

**Fynd i levande human
hjärnvävnad kan leda till
nya behandlingar av
epilepsi**

Att hitta nya behandlingsstrategier för neurologiska sjukdomar som i dag inte har någon bot är en av neurologins stora utmaningar. En av svårigheterna är att många nya behandlingsalternativ tar sig ända fram till kostsamma, kliniska prövningar och misslyckas. Knappt en av tio kommer ut som godkänd behandling av de som går till klinisk prövning.

Ett nedslående resultat som gjort att många läkemedelsföretag inte väljer att satsa på utveckling av läkemedel eller behandlingar för neurologiska sjukdomar och CNS-sjukdomar i synnerhet. Nya angreppssätt behövs för att öka underlaget inför valet av relevant behandlingsstrategi att gå vidare med, med förhoppning om att denna ska vara lika effektiv i människa som i djur. I denna artikel beskriver **My Andersson**, med dr, och **Mérib Kokaia**, professor, Epilepsicentrum, Lunds universitet, sin studie vars resultat på sikt kan få betydelse för personer med läkemedelsresistent epilepsi.

Vid fokal läkemedelsrefraktär epilepsi, och då speciellt temporallobsepilepsi (TLE), kan patienten som ett sista behandlingsalternativ få den anfallsgenererande regionen bortopererad. Denna vävnad kan sedan hållas vid liv som akut-snittade skivor. Detta ger en unik möjlighet att testa nya behandlingsstrategier direkt i anfallsgenererande patientvävnad.

Ett exempel på en lovande behandlingsstrategi utarbetad i djurmodeller är genterapi. Gener kan levereras med hjälp av bland annat modifierade virusvektorer, som till exempel adeno-associerade virusvektorer (AAV), och styras till uttryck i olika cellpopulationer. För TLE har AAV-medierat överuttryck av de endogena neuropeptiderna galanin och neuropeptid Y (NPY) visat sig vara mycket effektiva i att dämpa anfall i djurmodeller av sjukdomen.^{1,2} TLE är en svår form av epilepsi där så många som en dryg tredjedel av patienterna är läkemedelsrefraktära³ och behovet att utveckla nya behandlingsalternativ är stort.

