
**"UNIVERSITATEA de MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI
TEHNOLOGIE „GEORGE EMIL PALADE” DIN TÂRGU MUREȘ**

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

**Efectul stimulării cerebrale profunde a amigdalei în
modelul de pilocarpină al epilepsiei de lob temporal
(rezumat)**

**Conducător de doctorat:
Prof. Dr. SZILÁGYI TIBOR**

**Doctorand:
MIHÁLY ISTVÁN**

-MARTIE 2021 -

Epilepsia este una dintre cele mai frecvente sindroame neurologice afectând peste 70 de milioane de oameni din întreaga lume. Cea mai frecventă formă este epilepsia de lob temporal (TLE), care afectează în principal hipocampusul și este rezistent la terapie farmacologică în aprox. 20-40% din cazuri. Stimularea cerebrală profundă (DBS) este o metodă terapeutică nouă care constă în implantarea unor electrozi în sistemul nervos central urmat de stimulare electrică. În cazul epilepsiilor refractare la tratament farmacologic DBS-ul poate fi o alternativă promițătoare pentru reducerea crizelor și încetinirea epileptogenezei. În epilepsia de lob temporal hipocampusul sau amigdala sunt ținte de stimulare promițătoare, deși mecanismele prin care stimularea exercită efectul anticonvulsivant nu sunt pe deplin înțelese.

Crizele epileptice rezultă din activitatea electrică excesivă sau hipsincronă a neuronilor, cauzată de un dezechilibru între excitație și inhibiție. Celulele inhibitoare hipocampale, în special celulele care exprimă parvalbumina și celulele iederă, joacă un rol important în menținerea acestui echilibru. Elucidarea efectelor stimulării asupra activității electrice a țesutului epileptic și a densității interneuronale a hipocampusului ar putea ajuta la descifrarea mecanismelor DBS-ului și la îmbunătățirea protocoalelor de stimulare.

Am propus să evaluăm efectele stimulării cerebrale profunde cu frecvență joasă (LFS) a amigdalei asupra tiparului de crize, asupra activității electrice hipocampale și a densității interneuronale în modelul de pilocarpină al epilepsiei de lob temporal.

Administrarea sistemică de pilocarpină provoacă status epileptic (SE) care după o perioadă de latență duce la apariția crizelor epileptice spontane recurente (SRS), o caracteristică a epilepsiei de lob temporal la om. SE a fost indus la șobolani masculi Wistar juvenili prin administrarea de litiu apoi pilocarpină și a fost oprit după 2 ore cu diazepam. Șobolanii au fost video-monitorizați în mod continuu și crizele au fost identificate și analizate *offline*. La aproximativ zece săptămâni după SE au fost implantați doi electrozi de înregistrare în hipocampi, un electrod de stimulare în amigdala bazolaterală stângă și patru electrozi de tip șurub pentru înregistrarea electrocorticogramei. La zece zile după intervenția chirurgicală s-a aplicat LFS regulat de 4 Hz timp de 4x50 secunde, cu pauze de 5 minute între trenurile de stimulare. Stimularea a fost efectuată timp de 10 zile. Activitatea electrică hipocampală și corticală au fost înregistrate înainte și în timpul stimulării, utilizând un sistem de înregistrare ce permite mișcarea liberă a animalelor. S-au cuantificat frecvența descărcărilor interictale epileptiforme (IED, adică vârfurile, polivârfurile și undele ascuțite), precum și puterea benzilor de frecvență teta și delta. Cuplarea de fază-amplitudine (PAC) între banda delta și frecvențe mai mari a fost determinată prin măsurarea cuplării fază-amplitudine (tPAC) rezolvată în timp. Aceasta este o metodă nouă pentru a obține o comodulogramă PAC și care detectează valoarea maximă a cuplării între undele lente și cele rapide în ferestre de timp glisante optime. Pentru a evalua conectivitatea funcțională între hipocampusul stâng și drept, a fost calculată valoarea phase locking (PLV).

La sfârșitul experimentelor, animalele au fost sacrificate creierul fiind fixat prin perfuzie transcardiacă cu paraformaldehidă. Secțiuni cu grosime de 60 μm au fost marcate folosind parvalbumina (PV), neuropeptida Y (NPY) și sintaza oxidului nitric neuronal (nNOS) ca proteine de marcaj imunohistochimic pentru identificarea interneuronilor. Secțiunile au fost scanate cu un microscop confocal și s-a determinat densitatea interneuronilor în regiunea CA1 a hipocampusului.

