draslíkové kanály), zesílením inhibice na synapsích (například potenciací inhibice zprostředkované gama-aminomáselnou kyselinou – GABA) nebo inhibicí excitace na synapsích (Rogawski a Löscher, 2004). Jednotlivé léčiva často působí více než jedním z těchto mechanismů, což pravděpodobně vysvětluje široké spektrum jejich klinické účinnosti (viz Tabulka 1). Tento koncept nicméně nebere v úvahu důležité farmakologické a klinické rozdíly mezi jednotlivými AED, které nemohou být vysvětleny čistě na základě mechanismů popsaných výše.

Tabulka 1: *Současná antiepileptika a cílové struktury, přes které pravděpodobně uplatňují svůj terapeutický účinek při léčbě epilepsie*

Léčiva	Cílové struktury AED			Klinický účinek AED			
	Na ⁺ Kanály	Ca ²⁺ Kanály	GABA systém	Glutamátové receptory	Parciální záchvaty	Myoklonické záchvaty	Záchvaty s absencemi
Převládající účinek na napětím řízené iontové kanály							
Karbamazepin	I _{Nat}	HVA			+	-	-
Ethosuximid	I _{NaP?}	T-tyt			-	-	+
Lamotrigin	I _{Nat}	HVA			+	+	+
Oxkarbazepin	I _{Nat}	HVA			+	-	-
Fenytoin	I _{Nat} I _{NaP}	HVA			+	-	-
Pregabalin		HVA (α2δ)			+	-	-
Zonisamid	I _{Nat}	T-tyt			+	-	+
Převládající účinek na mechanismy zprostředkované GABA							
Benzodiazepiny			GABA _A R		+	+	+
Tiagabin			GABA-transportér↓		+	-	-
Vigabatrin			GABA-T↓		+	-	-
Koplexní účinky							
Felbamát	I _{Nat}	HVA	GABA _A R	NMDA	+	-	+
Gabapentin		HVA (α2δ)	GABA obrat↑		+	-	-
Levetiracetam		HVA			+	?	?
Topiramát	I _{Nat} I _{NaP}	HVA	GABA _A R	AMPA	+	+	+
Fenobarbital		HVA	GABA _A R	AMPA	+	+	-
Valproát	I _{Nat?} I _{NaP}	T-tyt?	GABA obrat↑	NMDA	+	+	+

HVA - high voltage-activated (vysokoprahové kanály)

GABA_AR - GABA_A receptor

Převzato z Schmidt a Löscher, 2005

Mechanismus působení AED na molekulární úrovni byl do určité míry zkoumán na normální mozkové tkáni, nebo na iontových kanálech a receptorech systémů *in vitro*. Mnohé z těchto cílových struktur jsou u epilepsie pozměněné na molekulární úrovni (Remy a Beck, 2005).

3.1.1.1 Změny v molekulárních cílových strukturách pro antiepileptika – iontové kanály

V následující části se pokusím stručně sumarizovat poznané mechanismy působení AED na iontových kanálech. Zaměřím se na objevující se experimentální důkazy podporující teorii ztráty účinku AED u vybraných cílových struktur a rozeberu molekulární podstatu farmakorezistence v souvislosti s iontovými kanály.

Napětím řízené Na⁺ kanály

Napětím řízené Na⁺ kanály se vyskytují u excitabilních buněk a jsou cílovými strukturami pro mnohé AED první linie. Při depolarizaci membrány se kanály aktivují a vzniká rychlý „přechodný“ proud Na⁺ iontů (I_{NaT} , T = transient = přechodný) dovnitř buňky odpovědný za rostoucí fázi akčního potenciálu a v některých buňkách pomalu se aktivující „trvalý“ proud (I_{NaP} , P = persistent = trvalý). Oba tyto komponenty proudu Na⁺ iontů představují hlavní cíle pro mnohé AED první linie včetně karbamazepinu, fenytoinu, lamotriginu a valproátu (Ragsdale a Avoli, 1998).

Hypotéza cílových struktur je založena hlavně na studiích účinku AED karbamazepinu na I_{NaT} v neuronech hipokampu. Primární mechanismus tohoto antiepileptika je dobře prozkoumán a zdá se, že spočívá v jeho účinku na I_{NaT} , který úzce souvisí s vývojem neuronální aktivity u záchvatů. Karbamazepin (stejně tak fenytoin, lamotrigin nebo další AED účinkující na Na⁺ kanály) má na tyto iontové kanály několik vzájemně se doplňujících efektů. Za prvé, snižuje maximální velikost proudu Na⁺ iontů. Za druhé, posouvá schopnost inaktivace kanálů v závislosti na napětí směrem k hyperpolarizaci. Tento posun snižuje přístupnost Na⁺ kanálů během akčního potenciálu a tím snižuje excitabilitu buňky. A za třetí, zpomaluje *recovery* ze stavu inaktivace kanálů. Tento poslední mechanismus může být zvláště důležitý pro léčbu epilepsie, protože preferenčně způsobuje snížení dostupnosti Na⁺ kanálů během neuronální aktivity s vysokou frekvencí výbojů, jaká se vyskytuje u záchvatů (Rogawski a Löscher, 2004).

Několik linií důkazů naznačuje, že snížená efektivita inhibice Na⁺ kanálů může být možným mechanismem farmakorezistence k některým AED. Za prvé, účinek karbamazepinu na schopnosti inaktivace kanálů v CA1 neuronech byl přechodně snížený u „kindling“ modelu epilepsie. Na rozdíl od těchto skromných a dočasných účinků, u pilokarpinového modelu epilepsie v hipokampálních zoubkovaných (dentate) zrnitých buňkách a taktéž u epileptických pacientů s epilepsií temporálního laloku resistantní ke

karbamazepinu byla nalezena kompletní a dlouhotrvající ztráta blokujícího efektu karbamazepinu. Tato dramatická ztráta hlavního mechanismu účinku karbamazepinu se však nerozšířila na účinek jiných AED ovlivňujících Na⁺ kanály. Po pilokarpinem indukovaném *status epilepticus* došlo k redukci účinku fenytoinu, ne však k jeho úplné ztrátě, zatímco účinky lamotriginu zůstaly kompletně nezměněné. Souhrnně tyto výsledky naznačují, že epileptogeneze způsobuje změny ve vlastnostech I_{NaT}, které se mohou lišit v závislosti na typu zkoumaných buněk (zoubkaté zrnité buňky, CA1 neurony) a v závislosti na zkoumaném modelu epilepsie. Změny v I_{NaT} pak mohou způsobit dramatické změny v citlivosti na některé, ne však všechny, AED (Remy a Beck, 2005).

Jaký je vztah změn v citlivosti k AED na molekulární úrovni (úrovni iontových kanálů) k farmakorezistenci pozorované *in vivo*? U pacientů s epilepsií se při rozdělení do dvou skupin, jedni rezistentní ke karbamazepinu a druhá menší skupina s epilepsií citlivou ke karbamazepinu, zdá, že vlastnosti I_{NaT} se u obou skupin liší. U první skupiny byla dokázána ztráta blokády I_{NaT}, podobně jako při nálezech u pilokarpinového modelu epilepsie. Na druhou stranu, pacienti citliví ke karbamazepinu vykazovali potenciální účinky látky na I_{NaT}, tedy citlivost ke karbamazepinu na buněčné úrovni, zdá se, koreluje s klinickou citlivostí k této látce. Tyto výsledky by měly být interpretovány s opatrností ze dvou důvodů. Za prvé, počet pacientů, u kterých mohla být sesbírána data z klinických studií i studií *in vitro* je dost limitován, obzvláště u skupiny responzivních pacientů (Remy a kol., 2003a). Za druhé, pacienti rezistentní ke karbamazepinu jsou velmi často rezistentní i k jiným antiepileptikům (Kwan a Brodie, 2000), ačkoliv dostupná data naznačují, že pozměněná citlivost Na⁺ kanálů nemusí nutně zodpovídat i za pozměněnou efektivitu těchto jiných AED (jako valproová kyselina nebo lamotrigin). Tento objev může značit, že rezistence k AED u pacientů s epilepsií je komplexním fenoménem, který pravděpodobně závisí na mnohých mechanismech, nejenom na změnách cílových struktur.

Jaké mechanismy mohou způsobit změněnou senzitivitu Na⁺ kanálů v epileptické tkáni? Většina mechanismů zapletených do změn cílových struktur pro AED jsou změny v transkripci podjednotek iontových kanálů. Zdá se, že záchvaty způsobují vysoko koordinované změny v transkripci určitých skupin podjednotek iontových kanálů u modelové epilepsie potkanů a také u lidských epileptických pacientů (Brooks-Kayal a kol., 1998, 1999). Tato plasticita transkripce indukovaná záchvaty se jeví být různě regulována u různých typů neuronů. Změny v transkripci s vysokou pravděpodobností

ovlivňují jak hustotu iontových kanálů v neuronální membráně, tak i stechiometrii podjednotek ve vícepodjednotkových komplexech kanálů. Jednou z možností je, že skladba podjednotek těchto kanálů je změněna tak, že je zvýšená exprese podjednotek nebo kombinací podjednotek necitlivých k AED. Byly pozorovány četné změny v expresi podjednotek Na⁺ kanálů u lidské i experimentální epilepsie (Aronica a kol., 2003). Kromě změn hladin mRNA byl pozorován i pozměněný alternativní sestřih mRNA kódujících podjednotky formující póry (Gastaldi a kol., 1997). Snížená exprese podpůrných β -podjednotek kanálů byla nalezena u několika modelů epilepsie. Lucas a kol. ve své nedávné studii (Lucas a kol., 2005) podtrhuje potenciální význam β 1-podjednotek pro vývoj farmakorezistence. Byla v ní studována farmakologie Na⁺ kanálů obsahujících mutovanou β 1-podjednotku pravděpodobně způsobující generalizovanou epilepsii s hořečnatými záchvaty. Na⁺ kanály obsahující tuto β 1-podjednotku vykazovaly dramatickou a selektivní ztrátu inhibičního účinku AED fenytoinu. Tyto výsledky naznačují, že změny v druhotných (accessory) podjednotkách mohou být slibnými kandidáty pro další výzkum na molekulární úrovni. Kromě transkripčních změn může záchvatová aktivita vyvolat také četné post-translační modifikace proteinů iontových kanálů, jako pozměněný transport proteinů, fosforylaci nebo glykosylaci. Jedna studie ukázala, že zvýšená fosforylace I_{Na} proteinkinázou C ovlivňuje odpověď na antiepileptikum topiramát (Curia, 2004). Je docela možné, že i jiné posttranskripční modifikace proteinů iontových kanálů vyvolané záchvaty mohou hluboko ovlivnit jejich citlivost k léčivům.

Jiné typy napětím řízených kanálů

Jiné typy napětím řízených kanálů představují také cílové struktury pro působení léčiv ze skupiny antiepileptik. V mnohých případech byly popsány účinky AED na specifické podjednotky iontových kanálů, nebo iontové kanály v nativních neuronech nebo systémech *in vitro*.

