

Obiectivele prevăzute pentru octombrie-decembrie 2007 (primul an al proiectului):

1. Implementarea metodelor imunohistochimice pe țesut neuronal normal.
2. Modelarea unei rețele neuronale simple, compuse din elemente punctiforme.

Rezultatele obținute în anul 2007

1. Implementarea metodelor imunohistochimice

Colectarea țesutului nervos. La șobolani Wistar adulți după anestezie generală profundă cu un amestec de Ketamină/Xilazină (100mg/kgc, 5mg/kgc) s-a deschis cutia toracică și s-a introdus o canulă prin ventriculul stâng până la aorta ascendentă. După fixarea canulei am introdus ser fiziologic (NaCl 9g/l) cu ajutorul unei pompe peristaltice Gilson cu un debit de 25 ml/min. Imediat după începerea perfuziei am deschis auricula dreaptă pentru evacuarea sângelui din sistemul vascular. După 3 minute, când patul vascular a fost spălat de serul fiziologic, perfuzia a fost schimbată la o soluție de formol 4%. După 10 minute, când s-a evidențiat rigidizarea musculaturii, cutia craniană a fost deschisă și creierul a fost îndepărtat.

Creierul a fost fixat în formol neutru 4% la temperatura camerei, timp de 48 ore, timp suficient pentru imbibarea completă a țesutului, care a permis și protejarea epitopilor pentru efectuarea reacțiilor imunohistochimice ulterioare. S-a folosit o cantitate de fixator de zece ori mai mare decât volumul țesutului fixat.

După fixare s-a trecut la prelevarea fragmentelor pentru studiu, efectuând secțiuni transversale paralele de 5mm grosime de la nivelul lobului frontal până la nivelul lobului occipital, toate cele șase fragmente fiind pregătite pentru includere.

Prepararea secțiunilor pentru imunohistochimie, interpretarea rezultatelor. Fragmente obținute în urma prelevării au fost prelucrate conform metodei standard, reprezentată de următoarele etape: spălare, deshidratare, extragerea alcoolului, includerea în blocuri de parafină, urmată de secționarea lor. Din toate blocurile au fost preparate secțiuni seriate de 4-6 microni grosime, de la diferite nivele, urmat de etalarea lor pe lame tratate cu amestec de albuș de ouă și glicerină, uscare în termostat, deparafinare, rehidratare și colorare cu hematoxină-eozină (HE).

Teritoriul cercetat a fost localizat și marcat pe baza colorației histologice standard (HE). Folosind microscop Nikon Eclipse 800, a fost analizat morfologia substanței nervoase cu localizarea hipocampului după criterii anatomice și histologice. Alegerea secțiunilor pentru studiul imunohistochimic s-a realizat cu ajutorul atlasului "The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates" de Paxinos și Watson.

Prin reacțiile imunohistochimice s-a urmărit densitatea, localizarea și interacțiunea diferitelor componentelor celulare a hipocampului nestimulat, ele oferind bază de comparație pentru morfologia modificată în cursul studiului din anii următori. Au fost utilizați anticorpi produși de Lab Vision și DAKO, sistem de detectare Ultra Vision LP Large Volum Detection System HRP Polymer. Acest sistem de detectare a conferit o bună vizualizare a antigenelor cercetate cu reducerea zgomotului de fond.

Tabel nr. 1. Anticorpi primari folosiți.

