

Obiectivele prevăzute pentru 2008:

1. Realizarea experimentelor pilot *in vivo*. Stabilirea metodei optime pentru inserția electrozilor, delimitarea regiunii optime pentru stimulare. Urmărirea evoluției temporale ale epileptogenezei.
2. Studiul imunohistochimic al materialului biologic recoltat pe parcursul experimentelor electrofiziologice.
3. Implementarea analizei RT-QPCR pe materialul deja prelucrat histologic.
4. Modelarea tipurilor esențiale de interneuroni din hipocamp.

Rezultatele obținute în anul 2008

1. Realizarea experimentelor pilot in vivo

Modelul experimental ales presupune stimularea electrică repetată cu o frecvență și intervale ce nu induc status epileptic sever. Modelul reproduce cele mai importante aspecte ale epileptogenezei umane: creșterea progresivă a severității și duratei crizelor, scăderea locală a pragului de stimulare și evoluția spre apariția crizelor spontane.

Pentru experimente s-au folosit șobolani Wistar adulți (250-320g) la care după anestezie generală i.m. cu un amestec de Ketamină (100mg/kgc) și Xilazină (5mg/kgc), s-au implantat electrozii cronici de stimulare și măsurare. Pentru menținerea temperaturii corporale normale în timpul operației am folosit sistemul de control al temperaturii achiziționat în cursul anului din acest grant.

Animalele au fost monitorizate continuu pe durata procedurii; la nevoie s-au administrat doze de susținere a anesteziei. Pe durata experimentelor s-au respectat toate procedurile și normele stabilite de Directiva din 24 Noiembrie 1986 al Consiliului Europei (86/609/EEC), legile României legate de protecția animalelor precum și normele interne stabilite de Universitatea de Medicină și Farmacie Tg. Mureș.

Pentru stimulare s-a implantat electrod bipolar din oțel inoxidabil cu diametrul 0,2mm și distanță dorsoventrală între vârfuri 0,3mm pe coordonatele: 5,5mm lateral și 3,4mm posterior de bregmă, adâncime față de suprafața creierului 8mm. Pentru înregistrarea propagării activității ictale s-au poziționat electrozi din oțel inoxidabil cu diametrul 0,2mm în hipocamp pe coordonatele 2mm lateral și 3mm posterior față de bregma, 3,3mm adâncime față de suprafața creierului, respectiv șuruburi 0-80x1/16 din oțel inoxidabil deasupra cortexului frontal bilateral pe coordonatele 3mm anterior și 2mm lateral de bregmă (toate conform atlasului stereotaxic al lui Paxinos și Watson). Electrocul de referință și electrocul de pământare (șuruburi din oțel inoxidabil 0-80x1/16) au fost înșurubați simetric deasupra cerebelului. Toți electrozii au fost achiziționați de la Plastics One Inc., Roanoke, VA, USA. Conectorul s-a creat cu ajutorul poliacrilatului dentar, astfel asigurându-se fixarea corectă a tuturor electrozilor.

Animalele de experiență au fost monitorizate strict în primele 24h de la operație, după 48-72 ore s-a înregistrat activitatea EEG de bază pentru 15 minute (traseu de referință pentru înregistrările ulterioare).

La grupul control s-au implantat toți electrozii de măsurare și stimulare dar s-au efectuat numai înregistrări electrofiziologice fără stimulare (fără inducerea epilepsiei).

Apoi a urmat un protocol de stimulare kindling clasic care are ca rezultat creșterea duratei crizelor facilitate și după aproximativ o lună apar și crizele epileptice spontane. Pentru stimulare s-a folosit stimulatorul biologic SUPERTECH BioStim cu Universal Floating End-stage (Supertech, Ungaria). Status epileptic s-a indus prin stimulare cu durată de 20-30 de minute folosind trenuri de 100 de impulsuri de 1msec repetate la intervale de 0,5sec sub înregistrare strictă și urmărirea ictusului electrografic pentru depistarea criteriilor de status epileptic clonic (spikuri epileptiforme continuu și recurența crizelor clonice). După atingerea criteriilor de SE s-a întrerupt stimularea.

Pentru înregistrare s-a folosit amplificator de 8 canale SUPERTECH Multiamp (Supertech, Ungaria). Achiziția datelor s-a efectuat cu bordul A/D National Instruments PCI 6036E (16

canale, total 200 KS/s, 16 bit rezoluție), existent la disciplină. Interfața programului de analiză a datelor este creat în mediul de dezvoltare Borland Delphi bazat pe limbajul Object Pascal. Achiziția datelor a fost realizată de asemenea printr-un modul scris în acest mediu de dezvoltare utilizând driverul NI DAQ 6.9.3 și subrutinele atașate la acest driver în modulul Delphi Support.