Ca²⁺ kanály mohou být rozděleny do dvou skupin: kanály s vysokým prahem a skupina nízkoprahových (též zvaných T-ty). U řady AED se zjistilo, že inhibují vysokoprahové Ca²⁺ kanály v nativních neuronech ve vysokých terapeutických koncentracích (Stefani a kol., 1997). U AED gabapentinu bylo zjištěno, že vykazuje silné a specifické schopnosti vázat se k druhotné $\alpha_2\delta$ podjednotce těchto kanálů. Byla navržena myšlenka, že tento efekt zodpovídá za inhibici presynaptických vysokoprahových kanálů gabapentinem, což způsobuje snížení uvolňování neurotransmiterů do synaptické šter-

biny. Některé AED potenciálně inhibují nízkoprahové Ca^{2+} kanály T-typu, které se nacházejí na postsynaptické membráně. Účinky AED na tři podjednotky Ca^{2+} kanálů T-typu *in vitro* a taktéž v nativních neuronech jsou různorodé. Kanály T-typu jsou kriticky důležité pro kontrolování vzrušivosti postsynaptického kompartmentu neuronů v zdravých i epileptických neuronech. Například v CA1 neuronech hipokampu epileptických zvířat můžeme nalézt výboje odchýlné od normálu, které jsou zprostředkovány zvýšenou expresí Ca^{2+} kanálů T-typu. Dále, kanály T-typu v thalamických neuronech byly zapleteny do vzniku výbojů u epilepsie s absencemi. Následně se zdá, že inhibice záchvatovitých výbojů v thalamických neuronech přispívá k antiepileptickým účinkům antiabsence AED. Doposud je neznámé, zda dochází ke změně citlivosti presynaptických i postsynaptických Ca^{2+} kanálů k AED během epileptogeneze. Totéž platí pro jiné napětím řízené iontové kanály jako například K^+ kanály (Remy a Beck, 2005).

H-proudy (I_H) jsou smíšené kationické proudy, které jsou aktivovány hyperpolarizací a deaktivovány následnou repolarizací membrány neuronu. I_H mají množství funkcí, kupříkladu, zprostředkovávají jisté formy pacemaker aktivity v srdci a mozku, regulují resistenci membrán a integraci dendritů a stabilizují hladinu klidového potenciálu. Zajímavou charakteristikou I_H je fakt, že tyto kanály jsou lokalizovány převážně v dendritech neuronů ne v jejich tělech. Zajímavým faktem je, že dendritické H-proudy jsou účinně zesílené pomocí AED lamotriginu a gabapentinu při klinicky významných koncentracích, což má za následek I_H zprostředkovaný inhibiční účinek na výboje akčních potenciálů tím, že je selektivně snížena vzrušivost apikálních dendritů. Byly popsány změny v I_H specifické pro určité typy buněk u různých modelů epilepsie, které by mohly být podstatou ztráty hlavního cílového místa účinku pro některé AED (kupříkladu lamotrigin) v určitých oblastech mozku (viz přehledový článek Remy a Beck, 2005).

3.1.1.2 Systémy neurotransmise: GABA

Kromě napětím řízených iontových kanálů existují další cílové struktury pro antiepileptika, které mohou být pozměněny u farmakorezistentní epilepsie. Inhibice zprostředkována neurotransmiterem GABA představuje důležitý cíl působení AED (Rogawski a Löscher, 2004).

GABA je hlavním inhibičním neurotransmiterem v dospělém lidském mozku a hraje rozhodující roli v regulaci excitability neuronálních sítí (Mody a Pearce, 2004). Když se molekula GABA naváže na ionotropní GABA receptor, dojde k otevření póru

receptoru, který je propustný pro Cl^- a do jisté míry rovněž pro HCO_3^- . V přítomnosti normálního transmembránového gradientu Cl^- iontů dochází ke vzniku inhibičního postsynaptického proudu, který hyperpolarizuje postsynaptickou membránu neuronu. Většina rychlé inhibiční neurotransmise v mozku je zprostředkována GABA receptory typu A (GABA_A) a právě změny ve funkci GABA_A receptorů pravděpodobně hrají roli v patologii některých psychiatrických onemocnění jako jsou epilepsie, úzkost, Alzheimerova nemoc a schizofrenie.

V CNS bylo nalezeno enormní množství poddruhů GABA_A receptorů, které odpovídá faktu, že v každém receptoru jsou přítomny minimálně tři podjednotky (nejčastěji alfa, beta a gama), které jsou odvozené z jedné z osmi strukturálně a geneticky odlišných rodin (Sperk a kol., 2004). Různé podtypy GABA_A receptorů se vzájemně liší kinetikou jejich kanálů, afinitou ke GABA, mírou snížení citlivosti k léčivům, umístěním v rámci buňky, distribucí v rámci organismu a farmakologií. Nejčastějším podtypem GABA_A receptorů je receptor tvořený podjednotkami alfa 1, beta 2 a gama 2. Právě tento podtyp receptorů do značné míry zprostředkovává antikonvulzní (protikřečový) účinek benzodiazepinů.

Látky, které přímo ovlivňují GABA_A receptory, zahrnují již zmiňované benzodiazepiny a barbituráty. Benzodiazepiny zvyšují afinitu receptorových komplexů ke GABA a mohou zesílit jejich vodivost pro Cl^- alosterickou modulací. Látky které interagují s GABA systémem nepřímým způsobem ovlivňují metabolismus a zacházení s GABA uvolněnou ze synapsí. Vigabatrin (gama-vinyl GABA) je analogem GABA, který inhibuje jeden z nejdůležitějších enzymů kontrolujících koncentraci GABA v mozku, GABA transaminázu. Následkem aplikace vigabatinu tedy dochází k velkým vzrůstům hladin GABA v mozku. AED tiagabin inhibuje transportér GABA s velkou afinitou (GAT1), který za normálních okolností ukončuje synaptickou aktivitu GABA rychlým zpětným *uptake* (Remy a Beck, 2005). Doposud získaná fakta naznačují, že u chronické experimentální epilepsie není pozměněná ani efektivita *uptake* GABA, ani citlivost transportérů k tiagabinu (Frahm a kol., 2003). Mezi látky účinkující skrz GABA receptory patří také antiepileptika, u kterých byly jako cílové struktury popsány taky iontové kanály (viz Tabulka 1).

Mnohé studie ukázaly, že epilepsie (klinická i experimentální) je spojena se změnami exprese podjednotek GABA_A receptorů a že tyto změny korelují s modifikacemi funkce a farmakologie receptorů (Coulter, 2001). Kombinované molekulární a funkční

studie naznačují, že u epileptických zvířat dochází ke zvratu v skladbě alfa podjednotek způsobenému změnou v transkripci. Konkrétně jde o pokles množství α_1 podjednotek a zvýšení počtu α_4 podjednotek. Tyto změny způsobují ztrátu citlivosti receptorů k benzodiazepinům a některým jejich agonistům. U agonistů GABA_A receptorů byl popsán pokles aktivity těchto látek u chronického modelu epilepsie. U pilokarpinového modelu epilepsie vykazují GABA_A receptory zoubkatých (dentate) buněk sníženou citlivost vůči látkám, jako zolpidem, působícím na benzodiazepinovém vazebném místě 1 GABA_A receptoru. Nejen změny v alfa podjednotce, ale jakékoliv změny v složení podjednotek GABA_A receptorů mohou mít dramatické důsledky pro účinnost antiepileptického působení benzodiazepinů, ale i jiných AED účinkujících skrze GABA_A receptor (Schmidt a Löscher, 2005).

3.1.1.3 Systémy neurotransmise: glutamát

Navzdory nepochybné důležitosti pozměněné excitační neurotransmise zprostředkované glutamátem u chronické experimentální a lidské epilepsie, bylo dosud vyvinuto jenom málo substancí pro klinické užití, které účinkují skrze tento systém. Felbamát vykazuje komplexní účinky na NMDA (N-methyl-D-aspartát) receptor, ze kterých některé mohou být zprostředkovány skrz modulační glycinové vazební místo. U některých účinků felbamátu bylo prokázáno jejich ovlivnění složení podjednotek NMDA receptoru. Zřídka jsou i AED účinkující na AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylizoxazol propionová kyselina) receptory. Některé účinné látky momentálně v klinických zkouškách vykazují inhibici AMPA receptorů. U topiramátu bylo tak dokázáno, že redukuje excitační synaptický přenos díky inhibici AMPA receptorů. Při budoucím vývoji substancí účinkujících na glutamátové receptory by měla být vzata v úvahu pozměněná buněčná exprese těchto receptorů u epilepsie (viz přehledový článek Remy a Beck, 2005).

3.1.2 Modifikace transportérů jako základ farmakorezistence

Aby mohla hypotéza cílových struktur představovat potenciální základ pro racionální strategii vývoje nových léčiv, musí být vyřešeny mnohé nesrovnalosti. Dále, fakt, že většina pacientů resistantních k léčbě jedním AED neodpovídá na léčbu širokou paletou jiných AED s odlišnými mechanismy účinku napovídá, že k farmakorezistenci k antiepileptikům musí přispívat i jiný, méně specifický mechanismus. V tomto ohledu

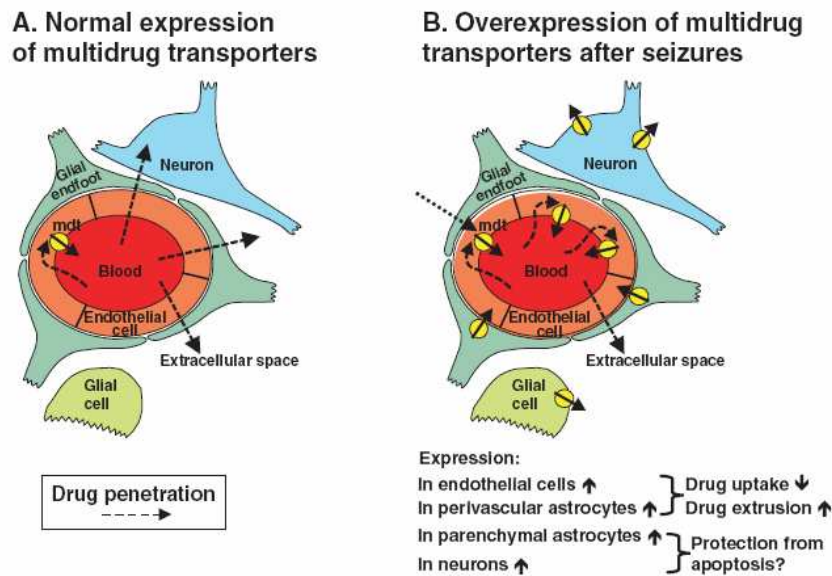
je popřední hypotézou hypotéza efluxních transportérů, která byla poprvé zkoumána u rakoviny rezistentní k chemoterapeutikům. V současnosti přitahuje rostoucí zájem jako možné vysvětlení farmakorezistence u epilepsie mechanismem redukce prostupu AED do mozku (Löscher, 2002).

3.1.2.1 Hematoencefalická a hematolivorová bariéra a multidrug transportéry

Aby mohla léčiva vstoupit do mozku, musí projít přes hematoencefalickou bariéru (HEB) nebo bariéru mezi krví a cerebrospinální tekutinou – likvorem (hematolivorovou bariéru – HLB). Tyto fyziologické bariéry představují specifické uspořádání kapilár a epitelů a jejich hlavní funkcí je regulace přestupu endogenních látek do CNS a zachování stálého vnitřního prostředí v mozku. Současně je omezený i vstup xenobiotik (Betz a kol., 1994).

