

# Epilepsie-onderzoek: *from bed to bench and back to bed?*

De hoeksteen van epilepsiebehandeling is het gebruik van anticonvulsieve medicijnen. Echter, niet iedere patiënt wordt aanvalsvrij met de bestaande medicijnen. Hierdoor is onderzoek naar anticonvulsieve medicijnen met unieke werkingsmechanismen nog steeds noodzakelijk. Er zijn verscheidene strategieën mogelijk bij de zoektocht naar dergelijke middelen, waarbij translatie en *back-translatie* kunnen bijdragen aan nieuwere, innovatieve anticonvulsieve medicijnen voor patiënten met epilepsie wereldwijd.

## Epilepsiebehandeling

Epilepsie komt wereldwijd voor bij ongeveer 70 miljoen mensen en de hoeksteen van epilepsiebehandeling is het gebruik van anticonvulsieve medicijnen (*anti-seizure medication*, ASM). Verscheidene ASM werken via de blokkade van onder andere natrium/calcium ionkanalen, het versterken van de neurotransmissie van gamma-aminoboterzuur, het blokkeren van glutaminerge neurotransmissie, en het stimuleren van *synaptic vesicle protein 2A* (Löscher, 2021).

Ook al zijn er meer dan 30 verschillende ASM op de markt, 30% van de patiënten met epilepsie heeft onvoldoende aanvalscntrole met de huidige ASM. We spreken dan van farmacoresistente epilepsie (López González et al., 2015). Bovendien is epilepsie een zeer heterogene ziekte, waardoor er geen unieke ASM zijn voor iedereen met epilepsie. Hiermee wordt de behoefte voor het ontdekken en ontwikkelen van innovatieve ASM benadrukt. Tot slot wordt ook meer en meer onderzoek gedaan naar ASM die niet enkel de epileptische aanvallen onderdrukken, maar ook bijdragen aan een betere levenskwaliteit en het reduceren van de comorbiditeiten/nevenwerkingen (Holmes, 2021).

