

Epilepsi ile Savaş Haftası Ulusal Epilepsi Sempozyumu Etkinlikleri'nden (8-14 Haziran 2001, İstanbul)

Basic mechanisms of genetic absence epilepsy in rats

Sıçanlarda genetik absans epilepsinin temel mekanizmaları

Dr. Doug A. Richards

Department of Pharmacology, Medical School, University of Birmingham, B15 2TT, United Kingdom

Introduction

Human absence epilepsy is a condition mainly affecting children. It is characterised by a sudden cessation of activity associated with bilateral, synchronous spike and wave discharges (SWD) (~3 Hz) on the electroencephalogram (EEG). At present, this condition is most commonly treated with ethosuximide and valproate. Our understanding of the mechanisms underlying absence epilepsy has been greatly facilitated by the use of a variety of animal models, some of which exhibit spontaneous absence seizures whilst, in others, the seizures are chemically induced. The Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS) is an example of the former, and has been fully validated as a model of human absence epilepsy on the basis of neurophysiological, behavioural, genetic and pharmacological studies.^[1] As with the human condition, the SWD are dependent on cortical and thalamic structures, and the major two differences by which the GAERS model differs from the human condition is in the frequency of the SWD (5-8 Hz) and in the ontogeny. This presentation will review data obtained from *in vivo* studies of GAERS under the guidance of Professor Norman Bowery at the School of Pharmacy in London and at the University of Birmingham.

In vivo techniques for monitoring GAERS

Thalamic neurones can shift between oscillatory and tonic firing modes, depending on the state of consciousness, due to the GABAergic neurones of the reticular thalamic nucleus (NRT) imposing their oscillatory behaviour on thalam-

ocortical circuitry. Absence seizures may represent an aberration of this rhythmicity in favour of burst firing. The three major brain regions targeted for our studies are, therefore, the ventrobasal complex (VB) of the thalamus that contains the thalamic relay nuclei, the NRT, whose GABAergic neurones project extensively to one another, and to almost all thalamic relay nuclei, and the frontal cortex where glutamatergic neurones project back to the relay nuclei, with axon collaterals innervating the NRT. Spike and wave discharges in GAERS can be recorded from all of these areas but not from other brain regions including medial thalamic nuclei and the hippocampus. Techniques used in our studies include microdialysis, intracerebral microinjections via infusion cannulae, and EEG recording and spectral analysis. The use of depth bipolar twisted-wire electrodes allows EEG recording from specific sites, and after amplification and filtration, display on chart paper and computer-based acquisition. Spike and wave discharges are monitored by (i) expressing duration as a percentage of a given time period, (ii) the number of seizures in a given time period (an index of SWD initiations), and (iii) the average duration of a seizure in a given time period (an index of SWD termination). On-line Fast Fourier Transformation also allows spectral analysis of EEG changes more subtle than the readily discernible SWD.

GAERS and GABA

Evidence for excessive GABAergic neurotransmission as a mechanism underlying SWD is extensive. Agonists of the GABA_A receptor (e.g. muscimol) and the GABA_B receptor (e.g.

baclofen) both increase SWD, as do increasing extracellular GABA levels by GABA transaminase inhibition (e.g. vigabatrin) or the use of uptake inhibition (e.g. tiagabine). Most significantly, antagonists of GABA_B but not GABA_A receptors produced a marked reduction in absence seizures,^[2] raising the possibility that this group of compounds may have potential as novel therapeutic agents for absence epilepsy.^[3] Work in our laboratory excluded a difference in GABA_A or GABA_B receptor density or affinity in the brains of GAERS^[4] or modified transduction of these receptors at the second messenger level^[5] as the causes of excessive GABAergic neurotransmission. However, using microdialysis, we were able to demonstrate increased extracellular levels of GABA in the ventrolateral thalamus of GAERS,^[6] although these levels were not further modified by increasing or decreasing the incidence of SWD with GABA_B agonists or antagonists, respectively. Subsequently, increased extracellular GABA levels were also demonstrated in frontal cortex, a region involved with SWD generation, but not in the hippocampus.^[7] We have also demonstrated a reduction in GABA uptake by thalamic but not cortical synaptosomes from GAERS.^[8]

As mentioned previously, GABA_B antagonists have potential as anti-absence drugs. First-generation phosphinic acid based compounds (e.g. CGP 36742, IC₅₀: 35 µM) together with the much more potent second-generation compounds (e.g. CGP 56999, IC₅₀: 2nM) all demonstrated anti-absence action. However, at doses of around five times the effective anti-absence dose, these compounds became convulsant.^[9] We investigated SCH-50911, a GABA_B antagonist (IC₅₀: 1.1 µM) not containing a phosphinic acid group, and found that this did not demonstrate convulsive properties until administered at fifty times the anti-absence dose.^[10] These differences in convulsive potential may reflect differing affinities for pre- and post-synaptic GABA_B receptor sites although the current lack of selective pharmacological agents precludes the testing of this hypothesis.