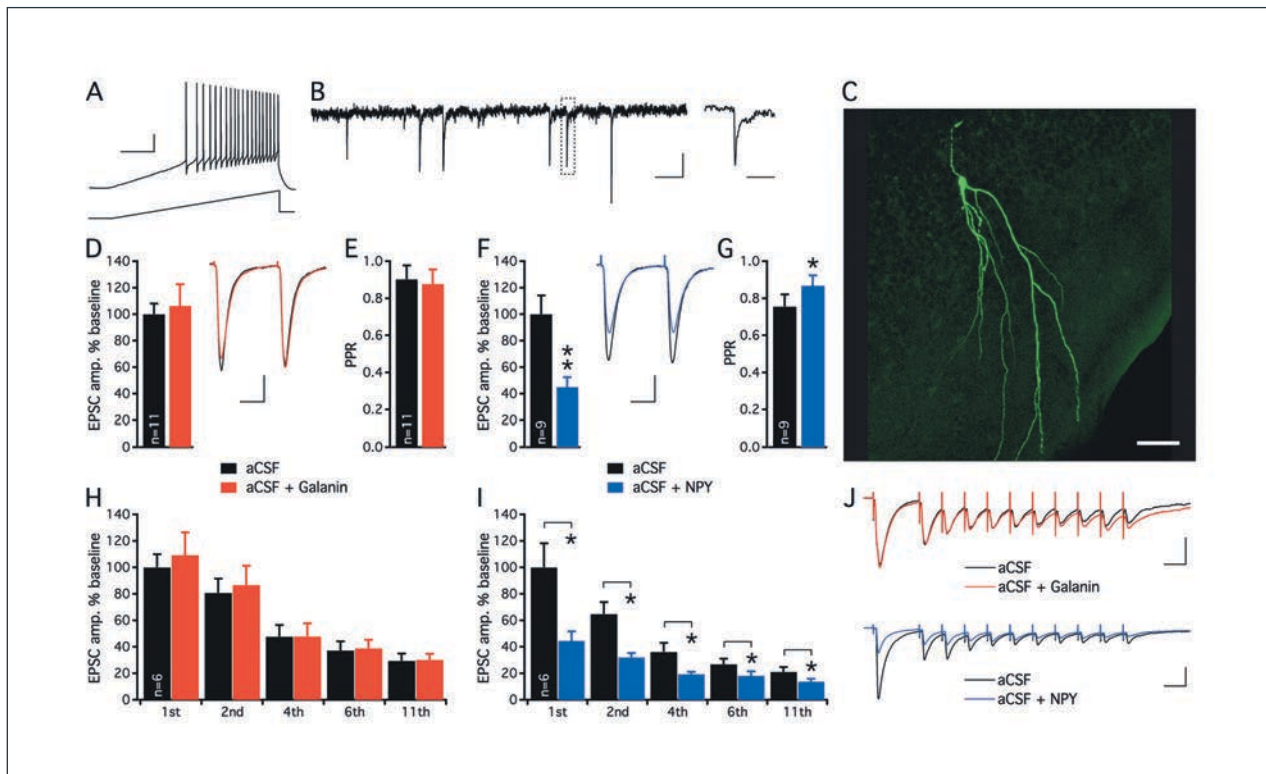
NPY OCH GALANIN I DJURMODELLER

NPY uttrycks hos både människa och gnagare i specifika populationer av hämmande GABAerga interneuron över hela hjärnan och även då temporalloberna och hippocampus. Galanin har en mer utspridd distribution, men hittas i nervceller och nervtrådar i flera hjärnregioner hos människor och gnagare, hippocampus inkluderat.

Båda neuropeptiderna har visats sig verka hämmande på retbarheten hos nerver, både vid fysiologisk nervaktivitet hos gnagare och vid olika former av akuta och kroniska djurmodeller av TLE.⁴ Det är däremot inte känt om någon av dessa peptider har en effekt i human epileptisk vävnad. Vi har undersökt detta i akuta hjärnskivor från hippocampusresektat från läkemedelsrefraktära TLE-patienter och har kunnat

”Gener kan levereras med hjälp av bland annat modifierade virusvektorer, som till exempel adeno-associerade virusvektorer (AAV), och styras till uttryck i olika cellpopulationer.”

EXCITATORISK SYNAPTISK TRANSMISSION I GYRUS DENTATUS FRÅN HUMAN EPILEPTISK VÄVNAD HÄMMAS AV NPY-APPLIKATION MEN INTE AV GALANIN.



Figur 1. A) Exempelsvep från en hel-cells patch-clamp-inspelning av en korncell i hippocampuskiva, gyrus dentatus från en TLE-patient. Cellen uppvisar snabba repetitiva aktionspotentialer när cellen depolariseras med en 300 pA strömapplikation. Kalibrering: 20 mV och 200 ms. B) Spontana postsynaptiska strömmar inspelade i en korncell vid -70 mV. Det markerade område är förstort bredvid. Kalibrering: 10 pA, 200 och 20 ms. C) Exempel av en cell identifierat efter inspelning av en korncell med hjälp av immunohistokemi (Alexa 488-conjugerad streptavidin märker in intracellulär biocytin). Kalibrering: 50_μm. D) Galanin påverkar inte amplituden av excitatoriska postsynaptiska strömmar (EPS). Inset, representativa svep av EPS utan (svart) och med galaninapplikation (rött). Kalibrering: 80 pA och 20 ms. E) Förhållandet mellan första och andra EPS:en (paired-pulse ratio, PPR) är oförändrad vid galaninapplikation. F) NPY-applikation minskar amplituden av EPS. Inset, representativa svep av EPS utan (svart) och vid NPY-applikation (blått). Kalibrering: 50 pA och 20 ms. G) NPY-applikation ökar PPR vilket tyder på att NPY minskar frisättningssannolikheten av glutamat. H, I) NPY-applikation hämmar amplituden hos EPS:er genom hela stimuleringsstället (40 Hz). J) Exempelsvep av tåg av EPS:er, utan (svart), med galanin- (rött) respektive NPY-applikation (blått). Kalibrering: 25 ms, 100 pA; *p<0.05, **p<0.01.