## De zebravis als epilepsiemodel

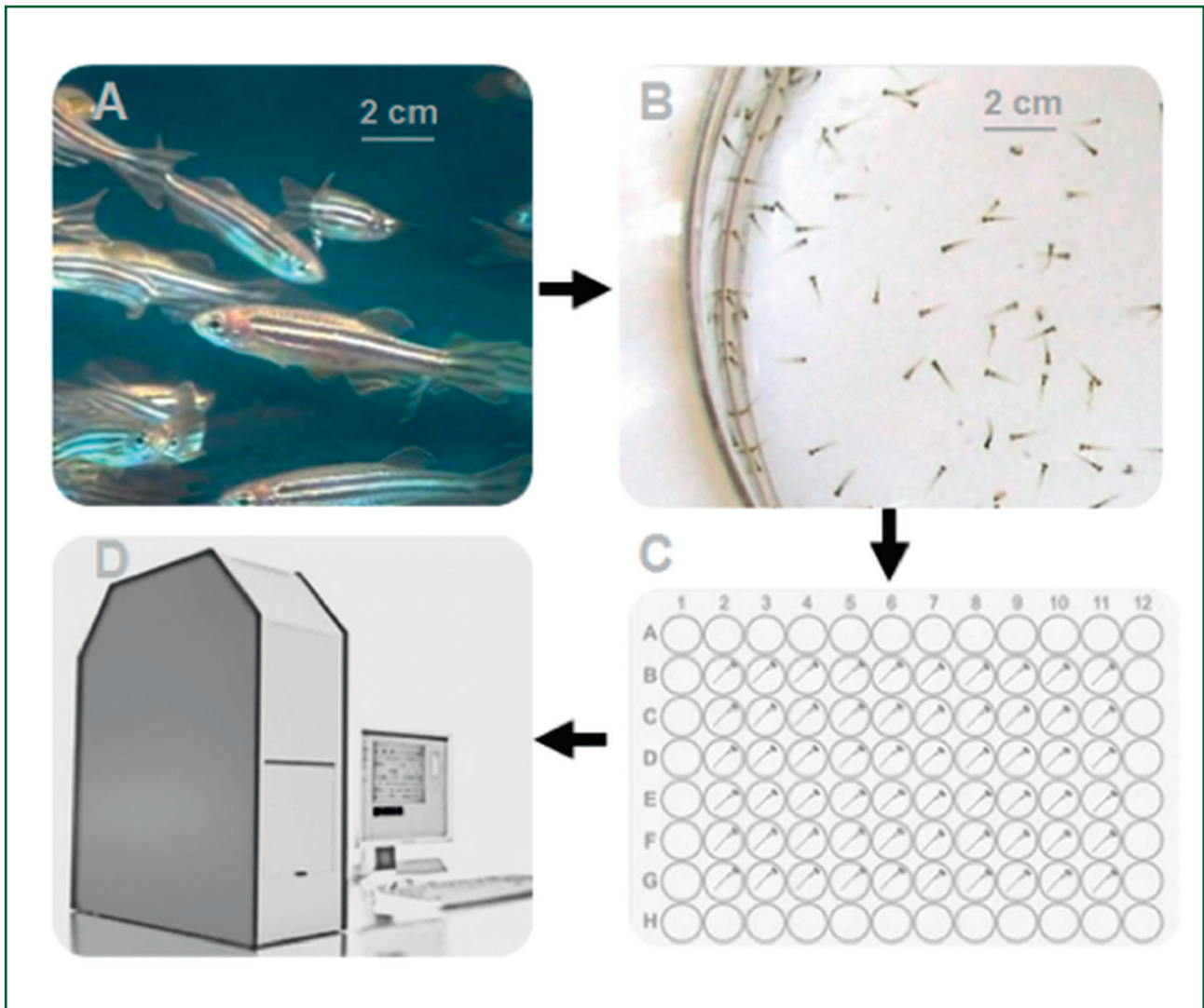
Traditioneel worden voornamelijk knaagdieren gebruikt in het onderzoek naar ASM. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen chemische, elektrische en genetische modellen (Löscher, 2011). Voor een snelle en kostenefficiënte geneesmiddelenontdekking, worden echter ook niet-zoogdiermodellen, zoals de zebravis en drosophila ontwikkeld en gevalideerd (Partoens et al., 2021).

Onderzoek met behulp van de zebravis gaat gepaard

met relatief lage kosten (voor huisvesten van de zebra-vissen en laboratoriumwerk) en relatief minder ethische problemen, zeker in vergelijking met knaagdieren. Bovendien leidt de hoge vruchtbaarheid en snelle voortplanting van zebra-vissen tot de mogelijkheid om een groot aantal experimenten in korte tijd uit te voeren en te herhalen. De zebra-visembryo's zijn relatief groot, nagenoeg transparant en ontwikkelen zich niet in een baarmoeder, zoals bij knaagdieren, wat farmacologische behandelingen en genetische manipulaties vergemakkelijkt vanaf de bevruchting. Zebra-vissen staan beziën vanuit de fylogenetica dichter bij de mens dan andere niet-zoogdieren zoals drosophila en behoren tot de gewervelde dieren (Stewart et al., 2014). Ook worden meer dan 80% van de bekende epilepsie-gerelateerde genen teruggevonden in het zebra-vis-genoom. Onlangs zijn verschillende zebra-visepilepsiemodellen gevalideerd. Dit zijn onder andere koortsgevoelige myoclonische epilepsie (op basis van mutaties in het CHD2 gen en het SCN1A gen) (Sourbron et al., 2019) en koortsgeassocieerde epilepsie (STX1B gen mutatie) (Schubert et al., 2014). Gen manipulatie is onder andere mogelijk door gerichte genoombewerking met behulp van CRISPR/Cas9-technieken (Siekierska et al., 2019). In figuur 1 is schematisch de methode weergegeven van het zebra-visonderzoek naar ASM.