In 1997, the GABA_B receptor was cloned^[11] and shown to belong to the family of metabotropic G-protein coupled receptors. Indeed, direct infusion of pertussis toxin into the thalamic relay nuclei of GAERS almost com-

pletely suppressed SWD after 6 days,^[12] implicating G-protein mechanisms, and providing further support for a role for GABA_B receptors in the generation of SWD. Subsequently, the GABA_B receptor has been shown to be a heteromeric structure^[13] with subunit dimers of GBR1a/GBR2 being associated with pre-synaptic sites, and GBR1b/GBR2 with post-synaptic sites.^[14] This opens up the possibility of using antisense strategies to discriminate between pre- and post-synaptic GABA_B effects, and we are currently working on the targeting of specific thalamic structures with antisense oligonucleotides delivered by reverse microdialysis and osmotic pump, with SWD recording giving an immediate indicator of the effects of gene inhibition.

Absence epilepsy and cognition

Anecdotal evidence from the clinic suggests that absence epilepsy patients may have enhanced learning ability. Using an active avoidance paradigm, we have demonstrated enhanced learning in GAERS compared to control rats,^[15] and have also confirmed earlier reports that GABA_B antagonists enhance cognitive performance in a number of species.^[16] As GABA_B antagonists may enhance cognition by modulation of the synaptic release of glutamate, we investigated amino acid levels and EEG activity in the hippocampus of GAERS, a brain region not involved in SWD generation, but which is associated with cognition and learning. Extracellular basal levels of glutamate were shown to be 3 times higher in GAERS than controls,^[17] which may reflect a defect in uptake or metabolism, an increased number of glutamate terminals, increased synaptic strength or a decrease in GABA_B-mediated pre-synaptic inhibition of glutamate release. Furthermore, administration of baclofen produced a pronounced slowing of the hippocampal EEG in GAERS only, whilst the GABA_B antagonist, CGP 56999, produced a shift towards the higher frequency synchronised activity associated with sensory processing in both GAERS and controls.

Ethosuximide and absence epilepsy

Ethosuximide is used clinically for its selective effect on absence seizures. Although its mechanism of action is uncertain, it is widely

believed that it reduces low-threshold Ca^{2+} currents in thalamic neurones, thus dampening oscillations.^[18] However, recent electrophysiological evidence has questioned this hypothesis,^[19] and we have demonstrated that when microinfused at various doses directly into VB of GAERS, ethosuximide produces only a small reduction in SWD when compared to systemic administration.^[20] Furthermore, this reduction is delayed, perhaps reflecting diffusion of the drug to other thalamic areas. In contrast, microinfusion of the GABA_B antagonist, CGP 36742, produced an immediate and almost complete cessation of SWD,^[20] indicating that GABA_B antagonists and ethosuximide have different sites of action for their anti-absence effects. More recently we have shown that microinfusion of ethosuximide directly into NRT also has a reduced and delayed effect on SWD reduction, and it may be that the drug needs to target both sites simultaneously in order to produce a decrease in SWD comparable to that seen with systemic administration. This is currently being addressed by administering the drug over a larger area by reverse microdialysis.