Na rozdíl od endotelových buněk v jiných tkáních, ty které se nachází v kapilárách mozku a tvoří HEB jsou spojeny pomocí *zonulae occludentes* (*tight junctions* – těsné spoje), které prakticky vylučují paracelulární transport látek, chybí jim intercelulární póry nebo fenestrace a mají relativní nedostatek pinocytických vesikul. Charakteristická stavba endotelu kapilár v mozku má za následek, že se tato vrstva buněk chová jako souvislá fosfolipidová membrána, která do značné míry omezuje vstup hydrofilních, polárních a velkých sloučenin a sloučenin vázaných na bílkoviny, zatímco nepolární látky, vysoce rozpustné v lipidech (jako většina AED), prostupují HEB lehce pasivní difúzí. Endotel kapilár je obklopený extracelulární matrix obsahující kolagen neboli bazální membránou, která je obklopená pláštěm výběžků perivaskulárních astrocytů, které velmi těsně přiléhají k endoteliím mozkových kapilár i k sobě navzájem. Tyto výběžky pravděpodobně také přispívají k funkci HEB (Obr. 1) (Betz a kol., 1994; Löscher a Potschka, 2002).

Obr. 1: Transportérová hypotéza multidrug rezistence.



A: Schematické zobrazení endotelové buňky mozkové kapiláry, která tvoří HEB a role multidrug transportérů v transportu léčiv přes HEB. Lipofilní léčiva (většina AED) lehce penetrují přes HEB jednoduchou difúzí (přerušované šípky). Jako aktivní ochranný mechanismus HEB transportují multidrug transportéry (mdt), lokalizované na apikální straně endotelových buněk, lipofilní látky směrem ven z buněk zpět do krevního oběhu. Tím limitují jejich penetraci do mozkového parenchymu.

B: V epileptogenní mozkové tkáni dochází k zvýšení exprese multidrug transportérů v endotelových buňkách kapilár a astrocytech kolem kapilár. *Převzato ze Schmidt a Löscher, 2005*

Co se týče HLB, aby mohlo léčivo vniknout do cerebrospinnální tekutiny, musí projít skrz *plexus choroideus*. V *plexu choroideu* se bariéra pro vstup látek nachází na úrovni epitelových buněk lemujících endotel kapilár, který je fenestrován. Právě buňky této epitelové vrstvy jsou spojené přes těsné spoje a tedy brání prostupu molekul rozpustných ve vodě (Löscher a Potschka, 2002).

Obecně, jak již bylo řečeno, díky těmto bariérám do mozku pronikají molekuly lipofilnější, jelikož membránová permeabilita je z velké části předurčena fyzikálně-chemickými vlastnostmi látek, nicméně u mnohých molekul rozpustných v lipidech, mezi nimi mnoho terapeuticky účinných látek, by se očekávala mnohem vyšší propustnost do mozku na základě jejich vysoké lipofility než bývá zjištěna. Tyto molekuly jsou substráty pro efluxní transportéry exprimované v HEB a HLB a velmi efektivně jsou těmito transportéry odstraňovány z CNS a tedy dochází k omezení jejich *uptake* do mozku (Begley, 2004). Klinický a toxikologický význam efluxních transportérů spočívá v jejich značném podílu na distribuci a eliminaci léčiv a xenobiotik obecně, čili ovlivnění jejich účinnosti a toxicity v CNS. Snížení penetrace léčiv do mozku představuje závažnou překážku pro farmakoterapii obzvláště v případě zvýšené exprese multidrug

transportérů a může vést k fenoménu farmakorezistence, jakou již známe u chemoterapie rakoviny (Begley, 2004). Největší a nejvýznamnější rodinou transportérů exprimovaných v HEB je nadrodina ABC (ATP-binding cassette) transportérů.

3.1.2.2 ABC transportéry

V rozsáhlé rodině ABC transportérů je v současné době zařazeno několik desítek (až >100) transportních proteinů nacházejících se ve všech druzích organizmů. Geny pro tyto transportéry jsou klasifikovaných do sedmi podskupin – ABCA až ABCG. Bylo identifikováno 48 genů lidských ABC transportérů, 22 z nich je spojováno s fyziologickými nebo patologickými funkcemi (Dean a kol., 2001, Lazarowski a kol., 2007). ABC transportéry jsou považovány za primární transportéry, které energii pro transport získávají hydrolýzou molekul ATP, které jsou v molekulách transportérů vázány na vysoce konzervativní domény specifické pro tuto skupinu. Většina transportérů obsahuje dvě transmembránové (TM) domény a dvě vazebné domény pro nukleotidy (NBDs – nucleotide-binding domains) (Štefaková a kol., 2004). Intracelulární NBD obsahují charakteristické motivy – walker A a B – sekvence aminokyselin, které obsahují všechny ATP-vážící proteiny. Dále obsahují walker C motiv – vysoce konzervativní aminokyselinovou sekvenci charakteristickou pro ABC transportéry. TM domény se skládají z 6-11 α -helixů prostupujících membránou a jsou odpovědné za substrátovou specifitu transportérů. ABC geny jsou organizovány buďto jako kompletní transportéry obsahující dvě TM domény a dvě NBD, nebo jako poloviční transportéry, které pak musí vytvořit homodiméry nebo heterodiméry, aby vznikl funkční transportér. Tyto geny jsou děleny do podrodin na základě podobnosti v genové struktuře, pořadí domén a na základě homologie sekvencí aminokyselin v TM a NBD doménách. ABC pumpy transportují substráty většinou jedním směrem. (Hyde a kol., 1990; Dean a kol., 2001). Podle směru transmembránového transportu jsou ABC transportéry řazeny mezi „eflux“ transportéry, čili ty, které vypuzují substráty z buňky ven proti jejich koncentračnímu gradientu.

Velká část současných znalostí o efluxních transportérech je založena na výzkumu P-glykoproteinu (P-gp/MDR1) – kódovaný genem ABCB1, který byl prvním objeveným transportérem schopným transmembránového přenosu léčiv a xenobiotik (Juliano a Ling, 1976). Objev a výzkum tohoto proteinu je spojen s fenoménem tzv. *mnohočetné rezistence* (*multidrug resistance* – MDR), který byl prvně popsán v rakovinových buň-

kách, kde buňky exprimující právě ABC transportéry nereagují na léčbu cytostatiky, protože tyto přenašeče aktivně vylučují cytostatika z buňky a brání jim tak v dosažení místa účinku (Fuksa a kol., 2006). Další skupinou přenašečů ze skupiny ABC transportérů jsou tzv. *multidrug-resistance-associated proteins* (MRPs 1-7) z podrodiny ABCC, které se chovají jako transportéry anionů, ale mohou transportovat i neutrální organické sloučeniny, a na přelomu tisíciletí objevený *breast cancer resistant protein* (BCRP) z podrodiny ABCG.

Pro většinu transportérů byly identifikovány endogenní substráty a navržena fyziologická funkce. Řada z nich současně transportuje mnohé exogenní substráty na základě podobnosti s endogenními. Substráty pro tyto přenašeče tvoří fosfolipidy, peptidy, steroidy, polysacharidy, aminokyseliny, nukleotidy, organické aniony, léčiva, toxiny a jejich odpovídající metabolity, resp. konjugáty. Spektra substrátů se často mezi různými transportéry překrývají a může docházet k soutěži substrátů o jednotlivé transportéry (Fuksa a kol., 2006). Dlouhá neschopnost nalézt přirozený endogenní substrát pro P-gp a úspěšné vytvoření životaschopných „knockoutovaných“ myších kmenů postrádajících funkční P-gp vedly k pochopení představy o funkci P-gp jako detoxifikačního transportéru, jehož hlavní úlohou je eliminace lipofilních látek z těla. Podobně i další transportéry ze skupiny MRP přenašečů jsou dnes považovány za transportéry podílející se na ochraně organismu a eliminaci toxických látek a na omezení jejich vstupu do organismu, i když pro ně byly objeveny jako přirozené substráty kupříkladu konjugáty endogenních steroidů (Mizuno a kol., 2003; Schinkel a Jonker, 2003).

3.1.2.3 Modifikace ABC transportérů jako základ farmakorezistence u epilepsie

Jak již bylo zmíněno, jeden ze dvou hlavních konceptů pro vysvětlení farmakorezistence (hypotéza multidrug transportérů) mluví o tom, že zvýšená exprese nebo funkce proteinů efluxních transportérů snižuje efektivní koncentrace AED u jejich cílových struktur. Tato hypotéza je založena na dvou rozdílných, ale úzce souvisejících předpokladech. Za první se předpokládá, že zvýšená exprese efluxních transportérů souvisí s farmakorezistencí u epilepsie a za druhé, že antiepileptika jsou substráty pro tyto transportéry, jinak by zvýšená exprese transportérů neměla žádný klinický význam (Kwan a Brodie, 2005).

Pozměněná exprese a funkce ABC transportérů ve farmakorezistenci u epilepsie

Důkazy pro podpoření prvního předpokladu (že zvýšená exprese transportérů souvisí s farmakorezistencí) pocházejí hlavně z „epileptické“ mozkové tkáně odebrané během chirurgických zákroků na pacientech s farmakorezistentní epilepsií. Interpretace nálezů z těchto chirurgických studií může být komplikována nedostatkem „normální“ kontrolní tkáně pro porovnání. Z množství efluxních transportérů lidského mozku byly zkoumány hlavně P-gp a MPR transportéry (Kwan a Brodie, 2005).

Tishler a kol. jako první zjistili výraznou zvýšenou expresi MDR1 genu, který kóduje transportní protein P-gp, v mozku většiny pacientů s farmakorezistentní parciální epilepsií (hlavně TLE). Hladiny mRNA MDR1 genu byly stanoveny metodou RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction), vzorky byly získány od pacientů, kteří podstoupili chirurgický zákrok a byly porovnány s kontrolními. Imunohistochemickými metodami byla prokázána také zvýšená přítomnost P-gp proteinů v endotelových buňkách mozkových kapilár, které tvoří HEB, a v astrocytech, které přispívají k funkci HEB. Tato výzkumná skupina tedy vyhodnotila, že P-gp může sehrávat z klinického hlediska důležitou roli limitováním přístupu AED do mozkového parenchymu a tedy, že zvýšená exprese MDR1 může přispívat ke vzniku rezistence u epilepsie (Tishler a kol., 1995). Další výzkumné skupiny prokázaly zvýšenou expresi různých MPR (ale ne BCRP) v buňkách kapilár a/nebo astrocytů farmakorezistentních pacientů (Tabulka 2). V některých z těchto studií se exprese transportérů v astrocytech jevila být zvýšená hlavně kolem kapilár (v perivaskulárních výběžcích astrocytů) (Löscher a Potschka, 2005). Sisodiya a kol. předložili myšlenku, že zvýšená exprese efluxních transportérů snižuje extracelulární koncentrace AED v blízkosti epileptických patologických ložisek (vychytáváním AED z extracelulárních prostor do endotelových buněk po koncentračním spádu a následním pumpováním z buněk do krevního oběhu) a tímto dělá epilepsii způsobenou těmito patologickými nálezy rezistentní k léčbě (Sisodiya a kol., 2002). U zvířecích modelů epilepsie byla porovnána exprese efluxních transportérů u farmakorezistentních potkanů a potkanů odpovídajících na léčbu. Farmakorezistentní zvířata vykazovala výrazně vyšší expresi P-gp v endotelových buňkách epileptických ložisek (Potschka a kol., 2004). Důležitou otázkou je, jestli zvýšená exprese ABC transportérů v epileptickém mozku pacientů s farmakorezistentní epilepsií a u zvířecích modelů opravdu snižuje *uptake* AED do mozku. Rizzi a kol. ukázali, že značný nárůst v hladinách MDR1 mRNA měřených pomocí metody RT-PCR

v hipokampu myši s TLE byl po indukovaných záchvatech spojen s 30% snížením poměru obsahu fenytoinu v mozku : plasmě. Tímto dokázali, že modifikace P-gp ovlivňuje koncentrace AED v mozku (Rizzi a kol., 2002).

