

**REORGANIZAREA FUNCȚIONALĂ A CIRCUITELOR
NEURONALE DIN HIPOCAMP ÎN TIMPUL
EPILEPTOGENEZEI**

-rezumatul tezei de doctorat-

Conducător de doctorat: Prof. Dr. Tibor Szilágyi

Doctorand: Rita-Judit Kiss

Introducere

Epilepsia de lob temporal este o tulburare neurologică frecventă, caracterizată prin crize recurente, datorate unei activități neuronale sincronizate, excesive, adesea inițiat în hipocamp. Peste 30% din pacienți sunt rezistenți la tratamentul medicamentos, cu un impact major asupra vieții pacientului și aparținătorilor și o povară socio-economică severă.

Mecanismele epileptogenezei nu sunt elucidate complet, iar cauzele farmacorezistenței sunt multiple și complexe, parțial datorate caracteristicilor farmacocinetice ale medicamentelor anticonvulsivante (ATC) disponibile. Îmbunătățirea biodisponibilității medicamentelor prin crearea complexelor de incluziune cu ajutorul beta-ciclodextrinei (β -CD) este o metodă insuficient testată în cazul ATC. Totodată, efectele acestui oligosaharid asupra celulelor neuronale nu au fost investigate.

Obiective

Scopul cercetării este înțelegerea mai bună a mecanismelor care stau la baza inițierii și propagării crizelor într-un model de epilepsie *in vitro* 0Mg^{2+} și a efectelor a patru blocați ai canalelor de sodiu voltaj-dependente (VGSC) solubilizați cu β -CD asupra parametrilor activității epileptiforme (SLE).

Metodologie generală

Secțiunile de hipocamp cu grosime de $300\text{ }\mu\text{m}$ au fost obținute de la șobolani Wistar P7-13 de sex masculin. S-a înregistrat potențialul de câmp din regiunea CA3 a hipocampului folosind un microelectrod. Activitatea de bază a fost înregistrată în lichid cefalorahidian artificial normal (nLCRA) iar activitatea epileptiformă a fost declanșată folosind LCRA fără magneziu și cu conținut ridicat de potasiu ($0\text{Mg}^{2+}\text{LCRA}$). S-a testat efectul individual al β -CD și efectul carbamazepinei (CBZ, $100\text{ }\mu\text{M}$), lacosamidei (LAC, $100, 50, 25\text{ }\mu\text{M}$), rufinamidei (RUF, $100, 50\text{ }\mu\text{M}$) și fenitoinei (PHT, $100, 50, 25\text{ }\mu\text{M}$) complexate cu β -CD, dizolvate în $0\text{Mg}^{2+}\text{LCRA}$. Protocolul de înregistrare s-a încheiat prin *washout* cu $0\text{Mg}^{2+}\text{LCRA}$ și nLCRA (Figura 1.). Fazele SLE au fost delimitate pe înregistrări pe baza frecvenței de descărcare neuronală.

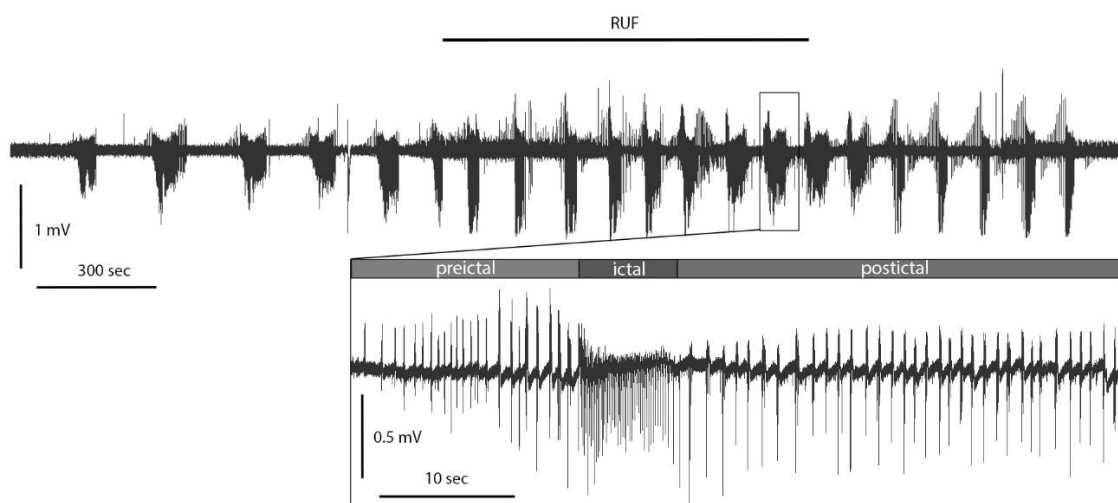


Figura 1. Înregistrare completă cu delimitarea fazelor SLE pe baza frecvenței de descărcare.

În **Studiul 1** a fost investigat impactul β -CD, și a celor patru medicamente complexate cu β -CD asupra duratei și caracteristicilor diferitelor faze ale SLE. Totodată, în cazul PHT, LAC, RUF s-a efectuat o analiză comparativă între diferite concentrații, pentru a înțelege efectul dependent de doză al acestora.

