

**Universitatea de Medicină și Farmacie
Tg. Mureș**

Programul: IDEI
Tipul proiectului: Proiecte de cercetare exploratorie
Contract nr. 266/1.10.2007
Cod CNCSIS: ID_1126

Raport – Sinteza

**INVESTIGAREA PRIN METODE ELECTROFIZIOLOGICE IN VIVO, BIOLOGIE
MOLECULARĂ ȘI MODELARE COMPUTERIZATĂ A ROLULUI OSCILAȚIILOR
DE FRECVENȚĂ ÎNALTĂ ȘI A ACTIVITĂȚII INTERICTALE ÎN
EPILEPTOGENEZA HIPOCAMPALĂ**

Faza I (unică)

Director de proiect: **Dr. Tibor Szilágyi**

2009

Relevanța temei și scopul lucrării

Epilepsia afectează aproximativ 0,5-3% din populația globului fiind una dintre cele mai frecvente boli neurologice. Boala cauzează suferința și stigmatizarea pacienților reprezentând și o povară economică majoră pentru societate. Deși paleta terapeutică a epilepsiei se extinde, este discutabilă eficacitatea terapiei asupra modificărilor primare ce stau la baza sindroamelor epileptice - în momentul de față existând numai tratament antiictal și nu antiepileptic. Din acest punct de vedere nici un medicament folosit astăzi în clinică nu a reușit în mod evident să dovedească capacități antiepileptice, iar eficacitatea intervențiilor chirurgicale este și ea larg contestată.

Scopul proiectului este cercetarea mecanismelor epileptogenezei prin abordare multidisciplinară: experimente pe animale *in vivo*, analiza computerizată a datelor, studiul modificărilor morfologice și moleculare, sinteza rezultatelor prin simulare pe calculator. Metodologia complexă va permite identificarea bazelor morfo-funcționale ale unor mecanisme implicate în generarea crizelor epileptice, oferind astfel puncte posibile de plecare pentru dezvoltarea unor medicamente antiepileptice cu mecanism de acțiune complet nou.

Obiectivele prevăzute pentru 2009:

1. Efectuarea experimentelor electrofiziologice cronice pe mai multe loturi de animale, pe perioade de înregistrare stabilite pe baza experimentelor pilot din anul anterior.
2. Studiul modificărilor structurale și moleculare care apar în diferitele stadii ale epileptogenezei.
3. Modelarea rețelei neuronale capabile să reproducă fenomenele electrice observate *in vivo*.

Rezultatele obținute în anul 2009

1. Experimente electrofiziologice

Epileptogeneza a fost obținută prin metoda kindling. Acest model experimental 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. 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. Protocolul experimental a fost stabilit în cursul experimentelor pilot din anul precedent și a fost descris în raportul din anul 2008.

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 (Fig. 1., traseu de referință pentru înregistrările ulterioare).

Animalele au fost împărțite în două loturi. La grupul control (5 șobolani) s-au implantat toți electrozii de măsurare și stimulare dar s-au efectuat numai înregistrări electrofiziologice fără stimulare (fără inducerea epilepsiei).

La animalele din lotul celălalt (11 șobolani) a urmat un protocol de stimulare kindling clasic (Fig. 2.) 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 un bord A/D National Instruments PCI 6036E (16 canale, total 200 KS/s, 16 bit rezoluție). 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, folosind programul Spike2 (Cambridge Electronic Design) și urmărind parametrii clasici modelelor de epileptogeneză: durata crizelor în evoluție, modificarea pragului de stimulare, modificarea tipului de crize în evoluție.