Tabulka 2: *Zvýšená exprese multidrug transportérů v epileptické mozkové tkáni*

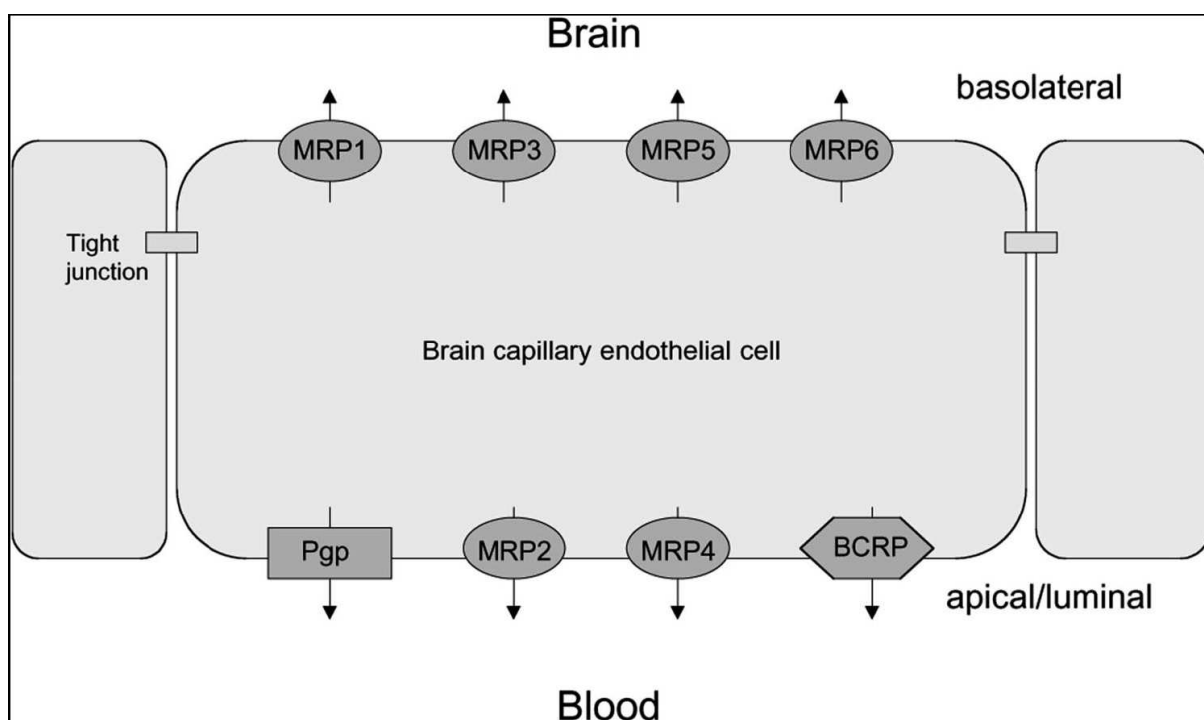
Multidrug transportér (proteín a/nebo gen)	Epileptogenní mozková tkáň z	Zvýšená exprese multidrug transportérů v:		
		Endotelových buňkách kapilár	Astrocytech	Neuronech
P-glykoprotein (MDR1)	Pacientů	+	+	+
	Potkanů (kainate)	+	+	+
	Potkanů (pilocarpine)	?	+	+
	Potkanů (kindling)	+	?	?
	Pacientů	-	+	+
MRP1	Pacientů	-	+	+
MRP2	Pacientů	+	+	?
MRP3	Pacientů	-	?	?
MRP5	Pacientů	+	?	?
BCRP	Pacientů	-	-	-

Převzato z Schmidt a Löscher, 2005

Kromě zvýšené exprese efluxních transportérů v HEB mnohé studie dokazují zvýšení exprese P-gp a MPR i v jiných buňkách než těch, které jsou součástí HEB (například neuronech). Zvýšená exprese P-gp v neuronech by mohla ovlivňovat antiepileptika působící na nitrobuněčné cílové struktury limitováním penetrace těchto léčiv do neuronů (Volk a kol., 2004).

Když se rozebírají možné úlohy transportérů u farmakorezistence, je důležité posoudit orientaci molekul transportérů v buněčné membráně (apikální vs. bazolaterální). Funkce snižování *uptake* léčiv do mozku může být připsána pouze transportérům obráceným do lumen kapilár (Schinkel a Jonker, 2003; Sun a kol., 2003). Mezi transportéry, u kterých byla prokázána zvýšená exprese v epileptogenní tkáni pacientů s farmakorezistentní epilepsií, P-gp a většina MRP (MRP1, MRP2 a MRP4) jsou exprimovány na apikální (luminální) straně endotelových buněk mozkových kapilár, což je ta správná pozice, aby mohly efluxní transportéry vykonávat svou funkci (Obr. 2).

Obr. 2: ABC transportéry hematoencefalické bariéry



Lokalizace vybraných efluxních transportérů v endotelových buňkách kapilár mozku tvořících HEB. Jenom transportéry exprimované na apikální (luminální) straně endotelu mozkových kapilár jsou v pozici bránit vstupu xenobiotik do mozku. *Převzato z Schinkel a Jonker, 2003*

Protože pacienti rezistentní k léčbě vykazují stejné vedlejší neurotoxické účinky při podávání AED jako pacienti, kteří jsou dobře kompenzováni antiepileptiky, výskyt zvýšené exprese efluxních transportérů bývá pravděpodobně omezen na epileptické oblasti mozku (Tabulka 3). V jedné studii byla zvýšená exprese P-gp a MRP1 nalezena v epileptické tkáni, ne však ve vzorcích tkáně přilehlých oblastí u stejného pacienta (Sisodiya a kol., 2002).

Tabulka 3: Zvýšená exprese efluxních transportérů u lidských patologických stavů u epilepsie stanovená pomocí imunochemických metod

Patologický stav	Typ buňky		
	Endotel	Astrocyty	Neurony
Hippocampal sclerosis	P-gp MRP2	P-gp MRP1 MRP2	P-gp MRP1
Focal cortical dysplasia	P-gp	P-gp MRP1	P-gp MRP1 (dysplastic neurons)
Tuberous sclerosis	P-gp	P-gp ? MRP1	P-gp MRP1
DNET	-	P-gp MRP	-
Ganglioglioma	P-gp	MRP1	MRP1 MRP1
Rasmussen encephalitis	P-gp	P-gp	-

DNET - dysembryoplastic neuroepithelial tumor

Převzato z Kwan a Brodie, 2005

Důležitou otevřenou otázkou zůstává, zda je zvýšená exprese P-gp a MPR v tkáni epileptického mozku u pacientů s farmakorezistentní epilepsií vlastní (konstitutivní, intrinsic), nebo získaná – indukovaná (acquired), nebo určitou roli sehrávají oba mechanismy. Konstitutivní zvýšená exprese transportérů by se mohla objevovat jako výsledek genetické predispozice nebo jako exprese vlastní vývoji určitých typů patologických lézí. V tomto případě se u pacienta farmakorezistence objevuje *de novo* a epileptické záchvaty jsou nekontrolovatelné již od začátku. Další zmíněnou možností je, že zvýšená exprese transportérů je získaná, kupříkladu jako následek samotné epilepsie, nekontrolovaných záchvatů, chronické léčby antiepileptiky nebo jako následek kombinace těchto faktorů (Kwan a Brodie, 2005; Löscher a Potschka, 2005).

Kromě vlastní a získané zvýšené exprese transportérů v HEB u epileptických pacientů mohou hrát určitou roli u farmakorezistence i polymorfizmy transportérů (Kerb a kol., 2001; Siddiqui a kol., 2003). Je důležité poznamenat, že genový polymorfismus relevantní pro farmakorezistenci se může vyskytnout jak v oblastech promotérů, tak v intronech a exonech. Genové polymorfizmy v kódovacích úsecích genů mají za následek rozdíly ve stavbě proteinů iontových kanálů a transportérů, které předchází nástupu epilepsie. Polymorfizmy v oblasti promotérů, které ovlivňují transkripci genů, mohou

ovlivnit regulaci transkripce těchto genů záchvaty. Toto poskytuje možný mechanismus získání farmakorezistentního fenotypu během epileptogeneze u farmakorezistentních, jako opak k farmakoresponzivním pacientům (Remy a Beck, 2005). Dále, zvýšená exprese i polymorfizmy transportérů u pacientů s farmakorezistentní epilepsií nemusí být nutně omezené na výskyt v mozkové tkáni. Mohou se objevovat i v jiných tkáních, jako například v tenkém střevě, kde P-gp pravděpodobně vytváří bariéru pro vstup léčiv z intestinálního lumen do krevního oběhu a tím ovlivňuje jejich biologickou dostupnost (Fromm, 2000). Po této stránce je zajímavé, že Lazarowski a kol. zjistili u pacienta s farmakorezistentní epilepsií spojenou se zvýšenou expresí MDR1 přetrvávající subterapeutické hladiny AED v plasmě (včetně fenytoinu a fenobarbitalu) navzdory agresivnímu a nepřetržitému podávání AED (Lazarowski a kol., 1999).

Jsou antiepileptika substráty ABC transportérů?

Se zřetelem na objevující se důkazy, že efluxní transportéry jsou ve zvýšené míře exprimovány v tkáni epileptického mozku, hlavně v buňkách přispívajících k funkci HEB, je z klinického hlediska velmi důležité vyhodnotit jestli jsou AED substráty těchto transportérů. Až pak by mohla zvýšená exprese P-gp nebo MPR kriticky přispět k rozvoji farmakorezistence u epilepsie (Löscher a Potschka, 2005). Existuje mnoho různých látek, včetně mnoha lipofilních léčiv, které jsou substráty pro P-gp nebo MPR nebo oboje, proto není překvapující, že AED, které byly syntetizovány jako lipofilní, aby mohly proniknout do mozku, jsou pravděpodobně substráty efluxních transportérů v HEB (Schmidt a Löscher, 2005).

Za použití mikrodialyzačních sond v obou hemisférách mozku potkanů u jednoho ze zvířecích modelů epilepsie a za použití lokální inhibice (pomocí inhibitoru verapamilu) efluxních transportérů v jedné z hemisfér bylo demonstrováno, že několik AED, včetně fenytoinu, fenobarbitalu, karbamazepinu, lamotriginu a felbamátu představuje substráty pro P-gp nebo MPR nebo oba druhy transportérů (Löscher a Potschka, 2002). V podobném modelu za použití MRP inhibitoru probenecidu stejná skupina našla důkazy, že fenytoin a karbamazepin jsou substráty pro MRP transportéry (Tabulka 4). Za použití myši s chybějícím MRP2 transportérem byla provedena studie zabývající se různými antiepileptiky jako možnými substráty pro tento transportér (Potschka a kol., 2003a; Potschka a kol., 2003b). U fenytoinu bylo dokázáno, že potkani s chybějícím MRP2 v HEB vykazují zvýšený *uptake* fenytoinu do mozku. Toto zvýšení je spojováno

s výraznějším protikřečovým účinkem v porovnání s kontrolou (zvířata s MRP2 transportérem). Pro potvrzení a lepší charakterizaci interakcí AED s ABC transportéry *in vitro* byly použity různé buněčné linie obsahující lidské nebo zvířecí ABC transportéry. Stejná skupina také prokázala, že dlouhodobé podávání AED jako fenobarbital nebo fenytoin u potkanů nevyvolává zvýšenou expresi P-gp.

