

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Modificări ale proteinelor de legare a calciului și a celulelor gliale în circuitul epileptice: implicații pentru epileptogeneză și terapie anticonvulsivantă

Doctorand: Dr. Krisztina Kelemen

Conducători științifici: Prof. Dr. Tibor Szilágyi, Prof. Dr. István Katona

Context / Introducere

Deși numeroase studii au investigat patomecanismele și opțiunile terapeutice ale epilepsiei, aceasta rămâne o afecțiune complexă și multifactorială, continuând să reprezinte o povară semnificativă pentru sănătatea publică la nivel global. Epilepsia reduce semnificativ calitatea vieții, iar crizele necontrolate pot pune în pericol viața pacientului. Epilepsia de lob temporal mezial (TLE) este una dintre cele mai frecvente forme de epilepsie focală, iar aproximativ 30% dintre cazuri sunt rezistente la tratamentul cu medicamente anticonvulsivante (ASMs), constituind o dificultate majoră atât pentru clinicieni, cât și pentru pacienți.

Epileptogeneză implică modificări complexe la nivel celular și molecular, care afectează structura și funcția circuitelor neuronale. TLE este asociată cu mecanisme inflamatorii focale care duc la glioză în regiuni cerebrale bine definite, posibil cu o vulnerabilitate distinctă, ce pot contribui în continuare la activitatea disfuncțională a rețelelor neuronale. De asemenea, alterările căilor de semnalizare a calciului au fost identificate ca factori importanți în inițierea și progresia activității epileptice. Având în vedere rolul important al mecanismelor de tamponare a calciului în funcția neuronală, ipoteza de lucru formulată în cadrul acestei teze propune că atât proteinele de legare a calciului (CaBPs) clasice, cât și cele recent identificate suferă modificări în neuronii hipocampici și extrahipocampici pe parcursul epileptogenezei și sub influența noilor ASMs.

Pentru a investiga aceste aspecte, au fost elaborate trei studii complementare, care examinează modificările încă puțin explorate ale CaBPs în contextul epileptogenezei și evaluează efectele noilor ASMs asupra CaBPs, neuronilor și celulelor gliale. Scopul final al acestei cercetări este de a contribui la dezvoltarea unor terapii într-adevăr antiepileptogene.

Teza de doctorat prezintă o investigație multidisciplinară complexă asupra aspectelor moleculare, celulare și comportamentale ale epilepsiei de lob temporal, utilizând modelul de acid kainic (KA) administrat intracerebroventricular (ICV), un model experimental consacrat pentru studierea TLE farmacorezistente și testarea noilor ASMs. Modelul KA este recunoscut pentru capacitatea sa de a reproduce fiziopatologia TLE umane, inclusiv dinamica în timp a evenimentelor patologice implicate în epileptogeneză. În studiul nostru s-a utilizat administrarea ICV pentru a obține o localizare mai precisă și o reproductibilitate crescută a leziunilor epileptogene. Această optimizare metodologică a permis evaluarea detaliată atât a structurilor hipocampale, cât și a celor extrahipocampale implicate în circuitul epileptic.

Studiul I a avut ca scop caracterizarea distribuției spațiale și specificității celulare a CaBPs cu relevanță funcțională în sistemul nervos central. Proprietățile cinetice și capacitatea de tamponare variabilă a CaBPs contribuie la modularea răspunsurilor sinaptice și a excitabilității neuronale, adaptându-se nevoilor specifice ale populațiilor celulare care le exprimă. Din punct de vedere metodologic, am realizat o selecție a genelor relevante pe baza funcției biologice și am corelat aceste date cu baze de date publice de înaltă calitate pentru secvențierea ARN și hibridizarea *in situ*, inclusiv *Human Protein Atlas* (HPA), *Brain RNA-seq database* și *Allen Brain Atlas*

(integrate în HPA). Pe baza acestor resurse, am generat hărți termice ale expresiei genice care vizualizează expresia regională și specificitatea celulară ale CaBPs selectate.

Am dezvoltat astfel un instrument util pentru prezicerea și investigarea tiparelor de expresie ale CaBPs mai puțin cunoscute din sistemul nervos central. Exemplele prezentate în teză demonstrează că aceste baze de date pot fi utilizate pentru explorarea în continuare a distribuției și funcției acestor proteine.