References

- Marescaux C, Vergnes M, Depaulis A. Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg—a review. *J Neural Transm Suppl* 1992;35:37-69.
- Liu Z, Vergnes M, Depaulis A, Marescaux C. Evidence for a critical role of GABAergic transmission within the thalamus in the genesis and control of absence seizures in the rat. *Brain Res* 1991;545:1-7.
- Marescaux C, Vergnes M, Bernasconi R. GABAB receptor antagonists: potential new anti-absence drugs. *J Neural Transm Suppl* 1992;35:179-88.
- Knight AR, Bowery NG. GABA receptors in rats with spontaneous generalized nonconvulsive epilepsy. *J Neural Transm Suppl* 1992;35:189-96.
- Lemos T, Parry KP, Richards DA, Bowery NG. (-) Baclofen inhibits forskolin-stimulated cyclic AMP production in ventrolateral thalamic nucleus of epileptic and non-epileptic rats. *Br J Pharmacol* 1995;114:304P.
- Richards DA, Lemos T, Whitton PS, Bowery NG. Extracellular GABA in the ventrolateral thalamus of rats exhibiting spontaneous absence epilepsy: a microdialysis study. *J Neurochem* 1995;65:1674-80.
- Goren MZ, Richards DA, Turner H, Bowery NG. Extracellular GABA levels are increased in brain regions associated with the generation of absence seizures. *Br J Pharmacol* 1997;122:83P.
- Sutch RJ, Davies CC, Bowery NG. GABA release and uptake measured in crude synaptosomes from Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS). *Neurochem Int* 1999;34:415-25.
- Vergnes M, Boehrer A, Simler S, Bernasconi R, Marescaux C. Opposite effects of GABAB receptor antagonists on absences and convulsive seizures. *Eur J Pharmacol* 1997;332:245-55.
- Richards DA, Bowery NG. Anti-seizure effects of the GABAB antagonist, SCH-50911, in the genetic absence epilepsy rat from Strasbourg (GAERS). *Pharmacology Reviews and Communications* 1996;8:227-30.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, et al. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 1997;386:239-46.
- Bowery NG, Parry K, Boehrer A, Mathivet P, Marescaux C, Bernasconi R. Pertussis toxin decreases absence seizures and GABA(B) receptor binding in thalamus of a genetically prone rat (GAERS). *Neuropharmacology* 1999;38:1691-7.
- Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, et al. GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 1998;396:683-7.
- Billinton A, Upton N, Bowery NG. GABA(B) receptor isoforms GBR1a and GBR1b, appear to be associated with pre- and post-synaptic elements respectively in rat and human cerebellum. *Br J Pharmacol* 1999;126:1387-92.
- Getova D, Bowery NG, Spassov V. Effects of GABAB receptor antagonists on learning and memory retention in a rat model of absence epilepsy. *Eur J Pharmacol* 1997;320:9-13.
- Mondadori C, Jaekel J, Preiswerk G. CGP 36742: the first orally active GABAB blocker improves the cognitive performance of mice, rats, and rhesus monkeys. *Behav Neural Biol* 1993;60:62-8.
- Richards DA, Morrone LA, Bowery NG. Hippocampal extracellular amino acids and EEG spectral analysis in a genetic rat model of absence epilepsy. *Neuropharmacology* 2000;39:2433-41.
- Coulter DA, Huguenard JR, Prince DA. Differential effects of petit mal anticonvulsants and convulsants on thalamic neurones: calcium current reduction. *Br J Pharmacol* 1990;100:800-6.
- Leresche N, Parri HR, Erdemli G, Guyon A, Turner JP, Williams SR, et al. On the action of the anti-absence drug ethosuximide in the rat and cat thalamus. *J Neurosci* 1998;18:4842-53.
- Richards DA, Bowery NG, Leresche N, Crunelli V. Weak anti-absence action of ethosuximide infused directly into the ventrobasal thalamic complex in a genetic rat model of absence epilepsy. *Br J Pharmacol* 2000;129:108P.

Farmakogenetik ve epilepsi

Pharmacogenetics and epilepsy

A. Şükrü Aynacıoğlu

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, 20020 Kınıklı, Denizli

İlaç yanıtında, genetik kontrollü farklılıklar sonucu bireyler arası önemli değişiklikler gözlenmektedir. Bu durum, bir yandan yetersiz ilaç tedavisine diğer yandan da ilaçlara bağlı toksik reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olabilir. Hastanın yaşı, ilaç-ilaç etkileşimleri, eliminasyon organlarındaki fonksiyon bozuklukları ya da diğer hastalıkların varlığı, ilaçların plasebo etkisi ilaç yanıtını değiştirebilen önemli risk faktörleridir. Ancak bunlardan belki de daha önemlisi, ilaçların kinetiği ve dinamiğini değiştirebilen genetik faktörlerdir. İlaçların ve diğer ksnobiyotiklerin metabolizmasına karışan birçok enzimin, ilaç transport proteininin, ilaç reseptörünün ve iyon kanalının polimorfik yapıda olduğu saptanmıştır. Bir popülasyonda mutant ya da varyant genler, %1'den fazla sıklıkta bulunuyorsa, buna genetik polimorfizm adı verilir. Polimorfizm sonucu ilaç etkinliği değişebildiği gibi, bazı hastalıklara yatkalanma riski artabilmektedir.^[1]

Başta ilaç metabolize eden enzimlerin etkinliği olmak üzere, polimorfik yapıların işlevleri, bireyden elde edilen DNA örnekleri kullanılarak saptanabilir (genotipleme). Farmakogenetik alanındaki moleküler çalışmalar, esas olarak ilaç metabolize eden enzim polimorfizmlerinin karakterize edilmesi ve ilgili genlerin klonlanmaları ile başlamıştır. İlaç metabolizmasına karışan polimorfik enzimlerden en iyi araştırılmış olanların başında N-asetiltransferazlar ve sitokrom P-450 enzimleri (CYP2D6, 2C19, 2C9 gibi) gelmektedir (Tablo 1).

