

4. SOUHRN

Epilepsie je chronické onemocnění mozku různé etiologie, které postihuje 1 – 2 % populace. Pro toto onemocnění jsou charakteristické opakující se záchvaty nekontrolovaného dráždění neuronů mozku. Antiepileptika snižují výskyt motorických a psychických projevů epilepsie tím, že redukcí křečového pohotovosti organismu. Základní mechanismus účinku antiepileptik tkví ve snížení dráždivosti nervových buněk tvořících paroxysmální vyboje stabilizaci jejich křidového membránového potenciálu. Cílem antiepileptické léčby je dosáhnout stavu bez záchvatů a umožnit tím pacientovi plnohodnotný život.

Přibližně 30 % epileptik tvoří skupinu s farmakorezistencí (refraktentní) epilepsii. Ta je definována jako selhání kontroly epileptických záchvatů navzdory užívání kombinace tří nebo více antiepileptik v maximálních tolerovaných dávkách a představuje vážný klinický problém, který je spojený s vysilujícími psychosociálními potížemi a se zvýšeným rizikem úmrtí pacienta.

Většina pacientů trpících refraktentní epilepsií je rezistentní k téměř všem klinicky používaným antiepileptikům, přestože tato léčiva působí rozdílnými mechanismy. Tento fakt popírá teorii patologických změn specifických vazebných míst pro antiepileptika a podporuje teorii, že se jedná o nespécifický, pravděpodobně adaptabilní mechanismus jako je snížený up-take antiepileptik do mozku. Možnou příčinou tohoto fenoménu by tedy mohla být mezi jinými i up-regulace a ektoopická exprese některých efektivních lékových ABC (ATP-binding cassette) transportérů v hematocentrální kůře (HEB).

Užívání antiepileptik pacienty je často spojeno s více či méně vyjádřenými nežádoucími účinky. Příkladem nežádoucích účinků antiepileptik jsou sedace, zmatenost, ataxie, hepatotoxicita či teratogenní efekty. Dalšími nežádoucími účinky jsou farmakokinetické interakce antiepileptik s léčivými podávanými v průběhu terapie souběžně probíhajících onemocnění. Tyto interakce se mohou projevit zvýšením nebo snížením účinku antiepileptika, stejně tak jako souběžně podávaného léčiva. Zvýšení účinku antiepileptik s sebou nese riziko většího projevu nežádoucích účinků a naopak snížení se může projevit epileptickými záchvaty. Příčinou těchto problémů často bývá léčbou podminěná modulace aktivity a exprese některých efektivních lékových ABC transportérů a metabolických enzymů z rodiny cytochromu P450.

V poslední době je úsilí molekulárních farmakologů směřováno ke studiu mechanismů transkripční regulace genů kódujících zástupce cytochromu P450 a efektivních lékových ABC transportérů. Současně studie ukázaly, že transkripční aktivace těchto genů může být kromě jiného řízena i dvěma důležitými nukleárními receptory, konkrétně konstitutivním androgenovým receptorem (CAR, NR113) a pregnanovým X receptorem (PXR, SXR, NR112).

Širokospektré antiepileptikum kyselina valproová má schopnost ovlivnit expresi řady genů, např. inhibice histonových deacetyláz (HDAC). Na základě dosud publikovaných dat o účincích kyseliny valproové jsme vytvořili hypotézu, že v některých případech je zvýšená transkripční aktivita genů (např. *CYP3A4* a *MDR1*) způsobena selektivnějším molekulárním mechanismem než je inhibice HDAC.

Předkládaná dizertační práce se zabývá :

- Interakcí vybraných antiepileptik s efektivními lékovými ABC transportéry a roli studovaných transportérů ve vzniku rezistence vůči antiepileptické léčbě.
- Interakcí kyseliny valproové s konstitutivním androgenovým receptorem (CAR) a pregnanovým X receptorem (PXR) a vlivem této interakce na expresi *CYP3A4* a *MDR1*.