Frecvența și durata medie a crizelor au fost reduse de LFS (cu 23%, respectiv 26,5%). Șase animale au avut mai puține în timp ce trei au avut mai multe crize în timpul stimulării; durata a fost redusă la opt din nouă șobolani. Reducerea frecvenței crizelor a avut o corelație negativă cu frecvența descărcărilor interictale epileptiforme.

Rata crizelor ușoare (Racine 3 și 4) a scăzut semnificativ. Rata crizelor R6 a scăzut, dar rata celor R5 a crescut astfel încât reducerea ratei crizelor severe (R5+R6) nu a fost semnificativă. Rata medie a crizelor nu a fost afectată de implantarea electrozilor.

Șobolanii tratați cu pilocarpină au avut o rată IED semnificativ mai mare iar stimularea a redus rata IED în acest grup atunci când au fost comparate prima și ultima zi de stimulare.

Puterea benzii teta a fost semnificativ scăzută la animalele epileptice comparativ cu control. LFS a crescut semnificativ puterea benzii teta imediat după aplicarea trenului de stimuli restabilind valorile la nivelul măsurat la animalele control. Valoarea PAC a fost crescută la animalele tratate cu pilocarpină iar stimularea a redus semnificativ acest PAC crescut, dar nu l-a readus la nivelurile observate în animalele control. La animalele epileptice PLV înainte de stimulare a fost semnificativ mai mic în benzile delta, teta și gamma. Stimularea electrică a crescut semnificativ PLV-urile în benzile delta și teta.

Densitatea celulară PV+ nu a fost modificată la șobolanii epileptici în timp ce densitatea celulară NPY+/nNOS+ a fost semnificativ scăzută în comparație cu animalele control. Volumul regiunii CA1 al hipocampului a fost scăzut la animalele epileptice. Stimularea amigdalei nu a influențat densitatea celulelor PV+ sau NPY+/nNOS+ în grupul epileptic sau control.

Detectarea IED-urilor precum și măsurarea puterii relative a undelor teta și a valorilor PAC ar putea fi de ajutor în caracterizarea epileptogenezei. În acest studiu am arătat pentru prima dată că stimularea electrică cu frecvență joasă ar putea exercita efectul său anticonvulsivant prin creșterea puterii benzii teta și reducerea cuplării fază-amplitudine crescută patologic, precum și prin creșterea sincronismului modificat între cei doi hipocampi (prin creșterea PLV-urilor). Măsurarea acestor parametri ar putea ajuta la monitorizarea și îmbunătățirea eficacității stimulării electrice.

Am observat că diferite tipuri de interneuroni sunt selectiv vulnerabile la leziunea epileptică, deoarece densitatea celulelor PV+ a rămas neschimbată iar densitatea celulelor NPY+/nNOS+ a scăzut în hipocampul animalelor tratate cu pilocarpină. Scăderea densității celulelor iederă (NPY+/nNOS+) ar putea facilita creșterea excitabilității generale și reducerea pragului convulsivant. În schimb, persistența numărului de celule PV+ într-un hipocamp micșorat ar putea facilita hipersincronismul local și ar putea promova epileptogeneza. Stimularea electrică a amigdalei nu a influențat densitatea celulelor PV+ și nu a ameliorat densitatea scăzută a celulelor NPY+/nNOS+.

În concluzie, stimularea cu frecvență joasă a amigdalei a modulat cu succes activitatea electrică hipocampală modificată, dar nu a influențat schimbarea densității celulelor interneuronale în regiunea CA1 hipocampală a șobolanilor epileptici. Atribuim acest efect limitat duratei scurte a stimulării zilnice. Studiile viitoare ar trebui să testeze perioade mai lungi de stimulare pentru a vedea dacă LFS poate diminua pierderea interneuronilor din această regiune.

Originalitatea studiului nostru constă în evaluarea efectelor stimulării cerebrale profunde cu frecvență joasă prin utilizarea complementară a metodelor comportamentale, electrofiziologice și imunohistochimice. Acest studiu este primul care evaluează efectul LFS în condiții *in vivo*, prin analiza tiparului de crize, a activității electrice hipocampale și a densităților interneuronale într-un model de epilepsie.