Denumirea și caracteristicile anticorpului primar	Reactivitate	Demascarea antigenului	Localizarea antigenului	Control pozitiv
Monoclonal mouse Neurofilament Ab-1, Clon: 2F11 Lab Vision/Neo Markers	Uman, pisică, șoarece, iepure, șobolan	Cu căldură umedă sub presiune în soluție tampon citrat 0,01M, pH 6,0, durata demascării 5 minute	Procese neuronale Colorație citoplasmatică	Țesut cerebral uman Control endogen pozitiv
Monoclonal mouse antibody Synaptophysin	Uman, șobolan	Cu căldură umedă sub presiune în soluție	Imunomarcaj citoplasmatic	Tumora neuroendocrină

Ab-2 Clon: SYPO2 Diluție: 1/80 Lab Vision/Neo Markers		tampon citrat 0,01M, pH 6,0, durata demascării 5 minute		
Monoclonal mouse antibody Calretinin Clon: 5A5 Diluție: 1/50 Lab Vision/Neo Markers	Uman, șoarece, șobolan	Cu căldură umedă sub presiune în soluție tampon citrat 0,01M, pH 6,0, durata demascării 5 minute	Interneuronii Imunomarcaj citoplasmatic	Mezoteliom malign
Monoclonal mouse anti- human GFAP Clon: 6F2 Diluție: 1/75 DAKO	Uman, șoarece, șobolan	Cu căldură umedă sub presiune în soluție tampon citrat 0,01M, pH 6,0, durata demascării 7 minute	Celulele gliale, Imunomarcaj citoplasmatic	Glioblastom Control endogen pozitiv
Polyclonal Rabbit anti S- 100 Diluție: 1/3000 DAKO	Uman, șoarece, șobolan	Cu căldură umedă în cuptor cu microunde în soluție tampon citrat 0,01M, pH 6,0, durata: 3×5 minute.	Imunocolorare la nivelul citoplasmei și nucleului	Swannom Control endogen pozitiv

Diluarea anticorpilor a fost efectuată cu Lab Vision Antibody Diluent. Produsul reacției a fost vizualizat cu cromogenul diaminobenzidină (DAB), ce colorează structurile cercetate în culoare brun-închis. Pentru a preveni detașarea secțiunilor de pe lame în cursul demascării antigenului sub presiune, țesuturile examinate au fost etalate pe lame tratate cu adezivul macromolecular Amino Propil triEtoxi Silan (APES, Sigma).

Anticorpii primari (Tabel nr. 1) au fost aleși pe baza sensibilității, sensibilității și reactivității, bazându-ne pe date din literatura de specialitate.

Controlul extern și intern al reacțiilor (control pozitiv și negativ, controlul endogen pozitiv). Deși imunoreacțiile pozitive elimină mult din subiectivismul examinatorului, este necesară o evaluare strictă a calității preparatului pentru excluderea reacțiilor fals negative și ale celor fals pozitive. În acest sens interpretarea reacțiilor imune s-a făcut comparativ, raportând la rezultatele obținute pe controlul pozitiv extern și intern (dacă a existat), precum pe controlul negativ a reacției.

Controlul negativ a fost ultima secțiune din panelul imunohistochimic, o secțiune din biopsia studiată, care a fost supus metodologiei standard cu excepția aplicării anticorpului primar, înlocuit cu soluție control negativ (soluție folosită pentru diluarea anticorpilor). Controlul negativ în condiții normale nu prezintă imunomarcaj la nivelul nici unui component tisular, ceea ce ne-a ajutat în eliminarea reacțiilor fals pozitive.

Controlul pozitiv extern a fost o secțiune histologică care a conținut în mod sigur antigenul cercetat, pus în evidență în prealabil cu metodologia folosită. Pe această secțiune a trebuit să apară o colorație difuză și intensă cu reacție minimă de fond. Împreună cu lamele studiate am inclus în tehnica de lucru câte un reprezentant servind ca control pozitiv pentru fiecare antigen cercetat (Tabel nr. 1).