Analiza datelor s-a efectuat în mod offline, urmărind parametrii clasici modelelor de epileptogeneză: durata crizelor în evoluție, modificarea pragului de stimulare, modificarea tipului de crize în evoluție.

2. Studiul morfologic al materialului biologic recoltat pe parcursul experimentelor electrofiziologice.

După terminarea înregistrărilor electrofiziologice (1-4 luni) animalele au fost sacrificate în anestezie generală profundă (Ketamină+Xilazină i.m.) prin perfuzie transcordiacă cu ser fiziologic la 4°C, 1 minut, urmat de Paraformaldehidă 4% 25 min. În cazul prelevării creierului pentru RT-QPCR în loc de paraformaldehidă s-a folosit soluție tampon fosfat 0,1M.

Pentru confirmarea morfologică a localizării electrozilor de stimulare și înregistrare, respectiv pentru monitorizarea modificărilor reactive din jurul electrozilor am folosit colorația Nissl cu violet de crezil și imunohistochimie pentru GFAP (Glial Acid Fibrillar Protein) Creierul fixat a fost prelucrat în totalitate, fiind secționat de la nivelul lobilor frontali până la nivelul lobilor occipitali, prin efectuarea unor secțiuni de cc. 60 μm grosime la un vibratom TPI, St. Luis, MO, USA.

Secțiunile obținute au fost numerotate A-P și spălate în soluție de tampon PBS, urmate de etalarea lor pe lame silanizate și colorarea lor cu violet de crezil. În scopul localizării și studierii modificărilor morfologice produse de electrozii introduși în creier, secțiunile obținute au fost colorate prin alternanța metodei Nissl cu imunocolorare GFAP, glioză reactivă fiind modificarea caracteristică apărută consecutiv leziunilor la nivelul SNC.

După inhibarea peroxidazei endogene secțiunile au fost spălate o oră în ser bovin normal, urmat de 24 ore de incubație cu anticorpii primari GFAP (DAKO, Clone 6F2, diluție 1:50). Pentru vizualizarea produsului de reacție s-a folosit metoda streptavidin-biotină (Universal LSABTM+ K0679) și cromogen DAB (diaminobenzidină), urmată de contracolorarea nucleilor cu hematoxilină Mayer. Interpretarea colorației speciale, respectiv al imunocolorației a fost efectuată cu microscop Nikon Eclips 800 și în câteva cazuri lamele au fost scanate în întregime cu un sistem Zeiss MiraxScan.

Prin compararea celor două reacții, au fost localizate structurile anatomice cercetate (hipocampus și amigdala), și a fost urmărită direcția și traiectul de pătrundere al electrodului. În jurul leziunii provocată de electrod s-a observat ștergerea structurii tisulare normale (în comparație cu partea contralaterală) prin înlocuire cu țesut cu celularitate crescută, GFAP pozitivă, însoțită de o reacție de fond accentuată.

Prepararea secțiunilor pentru imunohistochimie.

Anul precedent au fost folosite secțiuni de 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. În acest an am implementat metoda de colorare imunohistochimică pe secțiuni groase și pe lângă cromogenul DAB am introdus anticorpii secundari fluorescenți. Identificarea diferitelor tipuri de interneuroni impune imunomarcare dublă, ceea ce este posibilă numai cu metode de imunofluorescență. Conform planului de activități, în acest an au fost achiziționate reactivii necesari și au fost efectuate determinări prin imunofluorescență simplă, urmând ca la începutul anului viitor să trecem la imunomarcarea dublă.

Pentru identificarea pozitivă a interneuronilor și pentru diferențierea între cele mai importante subpopulații de interneuroni (celulele cu coșulețe, celulele bistratificate, celulele axo-axonice) am ales anticorpi specifici pentru două proteine care leagă calciul, calbindina și parvalbumina (PV), pentru somatostatina (SOM) și pentru subunitatea α1 al receptorilor GABA_A