Tabulka 4: *Aktivní transport AED zprostředkovaný multidrug transportéry v mozku*

Antiepileptikum	Multidrug transportéry v mozku		
	P-glykoprotein	MRPs	Jiné
Fenytoin	+	+	?
Karbamazepin	+	+	?
Valproát	?	+	+
Fenobarbital	+	-	?
Felbamát	+	-	?
Lamotrigin	+	-	?
Gabapentin	+	?	+
Topiramát	+	?	?
Levetiracetam	-	-	?

Převzato z Schmidt a Löscher, 2005

Jak již bylo zmíněno a podloženo studii, pozměněná exprese ABC transportérů v HEB může omezovat penetraci různých lipofilních látek, včetně mnohých klinicky důležitých látek do mozku. Omezení penetrace se stává mnohem výraznější u stavů onemocnění jako epilepsie, kdy je exprese transportérů zvýšená. Proto inhibice ABC transportérů nebo jejich obejití může být použito pro zvýšení *uptake* léčiv do mozku (Begley, 2004). Tato strategie zvýšení penetrace léčiv do mozku by mohla představovat nový terapeutický přístup k odvrácení farmakorezistence u nemocí CNS jako je epilepsie (Löscher a Potschka, 2002). U jakékoliv modulace funkce transportérů je ale potřeba zvážit možná rizika takovéto modulace. Jak ukázaly experimenty s „knockoutovanými“ myšmi, léčiva, která jsou za normálních okolností dobře snášena, se mohou v nepřítomnosti ABC transportérů v HEB stát neurotoxickými (Schinkel a Jonker, 2003). Dále se předpokládá, že efluxní transportéry jako P-gp sehrávají i jiné fyziologické úlohy než ochrana buněk před potenciálně toxickými xenobiotiky. Je důležité zmínit, že probenecidu a verapamilu, jako inhibitorům ABC transportérů, chybí substrá-

tová specifita a kromě ABC inhibují i jiné efluxní transportéry (Taylor, 2002). Proto by pro výzkum vlastností AED jako substrátů pro ABC transportéry měly být používány novější více specifické inhibitory.

Nedostatky transportérové hypotézy

Stejně jako u hypotézy cílových struktur, pro vysvětlení farmakorezistence u epilepsie pomocí zkoumání efluxních transportérů je třeba vyřešit několik otevřených otázek. Za prvé, mnoho zpráv týkajících se transportérové hypotézy souvisí jedna s druhou, ale pořád chybí přesvědčivé důkazy principu této hypotézy.

Za druhé, ne všechny AED jsou substráty pro efluxní transportéry jako P-gp. Jak již bylo zmíněno, levetiracetam (LEV) pravděpodobně není transportován P-gp ani MRP v HEB. LEV byl také jediným AED stejně účinným u „kindled“ potkanů (potkani s epilepsií vyvolanou elektrickou stimulací mozku) odpovídajících na terapii fenytoinem (PHE) jako i u těch resistantních k terapii (Löscher, 2002). Navzdory tomu, pacienti resistantní k léčbě hlavními antiepileptiky často neodpovídají ani na léčbu levetiracetamem. Z těchto závěrů vyplývá, že transportérová hypotéza nemůže být úplným vysvětlením farmakorezistence k AED. Dále, u mnohých antiepileptik (valproát, oxkarbazepin, zonisamid, ethosuximid, benzodiazepiny, vigabatrin a tiagabin) stále není známo jestli vůbec jsou substráty efluxních transportérů. Mimoto u většiny AED, které byly potvrzeny jako substráty pro efluxní transportéry, musí být tento transport prokázán pomocí různých experimentálních technik, aby nedošlo k zisku diskutabilních dat. Také musí být vzata v úvahu dávka testovaného léčiva, síla vazby léčiva k transportéru a jestli jde o tkáň s „normální“ nebo zvýšenou expresí transportérů (Schmidt a Löscher, 2005).

Za třetí, molekulární mechanismy odpovědné za zvýšenou expresi efluxních transportérů v epileptickém mozku stále nejsou dostatečně poznány. Jak již bylo zmíněno dříve, experimentální a klinické důkazy naznačují, že zvýšená exprese efluxních transportérů jako P-gp může být buďto vlastní nebo získaná (jako výsledek častých záchvatů). Tato získaná zvýšená exprese efluxních transportérů bývá omezená na určité oblasti mozku (epileptická ložiska) a může představovat obranný mechanismus druhé linie, kterým je HEB chráněna při přechodném otevření bariéry během záchvatů a při chronické dysregulaci funkce HEB. Ta bývá signalizována změnami v endotelových buňkách, výskytem abnormálních těsných spojů a zesílením bazální membrány v lidské

epileptické tkáni (Duncan a Todd, 1991; Sisodiya a kol., 2002). Takto může být zvýšená exprese efluxních transportérů jedním z mechanismů, kterým záchvaty plodí (farmakorezistentní) záchvaty (například narušením penetrace AED do mozku). Kromě toho může zvýšená exprese efluxních transportérů poskytovat jedno z možných vysvětlení proč vysoká frekvence záchvatů před zahájením léčby pravděpodobně negativně ovlivňuje odpověď na AED. Jak naznačují data ze studií na zvířatech, tato zvýšená exprese indukovaná záchvaty bývá přechodná. Naopak se zdá, že AED samotné nezvyšují expresi efluxních transportérů v mozku (Schmidt a Löscher, 2005).

Za čtvrté, zatím existují jen sporadické důkazy o tom, že jsou efluxní transportéry funkčně důležité pro farmakorezistenci u epilepsie u lidí. Pro přímý důkaz by bylo potřeba demonstrovat, že farmakorezistence může být odvrácena přídatnou léčbou inhibítorem P-gp nebo MRP. Doposud existují jenom neoficiální data. U inhibitorů P-gp a v poslední době hlavně MRP je v současnosti klinicky posuzována jejich schopnost zvrátit farmakorezistenci u rakoviny u lidí. Studie na zvířatech naznačují, že použití inhibitorů P-gp a MRP má za následek zvýšenou protikřečovou účinnost AED (Löscher a Potschka, 2005). Tedy farmakologická inhibice P-gp nebo MRP by mohla představovat novou klinickou strategii předcházení nebo překonávání farmakorezistence u pacientů se změněnou expresí efluxních transportérů, tyto závěry ale potřebují validaci (viz přehledový článek Schmidt a Löscher, 2005).

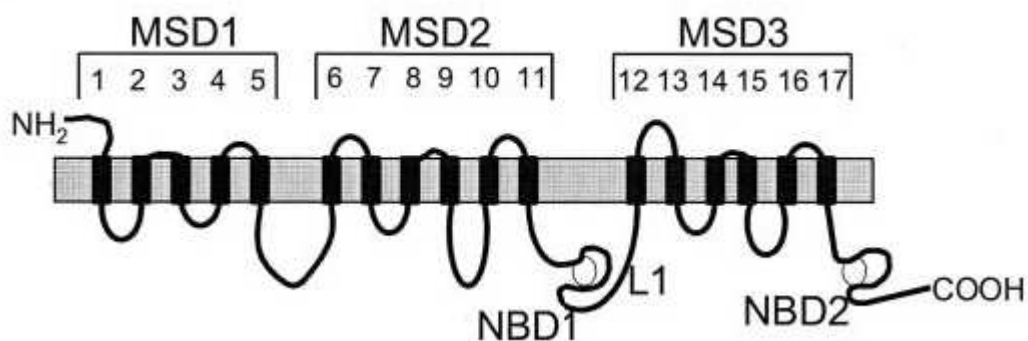
3.2 Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP2)

MRP transportéry, jak již bylo zmíněno, představují jednu větev rodiny ABC transportérů – transmembránových proteinů, které využívají energii získanou hydrolyzou ATP pro přenos látek (svých substrátů) přes biologické membrány (Borst a kol., 1999). Koncem 80. let byla pomocí experimentů za použití organických anionů prokázána existence jednosměrného transportéru lokalizovaného v apikálních (kanalikulárních) buňkách membrán tkání s exkreční funkcí. Transportér původně označován jako cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter – kanalikulární multispecifický transportér organických anionů) byl po identifikaci kódujícího genu (ABCC2) přejmenován na MRP2 (Buchler a kol., 1996; Fuksa a kol., 2006). Do devítičlenné podrodiny MRP transportérů byl zařazen jako druhý identifikovaný. Objev MRP2 představoval významný krok vpřed pro pochopení faktorů regulujících eliminaci léčiv v některých tkáních.

Struktura, lokalizace a funkce MRP2

MRP2 je fosfoglykoprotein. Jeho membránová topologie je stejná jako u MRP1 transportéru. Tvoří jej 17 transmembránových α -helixů uspořádaných do tří transmembránových domén (TM), ze kterých první dvě obsahují po 6 α -helixech a třetí transmembránová doména, charakteristická pro některé přenašeče z MRP podrodiny včetně MRP2, je tvořena pouze 5 α -helixy a její NH₂-konec je uložen extracelulárně (Obr. 3) (Schinkel a Jonker, 2003). Extracelulární uložení NH₂-konce vyplývá z lichého počtu transmembránových helixů, ale potvrzují jej i imunofluorescenční studie. Předpokládá se, že TM obsahují několik vazebných míst pro substráty, což potvrzuje i schopnost různých substrátů vzájemně inhibovat nebo stimulovat transport jiných substrátů (Gerk a Vore, 2002). Další dvě strukturní části MRP2 transportérů tvoří vazebné domény pro nukleotidy (NBD) nacházející se mezi jednotlivými TM. (Borst a kol., 1999; König a kol., 1999). Přesný mechanismus, kterým je energie uvolňována z hydrolyzy ATP, za účasti dvou sekvencí v NBD klíčových pro ATP-ázovou funkci (již zmíněné walker A a B motivy), využita pro transport substrátů dosud není znám (Fuksa a kol., 2006). Sekvenční analýza MRP2 proteinu ukázala jistou míru shody uvnitř MRP podrodiny transportérů, a to nejvyšší ve srovnání s MRP1 (48%) a MRP3 (47%) (König a kol., 2003).

Obr. 3: MRP2/Mrp2 transportér



Předpokládaná topologie MRP2 transportéru. Převzato z Gerk a Vore, 2002

Poprvé byl MRP2 transportér identifikován jako součást apikální membrány potkaních i lidských hepatocytů, proto byl původně nazýván kanalikulární MRP (cMO-AT) (Keppler a kol., 1996). Charakterizace distribuce MRP2 mRNA v různých tkáních (jiných než játra), po jejím úspěšném naklonování z potkaních (Mrp2) i lidských jater (MRP2) ukázala, že MRP2 transportér je taktéž exprimován v apikálních membránách proximálních tubulů ledvin, kde jeho funkce v renální sekreci organických anionů není zcela známá a v epitelových buňkách duodena a jejunu. V tenkém střevě potkanů míra exprese roste směrem od krypty k vrcholu vilu a klesá od duodena k distálnímu ileu a tlustému střevu, kde dosahuje pouze 30% exprese v duodenu (Cherrington a kol., 2002). Pomocí imunofluorescenční mikroskopie a imunohistochemie byla přítomnost MRP2 dále prokázána v epiteliálních buňkách močového měchýře, plic a žaludku, ale jejich funkce v těchto orgánech dosud není známa (Cherrington a kol., 2002; König, 2003). MRP2 transportéry byly detekovány také v placentě, kde působí jako ochrana plodu před toxiny a podílí se na exkreci endogenních konjugátů z plodu (St-Pierre a kol., 2002). Jak již bylo zmíněno MRP2, spolu s dalšími ABC transportéry, je apikálně exprimován v edotelových buňkách kapilár biologických bariér v mozku, kde plní funkci efluxního transportéru endogenních substrátů i xenobiotik (viz Obr. 2).