Interakce vybraných antiepileptik s efektivními lékovými ABC transportéry; role studovaných transportérů ve vzniku rezistence vůči antiepileptické léčbě

Prvním efektivním lékovým ABC transportérem objeveným v endocentrálních buňkách HEB byl P-glykoprotein (P-gp). Dále byly ze skupiny efektivních lékových ABC transportérů v HEB detekovány a lokalizovány MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2) a BCRP (breast cancer resistance protein).

Zvýšená exprese těchto ABC transportérů v HEB pacientů trpících farmakorezistencí epilepsií, analogicky s vícečetnou lékovou rezistencí nádorů, je považována za jednu z příčin selhání léčby antiepileptiky. Tato teorie byla navíc podpořena faktem, že některá antiepileptika (např. fenytoin nebo levetiracetam) jsou prokázány v substráty P-gp.

Hlavním cílem naší studie bylo *in vitro* testování interakce vybraných antiepileptik s lidským BCRP transportérem. Studie byly provedeny pomocí i) transportních experimentů a ii) akumulčních studií. Testování bylo zástupci všech tří generací antiepileptik: fenytoin, fenobarbital, primidon a etosuximid (1. generace), kyselina valproová, karbamazepin a klonazepam (2. generace) a lamotrigin (3. generace).

- ad i) Pomocí transportních experimentů na monovstivých tvořených polarizovanými MDCKII buňkami (Madine-Darby Canine Kidney Cells) trvale transfekovanými cDNA lidského BCRP (MDCKII-BCRP) jsme v rámci skupiny vybraných antiepileptik neidentifikovali žádný substrát BCRP.
- ad ii) Akumulční experimenty provedené v MEF3.8 buňkách trvale transfekovaných cDNA humanního BCRP (MEF3.8-BCRP) odhalily pouze mírný efekt kyseliny valproové (500 μ M) na buňčnou akumulaci fluorescenčního substrátu BCRP BODIPY FL prazosinu. Tento inhibiční efekt ovšem nebyl potvrzen pomocí druhého přísunu, v kterém bylo využito jiného fluorescenčního substrátu BCRP cytosolická mitoxantromu. Fluorescence BODIPY FL prazosinu byla stanovována fluorimetrem v buněčném lysátu a fluorescence mitoxantromu byla měřena průtokovým cytometrem v inakčních buňkách. Ostatní studovaná antiepileptika při testovaných koncentracích neměla žádný modulární vliv na aktivitu transportu BODIPY FL prazosinu ani mitoxantromu zprostředkovaného BCRP transportérem.

Ze získaných dat usuzujeme, že se BCRP pravděpodobně nepodílí na vzniku rezistence pacientů vůči vybraným antiepileptikům. Navíc, testovaná antiepileptika v terapeuticky relevantních koncentracích zřejmě nemají inhibiční vliv na BCRP-zprostředkovaný transport ani v hematocentrální kůře ani v jiných tkáních exprimujících BCRP (střevo, placenta aj.). Pozorovány inhibiční efekty kyseliny valproové nebyl našimi experimenty plně potvrzen, proto můžeme pouze spekulovat, zda je kyselina valproová inhibítoem BCRP-zprostředkovaného transportu.

Interakce kyseliny valproové s konstitutivním androgenovým receptorem (CAR) a pregnanovým X receptorem (PXR); vliv této interakce na expresi *CYP3A4* a *MDR1*

PXR a CAR jsou nukleární receptory regulující míru transkripční aktivity mnoha genů kódující cytochrom P450 (např. *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19*) a ABC transportéry (např. *MDR1*). Aktivovaná forma nukleárního receptoru CAR nebo PXR vytváří ve většině případů heterodimer s RXRa (receptorem X pro 9-cis retinovou kyselinu α), který se následně váže k responzivnímu elementu v promotorové oblasti cíleho genu a indukce jeho transkripci.