Perfecționarea protocoalelor și planificarea achiziției de anticorpi pentru anul următor. Prin compararea rezultatelor proprii cu datele din literatura de specialitate, am efectuat analiza critică a diferitelor protocoale imunohistochimice. Secțiunile utilizate în această etapă a proiectului au avut grosime mică (4-6 μm), având avantajul vizualizării bune a celulelor individuale și aplicabilitatea metodelor de rutină din laboratorul de imunohistochimie clinică. Secțiunile mai groase (cca. 60 μm) au avantajul vizualizării mai multor straturi de celule, ceea ce este important pentru identificarea tipurilor de neuroni cu densitate tisulară mică. Dezavantajele metodei constau în timpul semnificativ mai lung necesar pentru penetrarea anticorpilor și vizualizarea mai slabă a neuronilor individuali aflați în adâncimea secțiunii. Din aceste considerente, pentru anul 2008 am planificat utilizarea secțiunilor groase în paralel cu secțiunile subțiri.

Din bugetul alocat pentru anul 2007 am achiziționat anticorpi primari monoclonali specifici pentru parvalbumină, calbindină și GABA (livrați în luna decembrie). Bugetul anului

2008 va permite completarea panelului cu anticorpi specifici pentru somatostatină și subunitatea $\alpha 1$ al receptorului GABA_A.

2. Modelarea rețelei neuronale compuse din elemente punctiforme

Crearea mediului de simulare pe calculator. Pe un computer Dell dual Xeon 2.4 GHz rulând Windows XP a fost instalat programul Neuron 5.9, dezvoltat de M. Hines și T. Carnevale, care este liber accesibil pe sit-ul Universității Yale (<http://www.neuron.yale.edu/neuron/>). Deoarece membrii echipei de cercetare au avut experiență în utilizarea versiunilor anterioare a acestui program (sub Linux), adaptarea la această versiune a necesitat un timp foarte scurt.

Realizarea rețelei neuronale, rularea simulărilor. Pentru simularea neuronilor individuali am folosit modele compartimentale. Fiecare celulă nervoasă a fost implementată printr-un singur compartiment, deci ca un element punctiform. Modelul biofizic al celulelor a fost bazat pe circuitul electric echivalent al membranelor biologice. Curenții ionici dependenți de voltaj (I_{Na} și I_K) au fost modelați prin ecuații de tip Hodgkin și Huxley. Conductanța de scurgere (*leak*) al canalelor pasive a fost de $0,1 \text{ mS/cm}^2$. Momentul declanșării potențialelor de acțiune a fost considerat primul punct pe panta ascendentă a potențialului de membrană care a depășit 0 mV. Am preferat evitarea modelelor de tip *integrate-and-fire* (deși acestea rulează mai rapid) și utilizarea modelului unicompartimental biofizic, care are un comportament mult mai asemănător cu neuronii reali și are posibilitatea ca în anii următori să fie extins la o morfologie dendritică complexă și la un număr mai mare de canale ionice active.

Sinapsele chimice au fost modelate printr-o conductanță variabilă descrisă prin două funcții exponențiale, prima pentru panta ascendentă, cealalta pentru panta descendentă. Conductanța sinaptică de vârf (maxim) a fost variat între $0,001$ și 1 mS/cm^2 . Potențialul de inversare al sinapselor excitatoare a fost de 0 mV, iar a sinapselor inhibitoare de tip GABA_A a fost de -75 mV. Latența sinaptică a constat dintr-o componentă de conducere a excitației ($v=0,25 \text{ m/s}$) și o componentă de întârziere sinaptică de 0,5 ms. Legăturile de tip gap junction au fost implementate ca o conductanță transcelulară de $0,01 \text{ mS/cm}^2$.

Rețeaua neuronală a fost construită din 200 de neuroni aranjați pe circumferența unui inel cu distanță interneuronală de $50 \mu\text{m}$. Această aranjare inelară are avantajul evitării efectelor de margine. Au fost implementate trei tipuri de conectivitate: 1) fiecare neuron cu toți neuronii din rețea (*all-to-all*), 2) număr fix de conexiuni per neuron, 3) conectivitate cu neuronii învecinați, conform unei probabilități date de o funcție Gauss.