Většina poznatků o potenciálních substrátech MRP2 byla získána použitím potkaního kmene s chybějícím MRP2 transportérem a taktéž různých buněčných linií (Gerk a Vore, 2002). MRP2 transportér má velmi podobné spektrum substrátů jako dříve objevený a popsáný MRP1. Transportuje širokou paletu substrátů počínaje amfifilními ionty s vysokou afinitou, především konjugáty endo- a xenobiotik s glutathionem, kyselinou glukuronovou a sulfonovou. Takto transportuje například leukotrieny, konjugáty těžkých kovů (kupříkladu kadmium a arsen), endogenní substráty jako bilirubin,

estradiol a trijodthyronin a konjugáty žlučových solí (Suzuki a Sugiyama, 1999). Dále transportuje řadu nekonjugovaných organických iontů jako bromosulfoftalein (modelovou látku pro studium jaterního transportu), redukované foláty, protinádorové léčivo metothrexát, inhibitor HMG-CoA reductázy pravastatin, antibiotika jako ampicilin a ceftriaxon, ACE inhibitor temokaprilát a další, například toxiny (Suzuki a Sugiyama, 1999). Kromě toho MRP2 transportuje některé látky za přítomnosti redukovaného glutathionu jako kotransportéru (například vinkristin). I některá antiepileptika představují substráty pro MRP2 transportér.

Obecně, MRP2 transportér plní exkreční a ochranné úlohy. Jeho základní fyziologickou funkcí je transmembránový transport konjugovaných (v menší míře i nekonjugovaných) metabolitů endogenních látek a xenobiotik do žluči, moči a střevního lumina (Fuksa a kol., 2006). V játrech tento transportér zajišťuje jeden z mechanismů tvorby žluče, nezávislé na sekreci osmoticky aktivních solí žlučových kyselin (Gerk a Vore, 2002). MRP2 je dále považován za jeden z mediátorů fenoménu multidrug rezistence u rakoviny. Jeho exprese byla prokázána v mnohých nádorových buňkách u různých nádorů a experimenty s transfekcí cDNA MRP2 do savčích buněk vedly k zjištění, že přítomnost a zvýšená exprese MRP2 v (nádorových) buňkách vede k zisku farmakorezistence k protinádorovým léčivům jako etoposid, vinkristin, cis-platina, doxorubicin, epirubicin metothrexátu a další (Cui a kol., 1999; Suzuki a Sugiyama, 2002). V hematoencefalické bariéře MRP2 pravděpodobně plní ochrannou funkci vylučováním nežádoucích látek z mozku zpět do krevního oběhu. Zvýšená exprese tohoto transportéru v buňkách biologických bariér mozku však vzbudila zájem jako potenciální příčina farmakorezistence u epilepsie, protože mnohé AED byly prokázány jako jeho substráty. O interakcích MRP2 transportéru a antiepileptiky bude pojednáno dále.

Regulace exprese a funkce MRP2

MRP2 transportér spolu s celou rodinou ABC transportérů tvoří vysoce adaptabilní systém, který reaguje na různorodé vlivy, což mívá za následek zvýšenou či sníženou expresi jeho proteinů a související změny jeho funkce (Fuksa a kol., 2006).

Různé studie naznačují, že exprese MRP2 může být regulována na několika úrovních. První z nich představuje endocytózou zprostředkovaný odsun proteinu přenašeče z membrán, kde vlastně dochází k posunu v dynamické rovnováze mezi endocytózou a exocytózou (inzercí proteinu do membrány) transportérů mezi membránou

a intracelulárními vesikuly. Tuto rovnováhu narušují mnohé exogenní látky, dále také výskyt cholestázy. Cholestáza je definována jako porucha odtoku žluče vedoucí ke zvýšení hladin bilirubinu a žlučových kyselin v séru. Existují různé formy cholestázy a u každé z nich dochází k *down*-regulaci MRP2 transportérů v játrech, kvůli potřebě snížení kanalikulární sekrece (Gerk a Vore, 2002).

Další úrovní, na které dochází k regulaci exprese MRP2 je transkripce. Ke snížení exprese dochází u různých nemocí, kde tuto supresi specifickou pro játra způsobují pravděpodobně proteiny akutní fáze (zejména cytokiny). U zvýšení transkripce MRP2 se jedná o jev podobný u všech ABC transportérů. Transkripční indukce tu probíhá přes jaderné receptory, tzv. *orphan nuclear receptors*, které po navázání ligandu (jako dexa-methazon, fenobarbital, cis-platina, klotrimazol a další) vytvoří komplex, který translokuje do jádra buňky a tam dochází k jeho navázání na sekvenci DNA v promotorové oblasti a k aktivaci transkripce. Tato indukce exprese byla prokázána pro tkáň jater, ledvin i duodena (Gerk a Vore, 2002; König a kol., 2003). Data pro regulaci exprese MRP2 v tkáni mozku doposud nejsou známa.

Třetí úrovní, na které dochází k regulaci exprese MRP2 je úroveň posttranslačních úprav (Gerk a Vore, 2002).

Zajímavé poznatky ohledně regulace funkce přinášejí interakční studie na buněčných liniích exprimujících Mrp2. Podle získaných údajů z kinetiky transportu modelových substrátů je pravděpodobné, že Mrp2 obsahuje nejen více vazebných domén pro kotransport látek, ale také alosterická vazebná místa pro látky, které nemusí být substráty, ale mohou významně ovlivňovat rychlost přenosu jiných sloučenin (Fuksa a kol., 2006). Podle Zelcera a kol. je efekt látky modulující transport přímo závislý na substrátu (Zelcer a kol., 2003). Tato pozorování jsou v souladu s již dříve navrženou možností, že každá dvojice substrát – modulátor tvoří unikátní interakci na komplexu možných vazebných míst MRP2 proteinu (Fuksa a kol., 2006).

Expresi a funkci MRP2 transportérů ovlivňují také mnohé přirozeně se vyskytující mutace v genu kódujícím tento transportér. U lidí i potkanů bylo popsáno několik takových mutací (Suzuki a Sugiyama, 2002). Některé z nich mají za následek úplnou absenci MRP2 transportéru na kanalikulární membráně buněk hepatocytů, ale i v jiných tkáních. Absence MRP2 v játrech má za následek vznik onemocnění označovaného Dubin-Johnsonův syndrom (DJS). Toto benigní onemocnění se projevuje hyperbilirubinemií, zvýšením exkrece koproporfirinu I močí a ukládáním tmavého pigmentu melaninu

v játrech (Gerk a Vore, 2002). Konkrétní mutace, identifikovány jako bodové mutace vedoucí k absenci Mrp2 byly nalezeny u dvou dobře popsáných potkaních kmenů s kongenitální hyperbilirubinemií, které jsou známé jako zvířecí modely lidského DJS. U kmene Wistar se jedná o tzv. Groningen žluté/transport-deficitní potkany (GY/TR-), u kmene Sprague-Dawley jsou označovány jako Eisai hyperbilirubinemičtí (EHBR) (Buchler a kol., 1996; Fuksa a kol., 2006). Objev těchto modelů a poznání jejich mutantní DNA byly rozhodující pro naklonování Mrp2, což umožnilo poznání a pochopení struktury tohoto transportéru, jeho funkce, lokalizace a regulace exprese. Tyto dva zvířecí modely také rozhodující mírou přispěly k rozvoji výzkumu interakcí antiepileptik s MRP2 transportérem exprimovaným v mozku.

3.3 Interakce antiepileptik s MRP2 transportérem

Expres MRP2 v endotelových buňkách kapilár mozku je zvýšená u pacientů s farmakorezistentní epilepsií, jak již bylo zmíněno u skupiny ABC transportérů (Aronica a kol., 2004). Předpokládá se tedy, že MRP2 transportér sehrává důležitou úlohu v efluxním transportu různých antiepileptik z mozku zpět do krevního oběhu, a že takto přispívá k rozvoji farmakorezistence k těmto AED u mnohých pacientů. Na základě tohoto předpokladu bylo provedeno mnoho *in vivo* i *in vitro* studií, zabývajících se interakcemi jednotlivých AED s MRP2 transportérem.

3.3.1 Interakce MRP2 transportéru s antiepileptiky na *in vitro* úrovni

Pro predikci permeability HEB pro léčiva účinkující v CNS a studium jejich interakcí s těmito léčivy na *in vitro* úrovni je nutno použít správné jednoduché, široce aplikovatelné a důkladné *in vitro* metody. Modely založené na kultivaci linií buněk nabízí možnost vysvětlit transcelulární a paracelulární procesy difúze, metabolismu, procesy aktivního transportu jako i nedefinované interakce mezi léčivem a buněčným materiálem, které mohou mít dopad na celkový obraz permeability membrány. Aby mohl být *in vitro* model HEB použit pro screening propustnosti membrány pro léčiva účinkující na CNS, musí vykazovat reprodukovatelnou permeabilitu pro nosná média a splňovat další obecná kritéria včetně přítomnosti restriktivní paracelulární bariéry, fyziologicky realistické buněčné architektury, funkční exprese klíčových transportérů a jednoduché kultivace (Gumbleton a Audus, 2001).

Nedávno bylo provedeno několik *in vitro* studií týkajících se interakcí některých antiepileptik s MRP2 transportérem. V jedné z nich se Baltes a kol. zabývali transportem AED fenytoinu, levetiracetamu a karbamazepinu pomocí efluxních transportérů P-gp (MDR1) a MRP2 (Baltes a kol., 2007a). V této studii byly použity jednovrstvé buněčné kultury polarizovaných MDCK II (Madin-Darby canine kidney II – buňky podobné epiteliálním buňkám proximálních tubulů) buněk ze psích ledvin a LLC-PK1 buněk z ledvin prasete. Do těchto buněk byly metodou transfekce vpraveny sekvence cDNA kódující lidské nebo myší MDR1 a MRP2, které byly pak v buňkách exprimovány. Pomocí těchto buněčných linií a cyclosporinu A (pro P-gp) a vinblastinu (pro MRP2) jako referenčních standardů byl měřen usměrněný transport antiepileptik. Z výsledků bylo vyvozeno, že na rozdíl od vinblastinu nebylo pomocí MRP2 transportováno ani jedno z testovaných AED. Tyto data ale nevylučují, že testované antiepileptika

nejsou alespoň slabými substráty MRP2, protože efektivita transportu se může lišit nejenom u různých živočišných druhů (což bylo touto studií prokázáno pro P-gp), ale i u různých tkání.