## Zebra-vismodel voor het Dravet syndroom

In de zoektocht naar innovatieve ASM, werd het Dravet syndroom zebra-vismodel ontwikkeld (cfr.infra). Het Dravet syndroom is een van de ernstigste vormen van epilepsie, gekenmerkt door farmacoresistente epileptische aanvallen en talrijke fysieke en aan het gedrag gerelateerde en intellectuele comorbiditeiten. Ongeveer 90%



Figuur 1: Zebrafisnonderzoek naar anticonvulsieve medicatie (gedragsanalyse via locomotoractiviteit analyses): (A) volwassen zebrafissen waarvan embryo's worden bekomen die op de derde dag ontwikkeld zijn tot zebrafislarven; (B) deze larven kunnen in een 96-well plaat worden geplaatst waarbij iedere rij larven met een verschillende stof behandeld wordt; (C) vervolgens gebeurt er een automatische locomotoranalyse; (D) via een computerprogramma. [aangepast van PhD thesis (Sourbron, 2017)]

van de patiënten met het Dravet syndroom heeft een SCN1A-mutatie. Het SCN1A-gen codeert voor het type 1 (subeenheid A) voltage-afhankelijke natriumkanal (sodium channel, voltage gated, type I alpha subunit) en is bovendien het meest voorkomende epilepsiegen.

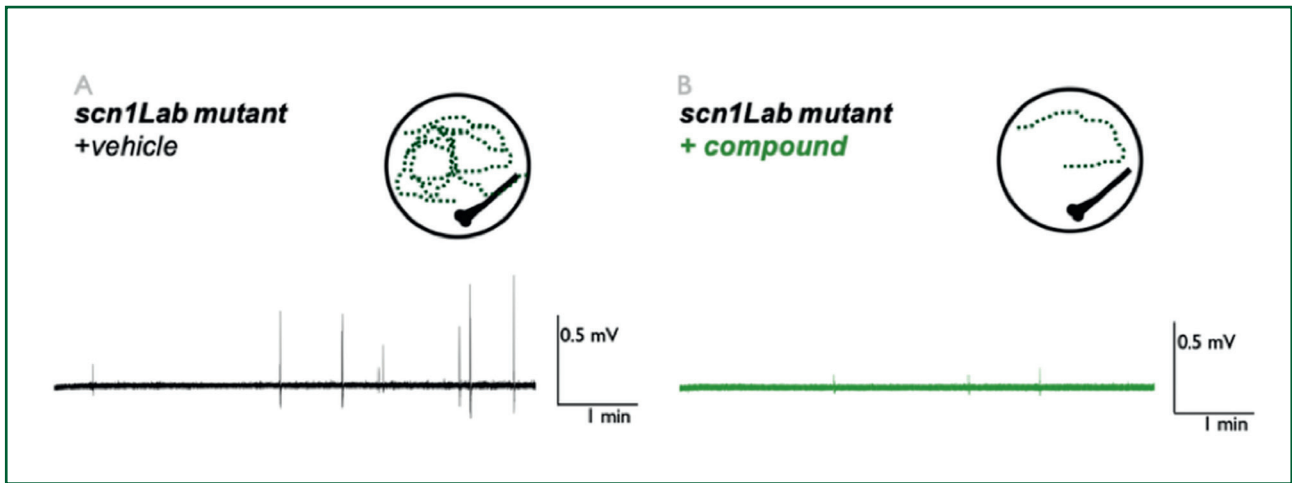
Zebrafissen met een mutatie in het orthologe SCN1A gen (scn1Lab) recapituleren het epileptisch fenotype, alsook enkele comorbiditeiten en *sudden unexplained death in epilepsy patients* (SUDEP) van het Dravet syndroom (Sourbron et al., 2016). Hierdoor zijn zij een geschikt model voor de zoektocht naar ASM voor (farmacoresistente) epilepsie.

Ook al tonen potentiële ASM gunstige anticonvulsieve effecten in diermodellen, er blijven nog steeds belangrijke beperkingen om deze data te vertalen naar mensen; onder andere de farmacokinetische eigenschappen, zoals absorptie, distributie, metabolisme en excretie en de

onbekende langetermijneffecten (Löscher, 2021). Figuur 2 toont als voorbeeld het resultaat van het zebrafisnonderzoek naar ASM.