La nici unul dintre animalele din grupul control nu am înregistrat crize epileptice. Crize spontane (Fig. 3) au fost depistate la 9 din 11 animale de experiență stimulate (81,8%) după o durată de 6-80 zile (în medie 33 zile). 4 dintre aceste animale (44,5%) au prezentat crize frecvente, restul de 5 animale (55,5%) numai ocazional pe durata urmăririi de 4 luni. Durata medie a crizelor pe baza înregistrării EEG a fost de 50 ± 23 sec. 79% dintre crize au fost secundar generalizate (scor Racine 3-5), restul crizelor erau parțiale (scorul Racine 0-2). S-a căutat depistarea unor eventuale crize generate de hipocamp, însă relația temporală a înregistrărilor din amigdala și hipocamp au dovedit că toate crizele au avut originea în amigdala. Una din obiectivele acestui studiu a fost dovedirea existenței oscilațiilor de frecvență înaltă (HFO) într-un model de epileptogeneză in vivo. Pentru aceasta din perioada ante-stimulare, perioada preictală, ictală și chiar postictală traseele au fost analizate pentru prezența și caracteristicile HFO. O creștere semnificativă a fost observată în bandele de frecvență 0–100 Hz (subripple), 100–200 Hz (ripple) și 200–300 Hz (fast-ripple) în momentul tranziției de la preictal la ictal. Nu s-a putut dovedi o relație statistic semnificativă dintre numărul de descărcări preictale ce preced criza epileptiformă EEG și durata crizelor. Oscilații de frecvență înaltă (200-300Hz) au fost depistate în faza ascendentă a spike-urilor interictale (IS). Aceste oscilații au fost înregistrate doar în zonele epileptice (zonele unde și IS a fost înregistrată primar) și au lipsit din zonele unde IS s-a propagat doar secundar. Acest fenomen suportă teoria că oscilațiile (activarea sincronă a celulelor principale) apar în zonele epileptice în momentul apariției IS probabil prin lipsa (anatomică sau funcțională) a interneuronilor (moartea selectivă a unor subtipuri de interneuroni, modificarea sistemului receptor a acestor interneuroni, etc).

2. Studiul modificărilor structurale și moleculare

După terminarea înregistrărilor electrofiziologice (1-4 luni) animalele au fost sacrificate în anestezie generală profundă (Ketamină+Xilazină i.m.) prin perfuzie transcardiacă cu ser fiziologic la 4°C, 1 minut, urmat de paraformaldehidă 4% și acid picric 15% v/v timp de 25 min. În cazul prelevării creierului pentru RT-QPCR în loc de paraformaldehidă s-a folosit soluție tampon fosfat 0,1M (3 minute). În cazul țesutului fixat, localizarea electrozilor de stimulare și înregistrare, respectiv modificările reactive din jurul electrozilor a fost verificat prin colorația Nissl cu violet de crezil și imunohistochimie pentru GFAP (Glial Acid Fibrillar Protein).

Imunohistochimie

Vizualizarea diferitelor tipuri de neuroni hipocampali s-a făcut prin colorare imunohistochimică pe secțiuni groase (60 μ m) cu anticorpii secundari fluorescenți. Anticorpii primari utilizați au fost produși pentru legarea specifică a următoarelor proteine: parvalbumina (PV), calbindina (CB), două proteine care leagă calciul, subunitatea $\alpha 1$ a receptorului ionotrop GABA_A (GABA_AR- $\alpha 1$), somatostatina (SOM), protein kinaza Ca²⁺/calmodulin-dependentă (CaMKII). anticorpii secundari au fost conjugați cu FITC, Rhodamină, Cy3 sau Alexa 488 după caz.

Acești markeri au fost aleși în așa fel încât pe lângă identificarea pozitivă a interneuronilor să putem diferenția cele mai importante subpopulații de interneuroni (celule cu coșulețe, celule bistratificate, celule axo-axonice). Celule imunopozitive pentru PV sunt celulele care inervează

primordial soma și segmentul inițial al axonului celulelor principale. Celule imunopozitive pentru SOM sunt celule bistratificate și celulele O-LM (oriens lacunosum-moleculare) din hipocamp. Combinațiile PV- GABA_AR- α 1 sunt menite să marcheze celulele inhibitoare perisomatice, cum ar fi celulele axo-axonice și celulele cu coșulețe. Combinația PV- SOM (Fig. 4) este menită să marcheze celulele inhibitoare dendritice, adică celulele bistratificate și O-LM. Rezultatele arată menținerea sau chiar creșterea ușoară a inhibiției perisomatice și scăderea inhibiției dendritice. Deși am putut remarca aceste tendințe, numărul experimentelor nu este suficient de mare ca să obținem diferențe statistic semnificative, de aceea anul următor vom continua experimentele începute în acest an. Inhibiția dendritică asupra celulelor principale afectează aferențele acestora în timp ce inhibiția perisomatică eferențele. Scăderea inhibiției dendritice crește efectul aferențelor excitatorii, în timp ce păstrarea/amplificarea inhibiției perisomatice crește sincronizarea activității celulelor principale, cauzând dispariția echilibrului excitație/inhibiție.