V jiné studii se Baltes a kol. zabývali transportem AED valproové kyseliny (VPA). VPA je široce používaným léčivem u neurologických onemocnění jako epilepsie, bipolární porucha a migréna. Pro dosažení klinického efektu VPA je ale potřeba užívat poněkud vysoké dávky, což je způsobeno relativně neefektivním příjmem do mozku. Špatná distribuce VPA do mozku, zdá se, odráží přítomnost asymetrického transportního systému v HEB. Baltes a kol. použili různé *in vivo* a *in vitro* strategie k vyhodnocení jestli je VPA substrátem MRP a P-gp efluxních transportérů. V této studii byly také použity jednovrstvé buněčné kultury s exprimovanými P-gp, MRP1 a MRP2 a jako standardy cyklosporin A a vinkristin. Bylo prokázáno, že VPA není substrátem těchto transportérů a tyto výsledky byly potvrzeny i v *in vivo* studiích (kde pomocí MRP2 deficitních potkanů byla vyloučena hypotéza, že MRP2 sehrává důležitou roli pro eflux VPA z mozkové tkáně) (Baltes a kol., 2007b).

Výsledky *in vitro* analýz občas nekorespondují s výsledky analýz *in vivo*. Tento rozpor je pravděpodobně způsoben rozdílností tkání exprimujících zkoumané transportéry, rozdílnou mírou exprese efluxních transportérů a odlišnými podmínkami experimentů na obou úrovních.

3.3.2 Interakce MRP2 transportéru s antiepileptiky na *in vivo* úrovni

Studie interakcí MRP2 transportéru s antiepileptiky na *in vivo* úrovni posuzují tyto interakce v širokém kontextu živých organismů. Experimenty se nejčastěji provádí na zvířecích modelech, ze kterých se s výhodou velmi často používají již zmiňované MRP2-deficitní potkaní kmeny TR- a EHBR.

Jedna ze studií skupiny Potschka a kol. se zabývá významem MRP2 transportérů pro funkci HEB. (Potschka a kol., 2003a) Byly v ní použity tři různé *in vivo* strategie. Za prvé, inhibitor MRP1/MRP2 transportérů probenecid byl použit pro vyřešení otázky, jestli inhibice MRP2 v HEB zvyšuje extracelulární hladiny AED v mozku. Hladiny AED byly stanoveny metodou mikrodialýzy pomocí sond v mozkové kůře. Za druhé, byly použity TR- potkaní kmeny pro zjištění, zda absence MRP2 v HEB těchto potkanů vede ke zvýšení penetrace AED do mozku. Za třetí, byl použit „kindling“ model epilep-

sie pro studium zesílení protikřečové aktivity AED při inhibici MRP2 nebo jeho nedostatku (v TR- potkanech).

Za použití mikrodialýzy bylo prokázáno, že lokální aplikace probenecidu pomocí implantované dialyzační sondy způsobuje zvýšení extracelulárních hladin fenytoinu v mozku. Fenytoin byl tak vybrán jako pravděpodobný substrát MRP2. Z předběžných experimentů s různými AED (karbamazepin, fenobarbital, lamotrigin a felbamát) byl jako jeho protějšek pro porovnávání transportu MRP2 transportérem vybrán fenobarbital, protože nevykazoval ovlivnění transportu probenecidem. Pro validaci těchto dat byla porovnána penetrace fenytoinu a fenobarbitalu do mozku u MRP2-deficitních potkanů a potkanů s exprimovaným MRP2 transportérem. Fenytoin dosáhl vysokých extracelulárních hladin u TR- potkanů v porovnání s normálními (nemutantními). Pro fenobarbital nebyl pozorován takový rozdíl, což potvrdilo výsledky z předešlého experimentu. U „kindling“ modelu epilepsie koadministrace probenecidu výrazně zvýšila protikřečový účinek fenytoinu a u MRP2-deficitních potkanů došlo po podání fenytoinu také k výraznému zvýšení účinku v porovnání s normálními potkany. Tyto data naznačují, že MRP2 značně přispívá k exkreční funkci HEB (Potschka a kol., 2003a).

V další studii tato skupina zkoumala jestli se MRP2 transportér podílí na přenosu AED karbamazepinu, lamotriginu a felbamátu přes HEB (Potschka a kol., 2003b). Byla determinována distribuce těchto AED do mozku TR- potkaního kmene. Koncentrace AED v mozku MRP2-deficitních potkanů se nijak výrazně nelišily od koncentrací pozorovaných u normálních jedinců. U „kindling“ modelu epilepsie byla antikonvulzní účinnost lamotriginu a felbamátu porovnatelná pro obě skupiny potkanů. Karbamazepin ale vykazoval vyšší účinnost u mutantních (TR-) potkanů v porovnání s normálními. Souhrnně tedy v této studii bylo prokázáno, že MRP2 neovlivňuje *uptake* karbamazepinu, lamotriginu a felbamátu. Navzdory tomu nepřítomnost MRP2 transportéru vede ke zvýšení účinnosti karbamazepinu u „kindling“ modelu epilepsie. Je třeba provést další výzkum pro identifikaci mechanismu odpovědného za tyto rozdíly, pro objasnění jestli jsou farmakokinetické rozdíly detekovatelné pouze za využití „kindling“ modelů epilepsie, u kterých pravděpodobně dochází ke zvýšené expresi transportérů (jako výsledek záchvatů).

V nedávné velmi zajímavé studii Hoffmann a Löscher pomocí imunofluorescenčního barvení prokázali zvýšení exprese P-gp transportéru u MRP2-deficitních potkanů jako kompenzaci funkce MRP2 transportéru. Tento objev by mohl představovat vysvět-

lení výše zmíněného rozporu, kdy by transport karbamazepinu (jako i jiných AED, které jsou substráty P-gp) u TR- potkanů zprostředkován P-glykoproteinem vedl k získání falešně negativních výsledků, týkajících se role MRP2 v transportu AED v HEB (Hoffmann a Löscher, 2007).

4. Diskuze a závěr

Navzdory vývoji a používání stále většího množství nových AED, procentuální zastoupení farmakorezistentních pacientů mezi pacienty s epilepsií zůstává stabilně kolem 30%. Většina pacientů s farmakorezistentní epilepsií neodpovídá na léčbu různými AED s různými mechanismy účinku, což naznačuje, že za farmakorezistenci u epilepsie stojí četné patogenetické mechanismy, mezi nimi hlavně samotná podstata patologického procesu, jeho vývoj a rozdílná individuální citlivost k léčbě, vrozená nebo získaná.

Na molekulární úrovni je farmakorezistence u epilepsie v současnosti vysvětlována pomocí tzv. hypotézy cílových struktur, která se zabývá změnami ve vlastnostech cílových struktur pro AED jako příčinami jejich snížené farmakosenzitivity, a transportérové hypotézy, která hovoří o zvýšené expresi efluxních transportérů v mozku jako příčině snížení přístupu AED k cílovým strukturám. I když se nedá předpokládat, že tyto dvě relativně jednoduché teorie mohou plně vysvětlit klinická pozorování u různých modelů farmakorezistence (farmakorezistence vzniklá *de novo*, progresivní, reverzibilní), alespoň poskytují potenciální hypotézy pro následný výzkum.

U transportérové hypotézy farmakorezistence u epilepsie je potřeba u konkrétních AED prokázat, jestli efluxní transportéry regulují intraparenchymální hladiny těchto léčiv. S výhodou se pro tyto studie dají použít inhibitory ABC transportérů. Jak již bylo zmíněno, studie na zvířatech dokazují, že použití inhibitorů P-gp a MRP receptorů vede ke zvýšení hladiny některých AED v mozku. Dosud používaným inhibitorům ABC transportérů ale chybí substrátová specifita, čili inhibují i jiné transportéry. Proto by pro výzkum vlastností AED jako substrátů pro konkrétní ABC transportéry měly být používány novější více specifické inhibitory. Použití dostatečně specifických inhibitorů ABC transportérů by mohlo v budoucnu představovat možný terapeutický přístup k odvrácení farmakorezistentní epilepsie. Při koadministraci antiepileptik a inhibitorů transportérů by ale bylo nutné zohlednit, jestli právě zvýšená exprese efluxních transportérů je odpovědná za výskyt farmakorezistence. V opačném případě by mohlo dojít ke zvýšení toxicity používaných léčiv. Dalším předmětem studií proto musí být prokázání zvýšené exprese efluxních transportérů v HEB a důkaz její souvislosti se změnami citlivosti záchvatů k jednotlivým AED u experimentální epilepsie i u pacientů s epilepsií.

U lidských epileptických pacientů by dále měla být posuzována souvislost mezi polymorfizmy genů efluxních transportérů a klinicky pozorovanou farmakorezistencí. Data o spojení konkrétních polymorfizmů s pozměněnou expresí a funkcí jednotlivých efluxních transportérů by mohla být získána pomocí *in vitro* metod za použití tkání pacientů podstupujících chirurgické zákroky. Identifikace relevantních polymorfizmů genů ABC transportérů (ale i cílových struktur pro AED) by mohla v budoucnu představovat možnost spolehlivé predikce výskytu a pravděpodobného mechanismu farmakorezistence. Tato data by pak mohla ovlivnit počáteční terapii a možná zvýšit její úspěšnost.

Dostupnost nových vyspělejších *in vitro* a *in vivo* metod (použití specifických inhibitorů transportérů, specifických protilátek, „knockoutovaných“ zvířecích linií a jiných) zjednoduší získávání detailnějších poznatků o různých ABC transportérech a jejich roli v transportu léčiv přes HEB za fyziologických i patologických podmínek. Pochopení vlastností efluxních transportérů na molekulární úrovni (i vlastností cílových struktur pro AED), jejich interakcí s konkrétními antiepileptiky, jejich exprese a pochopení regulace této exprese za použití těchto metod, by mohlo v budoucnu vést k umožnění resp. zefektivnění terapie farmakorezistentní epilepsie bez invazivních chirurgických zákroků.

5. Abstrakty

5.1 Interakce MRP2 transportéru s vybranými antiepileptiky

Epilepsie je časté neurologické onemocnění postihující přibližně 1 – 2% populace. U většiny epileptických pacientů jsou záchvaty účinně kontrolovány v současnosti dostupnými antiepileptiky (AED – anti-epileptic drugs). Uvádí se, že u přibližně 30% pacientů nedochází k zastavení záchvatů, navzdory pečlivě optimalizované léčbě. Většina těchto pacientů s farmakorezistentní epilepsií neodpovídá na léčbu různými AED s různými mechanismy účinku, což naznačuje, že rezistence u epilepsie je multifaktoriálním fenoménem nezávislým od použitého léčiva. Na základě experimentálních a klinických studií byly předloženy dvě hlavní teorie vysvětlující vznik farmakorezistence u epilepsie. První z nich je hypotéza cílových struktur, která se zabývá změnami ve vlastnostech cílových struktur pro AED jako příčinami jejich snížené farmakosenzitivity. Druhou je transportérová hypotéza, která hovoří o zvýšené expresi efluxních multidrug-transportérů v mozku jako příčině snížení přístupu AED k cílovým strukturám. Největší a nejvýznamnější rodinou multidrug-transportérů exprimovaných v mozku a pravděpodobně odpovědných za snížení účinné koncentrace mnohých AED v mozkové tkáni je nadrodina ABC (ATP-binding cassette) transportérů. Jedním z transportérů této rodiny, kterým byla v současnosti věnována pozornost je multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). MRP2 transportér, exprimován na apikální membráně buněk mnoha absorpčních a exkretčních orgánů, kromě jiných i buněk HEB (hematoencefalické bariéry), má důležitý vliv na farmakokinetické parametry řady léčiv, kupříkladu AED. Cílem této rešeršní diplomové práce je studium interakcí antiepileptik s ABC transportéry, hlavně MRP2 transportérem, pomocí zdokumentovaných *in vitro* a *in vivo* studií.