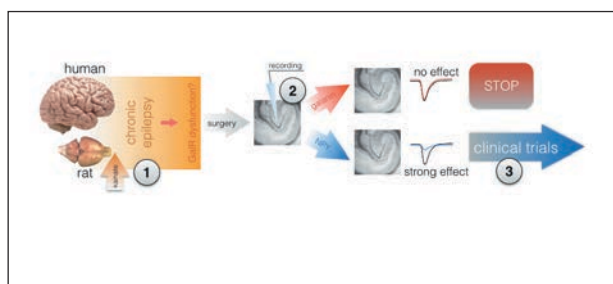
konstatera att NPY, men inte galanin, minskar excitatorisk synaptisk aktivitet på principalceller i epileptisk hippocampus.

STUDIENS GENOMFÖRANDE

Studien inkluderade vävnad från 13 patienter med en medicinsk historia av frekventa återkommande anfall, vilka inte hade anfallskontroll trots behandling med två eller fler anti-epileptiska läkemedel. Av dessa uppvisade 11 uttalad skleros av hippocampus vid patologisk undersökning av vävnaden. För att bedöma viabiliteten av skivorna började vi våra försök med att mäta elektrofysiologiska egenskaper hos enskilda principala celler i hel-cells patch-clamp. Alla registrerade celler uppvisade snabba aktionspotentialer vid depolarisering (Figur 1A). Dessa och andra elektrofysiologiska membranegenskaper som input-resistans samt postsynaptiska strömmar (Figur 1B) skiljde sig inte åt mellan patienter. Vi kunde bekräfta cellens identitet morfologiskt post hoc genom att fylla cellen med biocytin via patch-pipetten och efter para-

”Vi har undersökt detta i akuta hjärn-skivor från hippocampusresektat från läkemedelsrefraktära TLE-patienter och har kunnat konstatera att NPY, men inte galanin, minskar excitatorisk synaptisk aktivitet på principalceller i epileptisk hippocampus.”

FLÖDESSCHEMA FÖR GENTERAPI MOT EPILEPSI.



Figur 2. Schematisk ritning för att illustrera vikten av att validera resultat från djurstudier i human epileptisk vävnad. Vi behöver ta hänsyn till tre viktiga aspekter då vi överväger nya behandlingsmål för läkemedelsresistent epilepsi. Potentiella antiepileptika måste testas i epileptiska djur med återkommande anfall då effekten av dessa preparat eller strategier kan skilja sig markant från effekten på anfall i naiva djur (1). Verknings effekt måste valideras i humanvävnad då denna kan skilja sig från gnagare (2). Beslutet att fortsätta till kliniska prövningar måste baseras på resultat från både djur och humanvävnad för att minimera risken för negativ utgång av den kliniska prövningen (3).

formaldehydfixering låta biocytin reagera med streptavidin bundet till fluorofor (Alexa 488, Figur 1C). I vårt första försök undersökte vi om galanin eller NPY kunde hämma stimuleringsutlöst synaptisk transmission i synapsen mellan mediala perforantbanan (medial perforant path, MPP) och korncellsynapsen. När vi mätte medelamplituden av excitatoriska postsynaptiska strömmar (EPSCs) var den opåverkad av galaninapplikation (Figur 1D), medan NPY hade en markant effekt (Figur 1F). NPY hade också en tydlig effekt på kvoten mellan två efter varandra påföljande utlösta EPSCs (Figur 1G), vilket tyder på att NPY hämmar frisättningen av glutamat i synapsen. Galanin hade inte heller någon effekt vid högfrekvent stimulering (Figur 1H och 1I) medan NPY hade en tydlig hämmande effekt genom hela stimuleringståget (Figur 1I och 1J).