Analiza RT-QPCR

Folosind metodologia descrisă în raportul precedent, în această perioadă au fost determinate raporturile normale ale controlului endogen folosit (sinaptofizina) și a subunității α 1 a receptorului GABA_A (gena Gabra1). În acest scop au fost determinate nivelul mRNA în diferite zone ale SNC: hipocamp, scoartă cerebrală, cerebel, dar și în țesuturi parenchimatose (plămân, ficat) alese ca și posibile controale endogene pentru evaluarea ulterioară a rezultatelor.

Fiind vorba de un număr mai mare de blocuri de țesut recoltate de la un animal, care nu puteau fi prelucrate simultan, pentru eliminarea dezintegrării ARN-ului, în lipsa posibilității folosirii azotului lichid pentru congelare, s-a folosit soluția ARN later în proporție de 10:1.

În probele provenite din SNC expresia controlului endogen este mai mare decât expresia GABA_AR- α 1, Fig. 5.A-C. În plămân situația se schimbă și GABA_AR- α 1 este exprimat semnificativ mai intens decât sinaptofizina, Fig. 5.D. Acest rezultat este în concordanță cu datele din literatură care arată că, în plămân există în abundență receptori GABA_A, dar în acest caz GABA are origine extraneuronală. În ficat situația este asemănătoare cu cea din SNC diferența fiind însă mai mare.

Pentru verificarea și validarea rezultatelor, acestea au fost repetate la mai multe animale. La toate regiunile din SNC rezultatele se suprapun foarte bine. Se poate observa ca și control al reacțiilor, suprapunerea aproape perfectă a curbelor de control endogen, Fig. 6. Asemănător, și curbele obținute la probele extrase din țesutul pulmonar au o suprapunere destul de bună, și destul de specifică, ceea ce le conferă o posibilitate de a fi folosite ca și control endogen. În cazul țesutului hepatic dispersia datelor este foarte mare și în unele cazuri valorile GABA_AR- α 1 și sinaptofizina se suprapun. Acesta poate fi din cauza inomogenității țesutului hepatic, a diferențelor de localizare a probelor extrase sau imposibilității de exsanguinare perfectă a acestui țesut.

Tabelul 1. Concentrația mRNA GABA_AR- α 1 raportat la concentrația controlului endogen, sinaptofizina (datele sunt exprimate în procente, media $\pm$ eroarea standard)

Regiunea	%
Cortex	29.99 $\pm$ 1.49
Hipocamp	16.66 $\pm$ 1.96
Cerebel	65.31 $\pm$ 7.66
Plămân	1033.75 $\pm$ 145.53
Ficat	20.08 $\pm$ 12.99

În concluzie expresia mRNA-ului este reproductibil și specific pentru țesuturile studiate, cu diferențe de expresie tipizabile pentru sinaptofizina și GABA_AR- α 1.

3. Modelarea computerizată a rețelei neuronale.

Pentru modelare computerizată am folosit programul NEURON, dezvoltat de M. Hines și T. Carnavale (<http://www.neuron.yale.edu>). Simulările au fost rulate pe un computer Dell dual Xeon 2.4 GHz rulând Windows XP, cu programul Neuron 6.2 instalat.

Au fost construite modelele simplificate ale celulelor piramidale și ale interneuronilor. Fiecare tip de celulă a fost modelat prin compartimente corespunzătoare corpului celular, dendritelor apicale și bazale respectiv o porțiune scurtă de axon. În total, majoritatea modelelor au avut 15 compartimente.