Această abordare permite o înțelegere mai profundă a distribuției spațio-temporale și a potențialei relevanțe funcționale a CaBPs în creier. Prin sintetizarea datelor cantitative regionale și celulare într-un mod vizual clar, studiul nostru contribuie la identificarea proteinelor de legare a calciului relevante funcțional.

Studiul II – CaBPs sunt cunoscute pentru rolul lor în modularea excitabilității neuronale și în reglarea semnalizării calciului, putând contribui la dezechilibrul dintre excitabilitate și inhibiție observat în TLE. În timp ce parvalbumina (PV) și calretinina (CR) sunt CaBPs bine caracterizate, NECAB1 (N-terminal EF-hand Calcium Binding Protein 1) rămâne puțin studiat în context epileptic, în ciuda asocierii sale cu afecțiuni neurodegenerative. Scopul acestui studiu a fost determinarea distribuției NECAB1 și coexpresiei sale cu PV și CR în regiunile cerebrale implicate în rețelele epileptice, precum și investigarea efectelor unor ASMs, levetiracetam și brivaracetam, asupra expresiei NECAB1. Metodologic, s-a utilizat imunomarcajul fluorescent al CaBPs în modelul KA de TLE.

Rezultatele au arătat că în condiții fiziologice în regiunile cerebrale potențial implicate în circuitele epileptice celulele pozitive NECAB1 erau cele mai abundente în nucleul paraventricular al talamusului (PVT), nucleul endopiriform (EPN) și amigdala (AMY). O subpopulație de celule coexprimând CR a fost identificată în AMY, PVT și hipocamp, dar a fost aproape absentă în EPN. În faza cronică a epilepsiei indusă de KA, expresia NECAB1 a fost semnificativ crescută în PVT și bilateral în AMY. La șobolanii epileptici, celulele co-exprimând NECAB1-CR au fost absente în EPN drept, dar prezentau o densitate ridicată în stânga; în timp ce celulele NECAB1-PV au arătat o asimetrie interemisferică în AMY. De asemenea, am constatat că tratamentele cu levetiracetam și brivaracetam au avut un efect de modulare semnificativ asupra modificărilor de expresie NECAB1, reducând parțial creșterea densității celulare indusă de TLE.

Aceste rezultate sugerează că creșterea expresiei NECAB1 ar putea reprezenta un răspuns compensator la hiperexcitabilitatea epileptică. Având în vedere rolul său în reglarea talamo-corticală și diversitate interneuronală, NECAB1 ar putea juca un rol critic în remodelarea rețelelor.

Studiul III a avut ca scop compararea efectelor brivaracetamului și levetiracetamului asupra modificărilor histologice din regiunile cheie ale circuitului epileptic: hipocamp (regiunile CA1 și CA3), AMY, cortexul piriform (PC), EPN și PVT, utilizând modelul KA al TLE. Având în vedere rolul mai puțin cunoscut al celulelor gliale în TLE și în răspunsul la ASMs, studiul a investigat, pe lângă neuroni și modificările microgliale și astrocitare.

Rezultatele au evidențiat diferențe semnificative între cele două tratamente. În faza subacută a epilepsiei induse de KA, după trei săptămâni de administrare de ASMs, animalele tratate cu brivaracetam au prezentat o densitate microglială crescută în structurile anatomice implicate în activitatea epileptică (CA1, CA3, AMY, PC, EPN, PVT), comparativ cu cele tratate cu levetiracetam. În plus, s-a observat o astroglioza pronunțată în hipocamp, în special în CA3 drept, ipsilateral injecției de KA, modificare ce a fost ameliorat doar de levetiracetam nu și de brivaracetam. Diferențe semnificative au fost observate și în densitatea neuronală, cu o scădere relativă în grupurile tratate cu ASMs.

Concluzii generale – În ansamblu, această lucrare aduce dovezi suplimentare în sprijinul rolului CaBPs ca regulatori esențiali ai excitabilității neuronale și posibile ținte terapeutice. De asemenea, rezultatele subliniază importanța modificărilor celulelor gliale în patogeneza epilepsiei și în răspunsul la tratament.

Originalitatea tezei – Prin analiza integrată a modificărilor proteinelor de legare a calciului (NECAB1, PV, CR), a activării gliale și a reorganizării neuronale, studiul stabilește o punte între neurobiologia moleculară și epileptologia clinică. Rezultatele evidențiază rolul disfuncției homeostaziei calciului în TLE și propune mecanisme prin care ASMs pot modula progresia bolii.