İlaçların yaklaşık %25'inin oksidatif metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 enzimi, debrizokin 4-hidroksilaz'dır (CYP2D6). CYP2D6, terapötik indeksi dar ve dolayısıyla ilaç tedavisinin yetersiz kalmasına ya da toksik reaksiyonların daha kolay ortaya çıkmasına neden olabilecek bir çok ilacın metabolizmasında rol oynamaktadır (Tablo 1 ve 2).

CYP2D6 aktivitesi bireyler arasında ve toplumlar arasında önemli oranda değişkenlik göstermektedir. Toplumlarda yavaş, orta, hızlı ve ultrahızlı CYP2D6 etkinliğine sahip başlıca dört grup birey ayırt edilmektedir. Avrupa toplumlarında CYP2D6 yavaş ve ultrahızlı sıklıkları yaklaşık olarak sırasıyla %7 ve %1'dir. Türklerde bu sıklıkların tam tersi, yani yavaş metabolizör sıklığı %1-2 ve ultrahızlı metabolizör sıklığının %8 dolayında olduğu bildirilmiştir.^[2] CYP2D6 gen defekti sonucu (yavaş metabolizör), bu enzimle metabolize olan ilaçlar daha yavaş metabolize edileceğinden, ilaçların etki süreleri uzar ve yan etkiler daha kolay ortaya çıkabilir. Ultrahızlı bireylerde ise, ilaçların terapötik dozlarda uygulanmasıyla yeterli tedavi elde edilmeyebilir ve ilaç dozunun artırılması gerekebilir.

CYP2C19 oksidasyon polimorfizmi, ilaç metabolize eden enzim polimorfizmleri içerisinde en fazla araştırılmış olanlardan biridir. Bu polimorfizm, mefenitoine ek olarak diazepam, fenobarbital ve omeprazol gibi klinik olarak önemli ilaçların metabolizmasını etkilemektedir. Avrupa toplumlarının %3-5'inde ve Asya

TABLO 1

Genetik polimorfizm gösteren bazı enzimler ve substratları

Enzim	Substrat
NAT2	İzoniazid, prokainamid, hidralazin, sulfonamidler, ksenobiyotikler
CYP2C9	Fenitoin, non-steroidal antiinflamatuvar ilaçlar, tolbutamid, varfarin, losartan
CYP2C19	Diazepam, omeprazol, proguanil, propranolol, S-mefenitoin, heksobarbital, imipramin
CYP2D6	Antiarritmikler, antihipertansifler, beta-blokerler, MAOI, morfin türevleri, antipsikotikler, TAD ve ondansetron, tropisetron, deprenil, perheksilin

TABLO 2

Psikiyatrik ve nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılan başlıca CYP2D6 substrat örnekleri

Amitriptilin	Klomipramin	Klozapin
Desipramin	Desmetilsitalopram	Fluvoksamin
Fluoksetin	Haloperidol	İmipramin
Maprotilin	Mianserin	Nortriptilin
Olanzapin	Paroksetin	Perfenazin
Risperidon	Tioridazin	Tranilsipromin
Venlafaksin	Zuklopentiksol	

toplumlarının da %13-23'ünde bu enzim aktivitesi bakımından tam bir yetersizlik durumu vardır. CYP2C19 polimorfizminin fenobarbital farmakokinetiğine etkisinin incelendiği bir araştırmada, yavaş metabolizörlerde fenobarbital klirensinin %18.8 oranında azaldığı ve bu nedenle fenobarbital dozunun daha rasyonel olarak ayarlanmasında CYP2C19 genotip tayininin yararlı olabileceği vurgulanmaktadır.^[3] Yine, 18 sağlıklı Çinli bireye tek bir oral doz (5 mg) diazepam (DZP) verilerek DZP ve onun bir aktif metaboliti olan desmetildiazepam (DMDZP) farmakokinetiklerinin araştırıldığı bir çalışmada, yavaş metabolizörlerde hem DZP hem de DMDZP'nin eliminasyon yarılanma ömürlerinin ve etki sürelerinin, orta ve hızlı metabolizörlere göre çok uzadığı bildirilmiştir.^[4]