För att bekräfta våra resultat upprepade vi försöket i extracellulära fältregistreringar, där vi kan mäta svaret i stora populationer av synapser från många celler på samma gång. Konsistent med hel-cellsmätningarna såg vi en dramatisk effekt av NPY-applikation på fältsvaret med en tredjedel. För att undersöka om skillnaden i effekt mellan galanin och NPY var begränsad till gyrus dentatus, upprepade vi fältregistreringarna i CA1. Galanin hade fortfarande ingen effekt på synaptisk transmission, medan NPY reducerade fältsvaret till hälften.

Från studier i gnagare vet vi att NPY utövar sin hämmande effekt på hippocampal excitatorisk transmission via presynaptiska Y2-receptorer.⁵ För att ta reda på om så också är fallet i human epileptisk vävnad, upprepade vi försöken i närvaro av en specifik Y2-receptorantagonist (BIIE0246). Under dessa förhållanden hade NPY ingen effekt på fältsvaret i CA1 eller gyrus dentatus, vilket är en tydlig indikation på att det är via Y2-receptorn som NPY hämmar presynaptisk glutamatfrisättning också i human epileptisk hippocampus.

DISKUSSION OCH SLUTSATS

Men vad var då anledningen till att galanin inte hade någon effekt? Vi funderade om avsaknaden av effekt vid galaninapplikation berodde på att signalering via galaninreceptorer saknades. Inbindning av radioaktivt galanin visade att receptorn fanns uttryckt. Genom ett funktionellt bindningstest kunde vi se att även om receptorn fanns där, utlöstes ingen signal nedströms om receptorn vid applikation av galanin. Samma test för NPY visade att Y2-receptorn för NPY var både uttryckt och fungerande i human epileptisk hippocampus.

Sammantaget kan vi dra slutsatsen att NPY är en övertygande kandidat för utvecklandet av framtida behandlingsstrategier för TLE, medan funktionen av galaninreceptorn är nedreglerad i human epileptisk hippocampus.

I vår studie kunde vi även visa att hippocampal vävnad från TLE-patienter kan ge oss en unik möjlighet att validera nya behandlingsstrategier, utvecklade i djurmodeller, direkt i relevant patientvävnad. Då kliniska prövningar är väldigt kostsamma, skulle en utvärdering av go/no-go baserat på studier i human vävnad signifikant öka chanserna för ett fördelaktigt utfall (exempel på flödesschema, Figur 2).

Ledri M, Sørensen AT, Madsen MG, Christiansen SH, Ledri LN, Cifra A, Bengzon J, Lindberg E, Pinborg LH, Jespersen B, Götzsche CR, Woldbye DP, Andersson M, Kokaia M. Differential Effect of Neuropeptides on Excitatory Synaptic Transmission in Human Epileptic Tissue. J Neurosci 2015; 35(26):9622-9631.



MY ANDERSSON
Med. Dr. Epilepsicentrum, Lunds universitet
my.andersson@med.lu.se



MÉRAB KOKAIA
Professor, Epilepsicentrum, Lunds universitet
merab.kokaia@med.lu.se

REFERENSER

1. Vezzani A, Sperk G and Colmers WF. Neuropeptide Y: emerging evidence for a functional role in seizure modulation. *Trends Neurosci* 1999; 22(1):25-30.
2. Mazarati A, Langel U and Bartfai T. Galanin: an endogenous anticonvulsant? *Neuroscientist* 2001; 7(6):506-517.
3. Duncan JS, Sander JW, Sisodiya SM and Walker MC. Adult epilepsy. *Lancet* 2006; 367(9516):1087-1100.
4. Kokaia M, Holmberg K, Nanobashvili A, Xu ZQ, Kokaia Z, Lendahl U, Hilke S, Theodorsson E, Kahl U, Bartfai T, Lindvall O and Hokfelt T. Suppressed kindling epileptogenesis in mice with ectopic overexpression of galanin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(24):14006-14011.
5. El Bahh B, Balosso S, Hamilton T, Herzog H, Beck-Sickingler AG, Sperk G, Gehlert DR, Vezzani A and Colmers WF. The anti-epileptic actions of neuropeptide Y in the hippocampus are mediated by Y and not Y receptors. *Eur J Neurosci* 2005; 22(6):1417-1430.