A fost măsurată durata fazelor preictale, ictale, postictale, interictale și a fost calculată frecvența SLE. Rezultatele au evidențiat că β -CD cauzează scurtarea fazelor preictale și ictale și crește frecvența SLE prin scurtarea fazelor interictale. Toate medicamentele testate au scurtat durata fazei ictale, totodată au crescut frecvența SLE. LAC în concentrație de $100\text{ }\mu\text{M}$ a suprimat complet activitatea ictală. În concentrațiile mai mici pe lângă scurtarea fazei ictale și creșterea frecvenței SLE, a influențat durata fazei pre- și postictale în mod dozaj-dependent. La aplicarea de CBZ a crescut durata fazei preictale și a scăzut durata fazei ictale și postictale, frecvența SLE a crescut.

În **Studiul 2** am urmărit variațiile frecvenței de descărcare neuronală la începutul fazei ictale, prin care am studiat modul în care oscilațiile rapide contribuie la dezvoltarea crizelor. S-a calculat frecvența de descărcare în cazul primelor 10 (SF1) și următoarelor 10 intervale (SF2) dintre vârfuri ictale.

În cadrul acestui studiu a fost măsurată și densitatea spectrală a puterii (PSD) în perioada de tranziție preictal-ictală: ultimele 2 vârfuri preictale, *burst*-ul debutului ictal și următoarele 2 vârfuri ictale, pentru frecvențele subripple (1-100 Hz), ripple (100-200 Hz), fast ripple I. (200-300 Hz), fast ripple II. (300-400 Hz).

În SLE control nu s-a modificat frecvența de descărcare între cele două segmente comparate. Dintre toate substanțele testate CBZ a fost singura care a cauzat scăderea frecvenței în ambele faze și a cauzat reducerea ratei de descărcare în a doua fază față de prima. β -CD nu a influențat rata de descărcare față de control, dar a cauzat încetinirea acesteia în a doua fază față de prima.

Densitatea spectrală în banda subripple a crescut progresiv în perioada de tranziție preictal-ictală. În cazul celorlalte frecvențe creșterea a fost prezentă doar în *burst*-ul ictal. Toate substanțele testate au influențat PSD în momente și la frecvențe variabile. Efectele principale ale acestora au fost predominant de creștere a densității spectrale. RUF în concentrația de 100 μ M a fost singurul blocant VGSC care a cauzat doar scăderea densității spectrale.

În **Studiul 3** am urmărit interacțiunile complexe între ritmurile cerebrale oscilatorii. Cuplarea fază-amplitudine (PAC) este o formă de interacțiune în care faza oscilațiilor de frecvență joasă modulează amplitudinea oscilațiilor de frecvență înaltă. PAC a fost calculată în ferestre de 5 secunde de la sfârșitul fazei preictale, la începutul fazei ictale și la sfârșitul fazei postictale pentru frecvența modulatorie de 1-12 Hz și frecvențele modulate gamma (30-100 Hz), ripple (100-200 Hz) și fast ripple (200-400 Hz).

Rezultatele au demonstrat că puterea cuplării este mai scăzută la începutul fazei ictale față de fazele pre- și postictale în cazul celor trei frecvențe studiate. Moleculele testate au avut sporadic efecte asupra PAC, CBZ a cauzat cele mai multe modificări prin creșterea PAC în faza ictală și postictală pentru frecvențele gamma și ripple.

Discuții, concluzii

Modelele *in vitro* ale epilepsiei oferă un mediu controlat pentru studierea ATC, permițând testarea rapidă a diferitelor concentrații de medicamente. Utilizarea β -CD ca excipient a îmbunătățit solubilitatea medicamentelor anticonvulsivante, suprimând activitatea epileptiformă la concentrații mai mici decât cele utilizate cu alte metode de solubilizare.

S-a dovedit că β -CD nu este un excipient inert; aplicată individual, a demonstrat atât efecte anticonvulsivante, cât și proconvulsivante moderate, reducând durata fazelor preictale și ictale, dar crescând frecvența SLE. Mecanismele exacte prin care β -CD influențează excitabilitatea neuronală nu sunt complet înțelese.

Blocanții canalelor de sodiu (VGSC) testați - lacosamida, carbamazepina, rufinamida și fenitoina - au prezentat efecte diferite și dozaj-dependente în suprimarea activității epileptiforme.

Analiza noastră a evidențiat variații ale puterii spectrale în faza de tranziție preictal-ictală. Efectele blocanților VGSC asupra PSD au fost variabile și dependente de concentrație, reflectând mecanisme complexe de acțiune. Puterea PAC a variat în diferite faze ale SLE, cu scădere în faza ictală față de faza preictală și recuperare parțială în faza postictală.

Rezultatele noastre pot fi comparate doar parțial cu cele din literatura de specialitate din cauza diferențelor între modelele experimentale *in vitro* și *in vivo*.

Studiul nostru aduce o contribuție semnificativă la înțelegerea efectelor β -CD și a blocanților VGSC asupra activității neuronale epileptiforme într-un model *in vitro*. Efectele β -CD asupra activității neuronale nu au fost studiate anterior, deși a fost folosită în studii clinice în combinație cu diferite medicamente. Efectele blocanților VGSC asupra SLE nu au fost testate în combinație cu β -CD. Observațiile noastre referitoare la efectele dependente de doză, variabilitatea în eficacitatea medicamentelor și analiza detaliată a parametrilor PSD și PAC oferă o înțelegere mai profundă a mecanismelor de acțiune și a potențialului terapeutic al acestor substanțe.