($\alpha 1$ -GABA_AR) Immunoreactivitatea pentru calbindină poate fi observată în interneuronii ce realizează sinapse cu o mare varietate de celule printre care neuroni lizodendritici non-piramidali precum și celule piramidale și celule spinoase non-piramidale în hipocamp și/sau cortex. Interneuronii cu imunoreactivitate pentru PV inervează primordial soma și segmentul inițial al axonului celulelor principale. Celulele bistratificate sunt caracterizate prin co-expresia SOM și PV mai ales la nivelul ariei CA1. Atât celulele principale cât și interneuronii cu co-expresia $\alpha 1$ -GABA_AR și PV prezintă o imunoreactivitate ridicată la nivelul somei și dendritelor. Celulele piramidale sunt marcate de CaMKinazaII. Pe baza acestor considerente am achiziționat și am testat următorii anticorpi primari și secundari:

Anticorp primar	Specie	Anticorp secundar	Fluorofor	Filtru
Parvalbumină	Șoarece	Măgar anti-șoarece	FITC	B-2A
Subunitatea $\alpha 1$ a receptorului GABA _A	Iepure	Măgar anti-iepure	TRITC	G-2A
Somatostatină	Iepure	Măgar anti-iepure	TRITC	G-2A
CaMKinazaII	Iepure	Măgar anti-iepure	TRITC	G-2A
Calbinidină	Șoarece	Măgar anti-șoarece	FITC	B-2A

3. Implementarea analizei RT-QPCR

Fragmente de țesut cerebral de aprox. 55 mg au fost introdus în 1 ml Trizol într-un mojar Potter-Elvehjev. Țesutul astfel omogenizat a fost folosit pentru extracția ARN cu ajutorul Kitului Qiagen Qiang RNA Blood Mini Kit, conform specificației producătorului. ARN ul obținut s-a diluat în 40 microlitrii de apă ultrapură. S-a analizat concentrația de ARN cu ajutorul spectrofotometrului Nanodrop. Cu ajutorul Kitului High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ARN ul a fost transcris în cADN pentru a obține concentrația finală de 1 micrograme/100 microlitrii.

S-a efectuat analiza RQ-PCR prin folosirea de 5 microlitrii de cADN (cu concentrație de 1 ug/100 ul). Pe baza datelor din literatură, ca și control endogen s-a folosit sinaptofizina (primerul forward și reverse folosite în concentrație de 3 micromoli în cantitate de 2,5 microlitrii/caz. Am urmărit evidențierea expresiei $\alpha 1$ -GABA_AR (TaqMan® Gene Expression Assay Assay ID Rn00788315) folosind primeri în concentrație de 3 micromoli și 2,5 microlitrii) pe probă și proba Taqman 1 microlitru din proba de 1 micromol). Pentru reacție am folosit 2x Taqman Universal PCR Master Mix, la aparatul Applied Biosystem 7500 RT-PCR, la un număr de 50 cicluri. La controlul negativ nu s-a adăugat ADN.

Pentru evaluarea rezultatelor dintre cele două metode posibile cuantificare absolută și cuantificare relativă am folosit cea de a doua metodă. Acesta se bazează pe calculul diferenței de expresie dintre gena analizată și o genă cunoscută considerată „housekeeping gene”, fără modificări cunoscute ale expresiei la metodele experimentale aplicate. Diferența de concentrație (Y) se calculează:

$$Y = 2^{-\Delta Ct}$$

Unde $\Delta Ct = Ct$ (gena testată) – Ct (gena control), Ct : ciclu prag (threshold). O diferență de 3,32 cicluri însemnând o diferență de concentrație de 10 ori.

Din probele analizate am obținut rezultate pozitive, cu expresie diferită a genei $\alpha 1$ -GABA_AR în funcție de localizarea țesutului examinat. În continuare este necesară ajustarea fină a metodei, cu optimizarea reacțiilor.

4. Modelarea tipurilor esențiale de interneuroni din hipocamp.

Pentru simulare am folosit programul NEURON, dezvoltat de M. Hines și T. Carnevale, care este un program flexibil, creat pentru a implementa modele realiste din punct de vedere biologic a neuronilor care comunică pe cale chimică sau electrică și a rețelelor de neuroni. Simulările au fost rulate pe un computer Dell dual Xeon 2.4 GHz rulând Windows XP, cu programul Neuron 6.2 instalat.