Celulele piramidale au fost modelate prin compartimente conținând canale de sodiu; canale de potasiu de tip *delayed rectifier*, respectiv de tip M și A, curent de potasiu activat de calciu de tip AHP lent și mediu; canale de calciu de tip L, T și R; pompe de calciu și un mecanism de tamponare a calciului; și un curent cationic activat de hiperpolarizare.

Membrana celulelor cu coșulețe, axo-axonice și bistratificate a conținut canale de sodiu; canale de potasiu de tip *delayed rectifier*, respectiv tip A, curent de potasiu activat de calciu și un alt curent de potasiu dependent de calciu și voltaj; canale de calciu de tip L și N; și un curent pasiv de scurgere.

Celulele O-LM au fost modelate prin patru compartimente conținând canale de sodiu; canale de potasiu de tip *delayed rectifier*, respectiv tip A; curent cationic activat de hiperpolarizare; și un curent pasiv de scurgere.

Densitatea curenților a fost setat astfel încât modelele au putut reproduce proprietățile electrofiziologice intrinsece determinate experimental.

Cu ajutorul acestor modele simplificate a fost construită și testată o rețea neuronală. La conectivitatea rețelei am avut în vedere datele morfologice cunoscute din literatura de specialitate.

Modelarea potențialelor extracelulare s-a bazat pe calcularea curenților extracelulari, conform legilor lui Kirchhoff: curentul care intră în celulă într-un punct trebuie să părăsească celula într-un alt punct, ceea ce generează un curent extracelular. Deoarece modelarea compartimentală descrie neuronul prin compartimente separate, curenții și potențialele extracelulare au fost calculate folosind ecuația:

$$\Phi(t) = \frac{R_e}{4\pi} \sum \frac{I_{m_i}}{r_i}$$

unde: $\Phi(t)$ este potențialul extracelular în funcție de timp, I_{m_i} este curentul transmembranar total al compartimentului i , r_i este distanța centrului compartimentului de punctul de măsurare a potențialului extracelular și R_e este rezistența specifică a spațiului extracelular ($R_e=300 \Omega\text{cm}$). Această ecuație presupune că mediul extracelular este un conductor noncapacitiv omogen, ceea ce este doar o aproximație a realității biologice.

Studiind potențialele extracelulare modelate, rețeaua a prezentat oscilații de frecvență înaltă similare cu cele obținute în cursul experimentelor electrofiziologice. Cu parametrii folosiți în această serie de simulări, acest fenomen a apărut numai dacă modelul a încorporat și legături de tip *gap junction*.

Concluzii și aplicabilitate

Toate sarcinile pentru anul 2009 au fost realizate. Metoda implementată precum și rezultatele obținute sunt aplicate în activitatea didactică și de cercetare de la nivelul catedrei. Rezultatele au fost prezentate la: XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 27th July - 1st August, Kyoto, Japan, A 23-a Conferință Națională a Societății Române de Științe Fiziologice, 28-30 mai 2009, Craiova, Romania, A 2-a Conferință a Doctoranzilor în Medicină și Farmacie, 8-10 iulie 2009, Târgu Mureș, România.

În anul 2009 au fost elaborate 2 articole:

Karoly Orban-Kis, Karoly Antal, Tibor Szilagyi, Julianna Kardos, Zsuzsa Emri: Antiepileptic effect of somatostatine measured during low magnesium induced seizure-lik-activity,

Revista de Medicină și Farmacie – Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle, 2009, 55:13-15 (CNCSIS C).

Zoltan Pavai, Zsuzsanna Pap, Karoly Orban-Kis, Tibor Szilagyi: Quantitative characterization of regional differences in the GABAA-receptor $\alpha 1$ subunit mRNA expression in the rat brain, Romanian Journal of Morphology and Embryology, in press (CNCSIS A).

Informațiile legate de acest proiect (principii teoretice, metodologia aplicată, rezultatele obținute, membrii echipei de cercetare, datele de contact, etc.) sunt diseminate prin intermediul paginii de internet a proiectului: <http://www.umftgm.ro/~idei266/>.