### **Bedside to bench**

Als voorbeeld van een succesvolle translatie (dat wil zeggen de 'vertaling van preklinisch onderzoek naar de praktijk') en back-translatie in de ontdekking van geneesmiddelen tegen epilepsie beschrijven we het serotonerge geneesmiddel fenfluramine (FA) (Schoonjans et al., 2015). FA was vroeger geregistreerd als een middel tegen obesitas (1973), maar werd uit de handel genomen vanwege cardiotoxische effecten die verband hielden met misbruik, gebruik van andere amfetaminerge medicijnen en/of hoge doses (Elangbam, 2010). In 1985 toonden Aicardi en Gastaut de anticonvulsieve werking van FA aan bij enkele patiënten met *self-induced* epileptische aanvallen. Tussen 1987 en 1996 leverden verschillende gevalsrapporten en



Figuur 2: Zebrafislonderzoek naar anticonvulsieve medicatie (epileptiforme activiteiten via hersenactiviteit analyses): (A) een placebo-behandelde (vehicle) zebrafislarve vertoont meerdere epileptiforme activiteiten (spikes); (B) een zebrafislarve die behandeld is met een potentieel anticonvulsieve stof waarbij een afname in epileptiforme activiteit wordt aangetoond. [aangepast van PhD thesis (Sourbron, 2017)]

kleine open-labelstudies nader bewijs voor de anticonvulsieve werking van FA, zelfs bij kinderen met farmacoresistente aanvallen. In 1996 rapporteerden Boel en Casaer het succes van laaggedoseerd FA bij de behandeling van elf kinderen met farmacoresistente of *self-induced* epilepsie (Schoonjans et al., 2015). Na analyse van de patiëntendosiers en het uitvoeren van genetische tests, werden vijf van deze patiënten gediagnosticeerd met het Dravet syndroom. In 2012 voerden Ceulemans en collega's een retrospectief onderzoek uit naar de anticonvulsieve werking van FA bij patiënten met het Dravet syndroom (Ceulemans et al., 2012). Meer dan 90% had een significante aanvalsreductie, dat wil zeggen minder dan één aanval per maand en 70% was aanvalsvrij. Twee gerandomiseerde gecontroleerde trials bevestigden naderhand de effectiviteit van FA in deze patiënten (Lagae et al., 2019; Nabbout et al., 2020).

Gezien de effectiviteit van FA, maar ook het onbekende mechanisme ervan, werd FA verder onderzocht in diermodellen van het Dravet syndroom. Dit is een voorbeeld van een *bedside to bench* benadering (Sourbron et al., 2017). FA verhoogt de afgifte van serotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) in de synaptische ruimte waardoor verschillende 5-HT receptor subtypes worden gestimuleerd. Vooralnog is het exacte anticonvulsieve werkingsmechanisme van FA niet bekend en is er enige bezorgdheid betreffende mogelijke cardiotoxiciteit (door stimulatie van 5-HT<sub>2B</sub> receptoren). Wij bevestigden het anticonvulsieve effect van FA in een Dravet syndroom zebrafismodel en wij toonden eveneens het anticonvulsieve effect aan van 5-HT<sub>1D</sub>-, 5-HT<sub>2A</sub>- en 5-HT<sub>2C</sub>-agonisten/stimulatoren, alsook van sigma<sub>1</sub> receptor ( $\sigma_1R$ ) modulatie (Sourbron et al., 2017). Dit werd initieel geduid bij een potentieel antagonisme van de  $\sigma_1R$  en meer recente studies tonen aan

dat dit berust op een positieve allosterische modulatie van deze receptor (Martin et al., 2021).