Efectul sinaptic al diferitelor tipuri de interneuroni a fost simulat cu ajutorul unui model de neuron piramidal detaliat. Celulele bistratificate au fost modelate prin intrări sinaptice inhibitorii

în regiunea dendritelor apicale și bazale. Celulele cu coșulețe au dat sinapse pe corpul celular iar celulele axo-axonice pe segmentul inițial al axonului. Morfologia celulei piramidale și conductanțele active din corpul celular și segmentul inițial al axonului au fost bazate pe datele publicate de Magee, și Cook în *Nature Neuroscience*, 2000 și care sunt accesibile pe internet la adresa: <http://senselab.med.yale.edu/modeldb/>. Modelul a fost alcătuit din 1251 compartimente. Corpul celular a conținut conductanțe active de Na^+ și K^+ descrise prin formalism Hodgkin-Huxley. Dendritele au fost pasive. Capacitatea specifică a membranei a fost $\text{CM} = 1\text{mF}/\text{cm}^2$, rezistența specifică: $\text{RM} = 30\text{ k}\Omega\cdot\text{cm}^2$, iar rezistența specifică a citoplasmei: $\text{RA} = 200\ \Omega\cdot\text{cm}$. Efectul sinaptic a fost modelat prin conductanțe variabile conform unei funcții alfa:

$$G(t) = AG_{\max}ate^{-at}$$

Timpul până la vârful conductanței a fost în acest caz: $T_{\text{vârf}} = 1/\alpha$.

Potențialul de inversare al sinapselor excitatoare a fost de 0 mV, iar a sinapselor inhibitoare de tip GABA_A a fost de -75 mV respectiv GABA_B de -90 mV.

Celulele bistratificate au influențat în mod direct intrările excitatorii și au favorizat detecția de coincidență. Celulele cu coșulețe și axo-axonice au funcționat mai mult ca controlori de amplificare, determinând pragul de excitare, influențând astfel excitația globală necesară pentru generarea potențialelor de acțiune.

A fost studiat efectul inhibitor în funcție de localizarea sinapselor și efectul de supresie a potențialelor de acțiune generate. Excitarea nespecifică (background) a fost simulat prin 205 sinapse excitatorii distribuite random în zona dendritică. A fost determinat conductanța sinaptică inhibitorie minimă necesară pentru abolirea generării potențialului de acțiune. În circuite neuronale compuse din excitare monosinaptică adăugând inhibiție feed-forward disinaptică, aceasta din urmă a prescurtat durata potențialului postsinaptic excitator, influențând doar marginal amplitudinea acestuia. Astfel, acest tip de inhibiție a favorizat detecția de coincidență. În acest context, sinapsele care au modelat receptori GABA_A (conductanță de Cl^- , cu potențial de inversare foarte apropiat de potențialul de repaus) au avut efect mult mai mic decât receptorii GABA_B (conductanțe de K^+)

Concluzii și aplicabilitate

Toate sarcinile pentru anul 2008 au fost realizate. A fost implementată metoda de inserția electrozilor de stimulare și înregistrare, au fost efectuate măsurătorile in vivo, s-a perfecționat metoda de colorare imunohistochimică și a fost implementată analiza RT-QPCR pentru studierea expresiei genei subunității $\alpha 1$ al receptorului GABA_A . Efectul inhibitor al interneuronilor a fost studiat într-un model multicompartimental detaliat.

Sarcinile prevăzute pentru 2008, care au constituit teme de cercetare relativ independente, în anii următori vor fi integrate în metodologia complexă de studiu al epileptogenezei.

Metoda implementată precum și rezultatele obținute sunt aplicate în activitatea didactică și de cercetare de la nivelul catedrei. Rezultatele au fost prezentate la Al X-lea Congres al Societății Române de Științe Fiziologice desfășurat la Cluj, 5-7 iunie 2008 precum și la Prima Conferința a Doctoranzilor în Medicină și Farmacie desfășurat la Tg. Mureș în perioada 9-11 iulie 2008.

În anul 2008 au fost elaborate 3 articole, două articole în reviste de categoria C și un articol în revistă de categoria A.

1. Orbán-Kis Károly, Metz Júlia, Szilágyi Tibor: Állatmodellek jelentősége az epilepszia kutatásában, *Buletin de Științe Medicale – Orvostudományi Értesítő*, 2008, 81(2):88-91.
2. K. Orban, T. Vantus, K. Antal, Gy. Kéri, T. Szilagyí, Júlianna Kardos, Zsuzsa Emri: Studiul in vitro al reglării curenților sinaptici hipocampali și a concentrației intracelulare de calciu cu analogi de somatostatină, *Revista de Medicină și Farmacie – Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle*, 2008, 54(Supl. 3): 415-417.
3. Tibor Szilágyi, Károly Orbán-Kis, Emőke Horváth, Zsuzsanna Pap, Júlia Metz, Zoltán Pávai: Laboratory techniques in epilepsy research, *Revista Română de Medicină de Laborator – in press*