Potențialul de repaus a fost inițializat la -65 mV, după care s-a aplicat o stimulare (injecție de curent) randomizată cu amplitudine dată de o distribuție normală, și timp de activare dată de o distribuție uniformă între 0-50 ms. Sinapsele chimice și electrice au fost inactice în primele 150 ms a simulărilor, fiind activate doar în acest moment. Simulările au rulat în pași de $10 \mu\text{s}$, utilizând metoda de integrare backward Euler.

Au fost rulate simulări cu proporții diferite de neuroni excitatori și inhibitori, a fost variat intensitatea medie și dinamica conductanțelor postsinaptice, respectiv intensitatea stimulării de fond. S-a analizat frecvența și coerența activității rețelei în intervale de 100 ms. Frecvența s-a calculat din intervalul mediu dintre potențialele de acțiune (*interspike interval*). Pentru calcularea coerenței, activitatea neuronală a fost transformată în format binar (0 dacă într-un interval dat de timp nu a apărut nici un potențial de acțiune și 1 dacă cel puțin un potențial de acțiune a fost generat), deci activitatea a două neuroni a fost scris în felul următor: pentru neuronul i : $X(l)=0$ sau 1, pentru neuronul j : $Y(l)=0$ sau 1, $l=1, 2, \dots, K$ ($T/K=t$), unde T este durată totală a intervalului studiat iar t este durată unui *bin*. Pentru a lua în considerare efectul frecvenței de generarea a potențialelor de acțiune (f), la majoritatea simulărilor t a fost reglat la $0,1/f$. Coerența unei pereche de neuroni (κ_{ij}) s-a calculat prin ecuația:

$$K_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^K X(l)Y(l)}{\sqrt{\sum_{l=1}^K X(l) \sum_{l=1}^K Y(l)}}$$

Coerența întregii rețele s-a calculat prin media coerenței tuturor perechilor de celule posibile. Pentru calcularea parametrilor de frecvență și coerență a fost scris un program dedicat în limbajul Pascal/Delphi.

Concluzii și aplicabilitate

Toate sarcinile pentru anul 2007 au fost realizate. A fost implementat metoda de colectare a țesutului nervos și prepararea secțiunilor pentru imunohistochimie. Interpretarea rezultatelor a urmărit densitatea, localizarea și interacțiunea diferitelor componente celulare a hipocampului nestimulat. Rezultatele au stat la baza perfecționării protocoalelor și planificarea achiziției de anticorpi pentru anul 2008. De asemenea aceste rezultate vor oferi o bază de comparație pentru morfologia modificată în cursul epileptogenezei ce va fi studiat în anii următori.

Mediul de simulare pentru modelele computerizate de rețea neuronală a fost creat. Rețeau simplă, compusă din elemente punctiforme a permis focusarea atenției asupra efectului parametrilor de conectivitate, al raportului excitație/inhibiție, al dinamicii efectului postsinaptic și al efectului activității de fond. Rezultatele modelelor complexe din anii următori vor fi interpretate în contextul de principiu stabilit prin simulările din acest an.

Pentru anul 2007 în acest proiect nu au fost planificate experimente electrofiziologice, deoarece durata scurtă de 3 luni nu ar fi permis îndeplinirea completă a unui protocol de implantare cronică de electrozi și epileptogeneză experimentală. Totuși toate experimentele au fost conduse în așa fel încât să clarifice detaliile legate de anestezie, fixarea stereotaxică a craniului, intervenția chirurgicală și poziționarea electrozilor, deci să permită ca în 2008 experimentele electrofiziologice să demareze cât mai repede și cu un minim de animale pierdute.

Sarcinile prevăzute pentru 2007, care au constituit teme de cercetare relativ independente, în anii următori vor fi integrate în metodologia complexă de studiu al epileptogenezei.

Rezultatele sunt aplicate în activitatea de cercetare și didactică de la nivelul disciplinei de fiziologie. Pentru 2007 nu au fost prevăzute publicații sau comunicări la sesiuni științifice.