### Bench to bedside

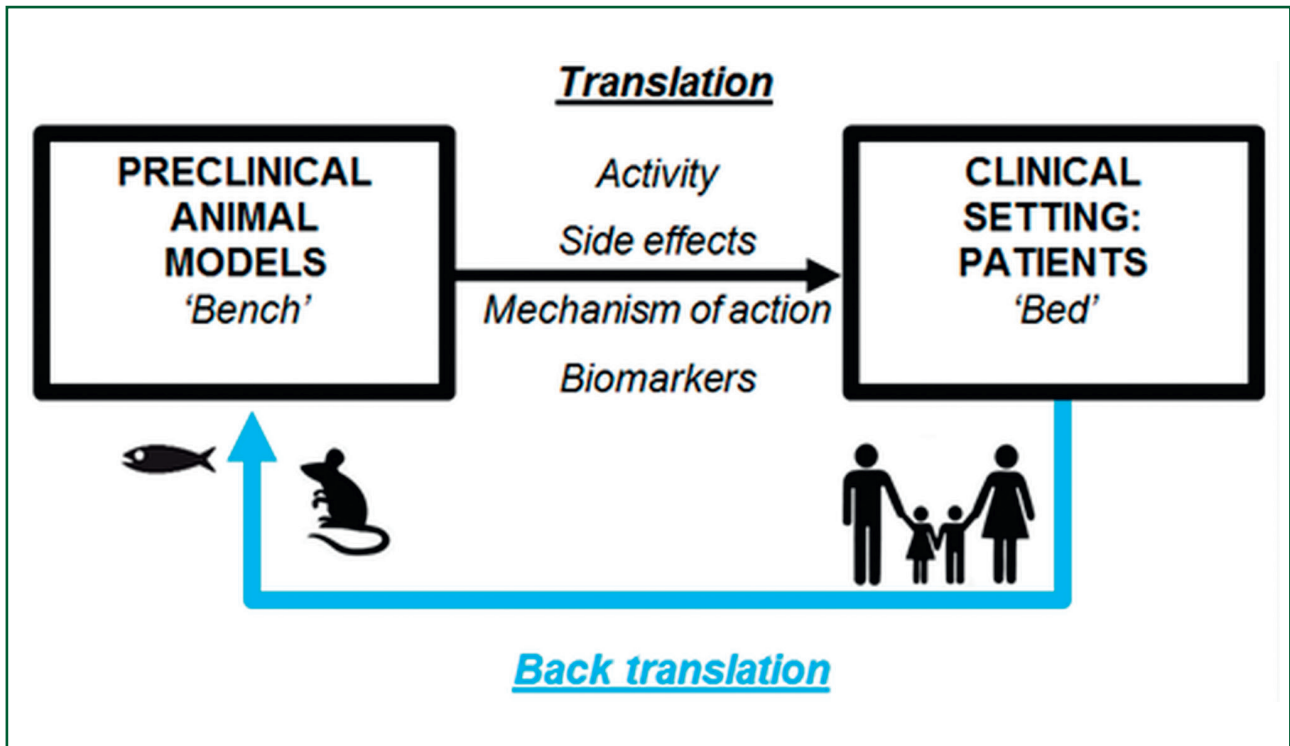
Doordat verscheidene anticonvulsieve mechanismen van FA werden aangetoond (via *back-translatie*), werd het mogelijk om andere geneesmiddelen met een gelijkaardig mechanisme te onderzoeken (*translatie*), waarbij het mogelijk is om nieuwe geneesmiddelen te ontwikkelen of *repurposing* van bestaande geneesmiddelen uit te werken (Johannessen Landmark et al., 2021). Dit is schematisch weergegeven in figuur 3.

### Nieuwe geneesmiddelen

Enkele farmaceutische firma's hebben belangstelling gekregen voor onder andere het positieve allosterische modulerend effect van de  $\sigma_1R$ , maar ook voor de stimulatie van de 5-HT<sub>2C</sub> receptor. Zo is Longboard Pharma op dit moment bezig met klinisch onderzoek om een 5-HT<sub>2C</sub> superagonist, genaamd LP352, verder te ontwikkelen als anticonvulsief geneesmiddel (Longboard website: <https://www.longboardpharma.com/our-approach/#pipeline>, geraadpleegd 04/09/2022). Hetzelfde geldt voor een andere 5-HT<sub>2C</sub> agonist: lorcaserine (EPX-200) (Sourbron et al., 2016).