Diğer polimorfik bir enzim olan CYP2C9 fenitoin başta olmak üzere, tolbutamid, varfarin ve ibuprofen gibi birçok ilacın metabolizmasını katalize etmektedir. Klasik antiepileptik ilaçlardan biri olan fenitoin metabolizmasının CYP2C9 yavaş metabolizörlerde önemli oranda azaldığı bildirilmiştir.^[5] Ek olarak, ilaçların absorpsiyonunda bir engel görevi gören p-glikoprotein'in fonksiyonel bir mutasyonunu taşıyan bireylerde fenitoin plazma konsantrasyonunun daha yüksek olduğu da bulunmuştur.^[6] Dolayısıyla, ilaç metabolize eden enzimlerin yanı sıra, ilaç absorpsiyonunda rolü olan bazı proteinlerin etkinliklerinin bireyler arası farklılık göstermesi de, ilaçların plazma konsantrasyonlarının değişmesine katkıda bulunmaktadır.

Reseptör polimorfizmleri de ilaç etkinliğini değiştirebilmekte ve bazı hastalıklara yatkınlığı artırabilmektedir. Örneğin, nöronal nikotinik asetilkolin reseptörün (nAChR) bir komponenti olan alfa-4 subunitindeki bir mutasyon sonucu karbamazepine duyarlılığın üç kat arttığı bildirilmiştir.^[7] Nörotransmisyonu aracılık eden mü-opioid reseptörlerindeki Asn40Asp polimorfizminin absens tipi tutarıkların oluşumuna katkıda bulunduğu ve nöronal eksitabiliteyi fonksiyonel Asp40 varyantının modüle edebileceği bildirilmiştir.^[8]

Sonuç olarak, ilaç metabolize eden enzimlerde, reseptörlerde, transport proteinlerinde ve iyon kanallarındaki polimorfizmler ilaç yanıtını değiştirebilmekte ve bazı hastalıklara yatkınlık konusunda bilgiler vermektedir.

Patsalos'un bir makalesinin özet bölümü şu şekildedir: Son zamanlara dek, epilepside ilaç tedavisi daha çok ampirikti. Ancak, son yıllarda, tutarık nörokimyası ve antiepileptik ilaçların etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılması üzerine ilaç tedavisi daha rasyonel duruma gelmiştir. Bununla birlikte, hangi hastanın hangi antiepileptik ilaca yanıt vereceğini ya da hangi hastada ilaç yan etkisinin ortaya çıkacağını öngörmek pek olası değildir.^[9]

Ancak ilaç metabolizmasındaki genetik polimorfizmlerin saptanması (i) doz-konsantrasyon ilişkisindeki değişikliklerin, (ii) yan etkilere duyarlılığın ve (iii) ilaca dirençli tutarıklara yatkınlığın anlaşılmasına anlamlı katkı sağlamıştır.

Gelecekte, tedavi bir dizi farmakogenetik testlerle yönlendirilecek, ki bunlar sadece uygun antiepileptik ilaç (etkinlik ve yan etkiler bakımından) seçiminde değil, aynı zamanda hastalığın antiepileptojenik durumunun ve gelişiminin de izlenmesine yardımcı olacaktır.

Kaynaklar

1. Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. Lancet 2000;356:1667-71.
2. Aynacıoğlu AŞ, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schroder T, et al. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. Clin Pharmacol Ther 1999;66:185-92.
3. Mamiya K, Hadama A, Yukawa E, Ieiri I, Otsubo K, Ninomiya H, et al. CYP2C19 polymorphism effect on phenobarbitone. Pharmacokinetics in Japanese patients with epilepsy: analysis by population pharmacokinetics. Eur J Clin Pharmacol 2000;55:821-5.
4. Qin XP, Xie HG, Wang W, He N, Huang SL, Xu ZH, et al. Effect of the gene dosage of CgammaP2C19 on diazepam metabolism in Chinese subjects. Clin

- Pharmacol Ther 1999;66:642-6.
5. Aynacıoğlu AŞ, Brockmoller J, Bauer S, Sachse C, Güzelbey P, Öngen Z, et al. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:409-15.
 6. Kerb R et al. The predictive value of drug uptake and metabolism for phenytoin plasma levels: a combined analysis. *TPJ-Nature* 2001 (in press).
 7. Picard F, Bertrand S, Steinlein OK, Bertrand D. Mutated nicotinic receptors responsible for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy are more sensitive to carbamazepine. *Epilepsia* 1999;40:1198-209.
 8. Sander T, Berlin W, Gscheidel N, Wendel B, Janz D, Hoehe MR. Genetic variation of the human mu-opioid receptor and susceptibility to idiopathic absence epilepsy. *Epilepsy Res* 2000;39:57-61.
 9. Patsalos PN. Antiepileptic drug pharmacogenetics. *Ther Drug Monit* 2000;22:127-30.