5.2 Interactions of the MRP2 transporter with selected anti-epileptic drugs

Epilepsy is a common neurological disorder affecting approximately 1 – 2% of the population. In most of the patients with epilepsy, seizures are well-controlled with currently available anti-epileptic drugs (AEDs). It is estimated that 30% of the patients fail to achieve seizure termination despite carefully optimised drug treatment. Most of these patients with refractory epilepsy are resistant to several AEDs with different mechanisms of action, which suggests that resistance in epilepsy is a multifactorial and drug-nonspecific phenomenon. Based on experimental and clinical studies, two major theories have been put forward to explain the development of pharmacoresistance in epilepsy. The target hypothesis holds that changes in the properties of drug targets for AEDs may result into their reduced drug sensitivity. The transporter hypothesis contends that the over-expression of efflux multidrug-transporters in the brain leads to impaired access of AEDs to their targets. The largest and the most important family of multidrug-transporters expressed in the brain, probably responsible for the reduction of effective drug concentrations at their targets, is the ABC (ATP-binding cassette) transporter family. One of the transporters of this family, recently under study, is the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2). The MRP2 transporter expressed in the apical membrane of polarised cells in organs of absorption and excretion, e.g. cells of the BBB (blood-brain barrier), has an important impact on pharmacokinetic parameters of many drugs, for example AEDs. The goal of this review is to summarise the interactions of anti-epileptic drugs with ABC transporters, especially the MRP2 transporter, based on well-documented *in vitro* and *in vivo* studies.

6. Literatūra

- Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, van Veelen CW, van Rijen PC, Leenstra S, a kol. Expression and cellular distribution of multidrug transporter proteins in two major causes of medically intractable epilepsy: focal cortical dysplasia and glioneural tumors. *Neuroscience* 2003; 118: 417–29.
- Aronica E, Gorter JA, Ramkema M, Redeker S, Ozbas-Gercerer F, van Vliet EA, Scheffer GL, Scheper RJ, van der Valk M, Baayen JC, Troost D. Expression and cellular distribution of multidrug resistance-related proteins in the hippocampus of patients with mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2004; 45: 441–451.
- Baltes S, Gastens AM, Fedrowitz M, Potschka H, Kaefer V, Loscher W. Differences in the transport of the antiepileptic drugs phenytoin, levetiracetam and carbamazepine by human and mouse P-Glycoprotein. *Neuropharmacology* 2007a; 52: 2: 333–346.
- Baltes S, Fedrowitz M, Tortos CL, Potschka H, Loscher W. Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *J Pharmacol Exp Ther* 2007b; 320: 1: 331–343.
- Begley DJ. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1295–312.
- Betz AL, Goldstein GW, a Katzman R. Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers, in basic neurochemistry. Molecular, cellular, and medical aspects (Siegel GJ, Agranoff RW, Albers RW, and Molinoff PB) 5th ed. Raven Press, New York 1994; 681 – 699.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1461: 347–357.
- Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 1998; 4: 1166–72.
- Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Lin DD, Rikhter TY, Holloway KL, a kol. Human neuronal gamma-aminobutyric acid (A) receptors: coordinated subunit mRNA expression and functional correlates in individual dentate granule cells. *J Neurosci* 1999; 19: 8312–8.
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein,

- cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996; 271: 15091–15098.
- Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR, Klaassen CD. Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2 and 3 (Mrp1, 2 and 3) mRNA and hepatic induction of the Mrp3 by constitutive androstane activators in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 97–104.
- Coulter DA. Epilepsy-associated plasticity in gamma-aminobutyric acid receptor overexpression, function and inhibitory synaptic properties. *Int Rev Neurobiol* 2001; 45: 237–52.
- Curia G, Ararci P, Sancini G, Mantegazza M, Avanzini G, Franceschetti S. Protein-kinase C-dependent phosphorylation inhibits the effect of the antiepileptic drug topiramate on the persistent fraction of sodium currents. *Neurosci* 2004; 127: 63–8.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATB-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001; 11: 1156–66.
- Duncan R, Todd N. Epilepsy and the blood-brain barrier. *Br J Hosp Med* 1991; 45: 32–4.
- Frahm C, Stief F, Zuschratter W, Draguhn A. Unaltered control of extracellular GABA-concentration through GAT-1 in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 2003; 52: 243–52.
- Fromm MF. P-glycoprotein: a defence mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000; 38: 69–74.
- Fuksa L, Mičuda S, Cermanová J, Brčáková E, Štaud F. Fyziologická funkce MRP2. *Československá fyziologie* 2006; 55 (2): 57–65.
- Gastaldi M, Bartolomei F, Massacrier A, Planells R, Cau P. Increase in mRNA encoding neonatal II and III sodium channel alpha-isoforms during kainate-induced seizures in adult rat hippocampus. *Mol Brain Res* 1997; 44: 179–90.
- Gerk PM, Vore M. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp* 2002; 302: 407–415.
- Gumbleton M, Audus KL. Progress and limitations in the use of *in vitro* cell cultures to serve as a permeability screen for the blood-brain barrier. *J Pharm Sci* 2001; 90: 1681–1698.

- Hoffmann K, Löscher W. Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR- rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats. *Epilepsia* 2007; 48(4): 631–645.
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 1990; 346: 362–365.
- Juliano RL, Ling VA 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152–162.
- Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, Mayer R, Buchler M. The function of the multidrug resistance proteins (MRP and cMRP) in drug conjugate transport and hepatobiliary excretion. *Adv Enzyme Regul* 1996; 36: 17–29.
- Kerb R, Hoffmeyer S, Brinkmann U. ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2001; 2: 51–64.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localisation, substrate specificity and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461: 377–394.
- König J, Nies AT, Cui Y, Keppler D. MRP2, the apical export pump for anionic conjugates. In: Holland IB, Cole SPC, Kuchler K, Higgins CF, editors. *ABC proteins: From bacteria to man*. London: Academic Press 2003; 423–443.
- Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000; 342: 314–9.
- Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 2005; 46: 224–35.
- Lazarowski A, Sevlever G, Taratuto A, Massaro M, Rabinowicz A. Tuberos sclerosis associated with MDR1 gene expression and drug-resistant epilepsy. *Pediatr Neurol* 1999; 21: 731–734.
- Lazarowski A, Czornyj L, Lubienieki F, Girardi E, Vazquez S, D’Giano. ABC transporters during epilepsy and mechanisms underlying multidrug resistance in refractory epileps. *Epilepsia* 2007; 48: 140–149.

- Löscher W. Animal models of drug resistant epilepsy. In: Ling V, editors. *Mechanisms of drug resistance in epilepsy: lessons from oncology*. Chichester: Wiley 2002; 149–58.
- Löscher W, Potschka H. Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 7–14.
- Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette (ABC) gene family. *NeuroRx* 2005; 2: 86–98.
- Lucas PT, Meadows LS, Nicholls J, Ragsdale DS. An epilepsy mutation in the beta1 subunit of the voltage-gated sodium channel results in reduced channel sensitivity to phenytoin. *Epilepsy Res* 2005; 64: 77–84.
- Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003; 55(3): 425–61.
- Mody I, Pearce RA. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABA(A) receptors. *Trends Neurosci* 2004; 27: 569–75.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003a; 306: 124–131.
- Potschka H, Fedrowitz M, Löscher W. Brain access and anticonvulsant efficacy of carbamazepine, lamotrigine, and felbamate in ABCC2/MRP2-deficient TR- rats. *Epilepsia* 2003b; 44: 1479–1486.
- Potschka H, Volk HA, Löscher W. Pharmacoresistance and expression of multidrug transporter P-glycoprotein in kindled rats. *Neuroreport* 2004; 15: 1657–1661.
- Ragsdale DS, Avoli M. Sodium channels as molecular targets for antiepileptic drugs. *Brain Res Rev* 1998; 26: 16–28.
- Regesta G, Tanaganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res* 1999; 34: 109–22.
- Remy S, Gabriel S, Urban BW, Dietrich D, Lehmann TN, Elger CE, et al. A novel mechanism underlying drug-resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* 2003; 53: 469–79.
- Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 2006; 129: 18–35.
- Rizzi M, Caccia S, Guiso G, Richichi C, Gorter JA, Aronica E, Aliprandi M, Bagnati R, Fanelli R, D'Incalci M, Samanin R, Vezzani A. Limbic seizures induce P-

- glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci* 2002; 22: 5833–5839.
- Rogawski MA, Löscher W. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 553–64.
- Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 3–29.
- Schmidt D, Löscher W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia* 2005; 46 (6): 858–877.
- Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, Wood NW, Sisodiya SM. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003; 348: 1442–1448.
- Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain* 2002; 125: 22–31.
- Sisodiya SM, Martinian T, Scheffer GL, a kol. Major vault protein, a marker of drug resistance, is upregulated in refractory epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44: 1388–96.
- Sperk G, Furtinger S, Schwarzer C, Pirker S. GABA and its receptors in epilepsy. *Adv Exp Med Biol* 2004; 548: 92–103.
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, HoechliM, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R1495–R1503.
- Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. Voltage-gated calcium channels: targets of antiepileptic drug therapy? *Epilepsia* 1997; 38: 959–65.
- Sun H, Dai H, Shaik N, Elmquist WF. Drug efflux transporters in the CNS. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 83–105.
- Štefaková J, Poledne R, Hubacek JA. ATB-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiology* 2004; 53: 235–243.
- Taylor EM. The impact of efflux transporters in the brain on the development of drugs for CNS disorders. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41 (2): 81–92.
- Tishler DM, Weinberg KT, Hinton DR, Barbaro N, Annett GM, Raffel C. MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 1995; 36: 1–6.

- Volk HA, Potschka H, Löscher W. Increased expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in limbic brain regions after amygdala-kindled seizures in rats. *Epilepsy Res* 2004; 58: 67–79.
- Zelcer N, Reid G, Wielinga P, Kuil A, van der Heijden I, Schuetz JD, Borst P. Steroid and bile acid conjugates are substrates of human multidrug-resistance protein (MRP) 4 (ATP-binding cassette C4). *Biochem J* 2003; 371: 361–367.

7. Seznam obrázků a tabulek

OBR. 1: TRANSPORTÉROVÁ HYPOTÉZA MULTIDRUG REZISTENCE.	15
OBR. 2: ABC TRANSPORTÉRY HEMATOENCEFALICKÉ BARIÉRY.....	20
OBR. 3: MRP2/MRP2 TRANSPORTÉR.....	27
TABULKA 1: SOUČASNÁ ANTIPILEPTIKA A CÍLOVÉ STRUKTURY, PŘES KTERÉ PRAVDĚPODOBŇE UPLATŇUJÍ SVŮJ TERAPEUTICKÝ ÚČINEK PŘI LÉČBĚ EPILEPSIE.....	7
TABULKA 2: ZVÝŠENÁ EXPRESE MULTIDRUG TRANSPORTÉRŮ V EPILEPTICKÉ MOZKOVÉ TKÁŇI.....	19
TABULKA 3: ZVÝŠENÁ EXPRESE EFLUXNÍCH TRANSPORTÉRŮ U LIDSKÝCH PATOLOGICKÝCH STAVŮ U EPILEPSIE STANOVENÁ POMOCÍ IMUNOCHEMICKÝCH METOD.....	21
TABULKA 4: AKTIVNÍ TRANSPORT AED ZPROSTŘEDKOVANÝ MULTIDRUG TRANSPORTÉRY V MOZKU	23