### Repurposed geneesmiddelen

Onderzoeken met het gevalideerde Dravet syndroom zebrafismodel hebben geleid tot het analyseren van geneesmiddelen die al op de markt zijn voor een andere aandoening. De bedoeling was om na te gaan of deze geneesmiddelen effectief zijn in het Dravet syndroom zebrafismodel en ze zo dus voor een andere aandoening op de markt zouden kunnen komen (*repurposing of existing*



Figuur 3: Translatie en back-translatie in een preklinische en klinische setting in het onderzoek naar anticonvulsieve medicatie. [aangepast van PhD thesis (Sourbron, 2017)]

drugs). Op deze manier hebben wij lisuride onderzocht en dit middel bleek anticonvulsief te zijn in het Dravet syndroom zebrawismodel (Sourbron et al., 2019). Dit geneesmiddel was reeds geregistreerd voor de behandeling van Parkinson (Cacabelos, 2017) gezien zijn dopaminerge activiteit, maar lisuride is ook een potente 5-HT<sub>2A/2C</sub> agonist. Bovendien is het een 5-HT<sub>2B</sub> antagonist en zou het daardoor geen aanleiding geven tot cardiotoxische effecten (Hofmann et al., 2006). Verder toonde eerder onderzoek anticonvulsieve eigenschappen van lisuride aan, zoals in de behandeling van corticale reflexmyoclonus (Obeso et al., 1983) en in enkele knaagdiermodellen voor epilepsie (Zweckberger et al., 2010). Hierdoor zou lisuride -gezien zijn geschikt farmacologisch profiel- een interessante ASM zijn voor verdere geneesmiddelenontwikkeling door middel van translationeel onderzoek.

Dergelijke strategieën, zoals hierboven beschreven voor LP352, lorcaserine en lisuride klinken veelbelovend, maar het is niet volledig uit te sluiten dat het multimodale effect van FA zorgt voor deze sterk anticonvulsieve werking, waardoor stoffen zoals lisuride die slechts op één of enkele mechanismen werken mogelijk niet dezelfde werkzaamheid zullen opleveren.

### Conclusie

Niet alleen translatie, maar ook back-translatie kan bijdragen tot het vinden van innovatieve ASM (Loscher, 2016). Zo kan er via translatie van bench to bed informatie worden

bekomen over de activiteit, nevenwerkingen, biomarkers en mechanisme(n) van een potentieel geneesmiddel. Via de back-translatie is er de mogelijkheid om het diermodel te valideren maar ook om verdere inzichten te verkrijgen over de pathogenese en behandeling van een bepaalde ziekte.

Als voorbeeld hebben we hier fenfluramine beschreven waarvan de effectiviteit in 2012 in een klein cohort epilepsiepatiënten werd beschreven en door middel van back-translatie werd gerecapituleerd in enkele zebrawismodellen voor epilepsie (Sourbron et al., 2017, 2016). Vervolgens gebeurde een translatie waarbij in een pre-klinische setting nieuwe inzichten werden verkregen omtrent andere potentiële geneesmiddelen (lisuride, lorcaserine, LP352). Dit onderzoek droeg ook bij aan de exploratie van het multimodale mechanisme van FA wat niet alleen leidt tot een effectieve behandeling van (farmacoresistente) epilepsie maar waarschijnlijk ook van zijn comorbiditeiten (Cross et al., 2021).

### Referenties

- Cacabelos R (2017). Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *Int. J. Mol.Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
- Ceulemans B, Boel M, Leyssens K, Van Rossem C, et al. (2012). Successful use of fenfluramine as an add-on treatment for Dravet syndrome. *Epilepsia*, 53(7):1131-9. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03495.

- Cross JH, Galer BS, Gil-Nagel A, Agarwal A, et al. (2021). Impact of fenfluramine on the expected SUDEP mortality rates in patients with Dravet syndrome *Seizure* 93, 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2021.10.024>
- Elangbam CS (2010). Drug-induced Valvulopathy: An Update. *Toxicol. Pathol.* 38, 837–48. <https://doi.org/10.1177/0192623310378027>
- Hofmann C, Penner U, Dorow R, Pertz HH, et al. (2006) Lisuride, a dopamine receptor agonist with 5-HT<sub>2B</sub> receptor antagonist properties: absence of cardiac valvulopathy adverse drug reaction reports supports the concept of a crucial role for 5-HT<sub>2B</sub> receptor agonism in cardiac valvular fibrosis. *Clin Neuropharmacol.* 2006 Mar-Apr;29(2):80-6. doi: 10.1097/00002826-200603000-00005.
- Holmes GL (2021). Drug Treatment of Epilepsy Neuropsychiatric Comorbidities in Children *Paediatr. Drugs* 23, 55–73. <https://doi.org/10.1007/s40272-020-00428-w>
- Johannessen Landmark C, Potschka H, Auvin S, Wilmshurst JM, et al. (2021). The role of new medical treatments for the management of developmental and epileptic encephalopathies: Novel concepts and results. *Epilepsia* 62, 857–873. <https://doi.org/10.1111/epi.16849>
- Lagae L, Sullivan J, Knupp K, Laux L, et al. (2019). Fenfluramine hydrochloride for the treatment of seizures in Dravet syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 394, 2243–2254. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32500-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32500-0)
- López González FJ, Osorio R, Gil-Nagel Rein A, Martínezc MC, et al. (2015). Drug-resistant epilepsy: Definition and treatment alternatives. *Neurologia* 30, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2014.04.012>
- Loscher W (2016). Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res.* 126, 157–184. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2016.05.016>
- Löscher W (2021). Single-Target Versus Multi-Target Drugs Versus Combinations of Drugs With Multiple Targets: Preclinical and Clinical Evidence for the Treatment or Prevention of Epilepsy. *Front. Pharmacol.* 12, 730257. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.730257>
- Martin P, Reeder T, Sourbron, de Witte PAM, et al. (2021). An Emerging Role for Sigma-1 Receptors in the Treatment of Developmental and Epileptic Encephalopathies. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms22168416>
- Nabbout R, Mistry A, Zuberi S, et al. (2020). Fenfluramine for Treatment-Resistant Seizures in Patients With Dravet Syndrome Receiving Stiripentol-Inclusive Regimens. A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 77, 300–308. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.4113>
- Obeso JA, Rothwell JC, Quinn NP, Lang AE, et al. (1983) Cortical reflex myoclonus responds to intravenous lisuride. *Clin. Neuropharmacol.* 6, 231–240. doi: 10.1097/00002826-198309000-00005.
- Partoens M, De Meulemeester AS, Giong HK, Pham DH, et al. (2021). Modeling Neurodevelopmental Disorders and Epilepsy Caused by Loss of Function of kif2a in Zebrafish. *eNeuro* 8. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0055-21.2021>
- Schoonjans AS, Lagae L, Ceulemans B, et al. (2015). Low-dose fenfluramine in the treatment of neurologic disorders: experience in Dravet syndrome. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* <https://doi.org/10.1177/1756285615607726>
- Schubert J, Siekierska A, Langlois M, May P, et al. (2014). Mutations in STX1B, encoding a presynaptic protein, cause fever-associated epilepsy syndromes. *Nat. Genet.* 46, 1327–32. <https://doi.org/10.1038/ng.3130>
- Sourbron J (2017) PhD Thesis, KU Leuven.
- Sourbron J, Partoens M, Scheldeman C, Zhang Y, et al. (2019). Drug repurposing for Dravet syndrome in *scn1Lab<sup>-/-</sup>* mutant zebrafish. *Epilepsia* 60, e8–e13. <https://doi.org/10.1111/epi.14647>
- Sourbron J, Schneider H, Kecskés A, Liu Y, et al. (2016). Serotonergic Modulation as Effective Treatment for Dravet Syndrome in a Zebrafish Mutant Model. *ACS Chem. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00342>
- Sourbron J, Smolders I, de Witte P, Lagae L, et al. (2017) Pharmacological Analysis of the Anti-epileptic Mechanisms of Fenfluramine in *scn1a* Mutant Zebrafish. *Front. Pharmacol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00191>
- Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, et al. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *trends Neurosci.* 37, 264–78. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>



**Openjournals provides a professional OpenAccess publishing platform for scholarly, peer-reviewed journals.**

[www.epilepsiejournal.nl](http://www.epilepsiejournal.nl)

